

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
BACHARELADO EM BIOMEDICINA**

RAFAELA MARIA DA SILVA RIBEIRO

**POTENCIAL CITOTÓXICO E PREDIÇÕES FARMACOCINÉTICAS
DE UM DERIVADO DE CHALCONA TIPO TERPENÓIDE**

PARNAÍBA - PI

2024

RAFAELA MARIA DA SILVA RIBEIRO

**POTENCIAL CITOTÓXICO E PREDIÇÕES FARMACOCINÉTICAS
DE UM DERIVADO DE CHALCONA TIPO TERPENÓIDE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biomedicina, da Universidade Federal do Delta
do Parnaíba, como requisito obrigatório para
obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Jérsia Araújo.

Parnaíba-PI

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

R484p Ribeiro, Rafaela Maria da Silva
Potencial citotóxico e predições farmacocinéticas de um derivado de chalcona tipo terpenóide [recurso eletrônico] / Rafaela Maria da Silva Ribeiro. – 2024.
68 p.
TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2024.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Ana Jérsia Araújo.
1. Câncer colorretal. 2. Citotoxicidade. 3. Chalcona tipo terpenóide. 4. ADMET. I. Araújo, Ana Jérsia.. II. Título.

CDD: 610.7

RAFAELA MARIA DA SILVA RIBEIRO

**POTENCIAL CITOTÓXICO E PREDIÇÕES FARMACOCINÉTICAS
DE UM DERIVADO DE CHALCONA TIPO TERPENÓIDE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Biomedicina, da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em _____ de _____ de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Jérsia Araújo
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Profa. Dra. France Keiko Nascimento Yoshioka
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

M.a. Gisele Santos de Araújo
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, que em sua onipresença me acompanhou em todos os momentos, em sua onisciência, guiou as minhas decisões e em sua onipotência me deu forças para suportar as adversidades e não desistir.

Agradeço à minha família, minha base sólida. À minha mãe, **Maria dos Reis**, pelo cuidado incondicional, amor sem medidas, força e coragem diante das adversidades. Obrigada por me ensinar, desde cedo, o valor do conhecimento e da perseverança. Sobretudo, obrigada por lutar por nós. À minha tia (**Maria do Amparo**), meu irmão (**João Herus Riann**), e minha avó (**Martina Vieira**), que estiveram comigo de alguma forma, mesmo na distância. Vocês têm um espaço insubstituível no meu coração. Obrigada pelo apoio, por entenderem a minha ausência e por não desistirem de mim. A todos vocês, sou eternamente grata.

À querida **Aparecida Nascimento**, que foi fundamental na minha conclusão do ensino médio e mudança à Parnaíba. Obrigada por acreditar em mim e me apoiar!

Ao meu companheiro (**Juan Souza**), pelo incentivo, compreensão e cuidado que teve comigo durante todo esse tempo. Nos momentos de cansaço, você esteve ao meu lado, oferecendo apoio, pausas necessárias, mesmo que pequenas, e muito carinho.

À minha orientadora (**Profa. Dra. Ana Jérnia Araújo**), por me aceitar como aluna de iniciação científica, acreditar no meu potencial e me orientar nos caminhos da pesquisa. Obrigada pelos conhecimentos repassados, suas críticas construtivas e sugestões valiosas. Serei sempre grata.

A todos os amigos que fiz durante a trajetória, aos quais tenho muito apreço, admiração e carisma. Em especial **Thácila Sterfany** e **Andhiara Feitosa**, minhas irmãs do coração, **Isaac Alef**, **Henrique Fontenele**, **Andressa Sousa**, **Larissa Rayane**, **Letícia Furtado** e **Lisandra Pinto**. Obrigada a todos pela parceria e pelas muitas risadas. Vivemos bons momentos, os guardarei com muito carinho, abrindo espaço para vivermos mais!

À **Katriane Silva**, **Beatriz Oliveira** e **Vinícius Vieira**. Quem diria que, de um simples curso de férias, surgiria uma amizade dessas?! Obrigada por todos os momentos, meus amigos científicos e de vida! Sou grata pelo cruzamento dos nossos caminhos.

A **turma T25**, agradeço por tornarem essa jornada mais leve. Conviver com vocês foi muito bom, e o fechamento deste ciclo está sendo difícil para todos nós.

À toda equipe do LCCDelta, em especial ao **Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho**, coordenador do grupo de pesquisa, por todo apoio, colaboração e conhecimentos transmitidos. Ao **Dakson Douglas**, que é, acima de tudo, um grande amigo. Você foi

fundamental na minha trajetória em Parnaíba e sou grata por cada conselho pessoal e auxílio no desenvolvimento deste estudo. Lembrarei sempre com muito carinho de tudo que vivemos na casa amarela. À **Jéssica Teles**, primeira pessoa que acompanhei no laboratório, e que acompanho até hoje. Obrigada por todos os ensinamentos, com sua didática brilhante, pela paciência e insistência. Você é uma grande inspiração. À **Rodrigo Elísio, Stéphanie Matos, Gisele Araújo, Fabrício Machado e Ayslan Barros**, por todo conhecimento compartilhado e disposição em ensinar. À toda equipe LCCDelta, agradeço aos bons momentos, risadas e devaneios durante um bom café com bolo na grande mesa.

Aos professores que contribuíram com a minha formação ao longo desses anos, agradeço cada ensinamento e palavras de incentivo.

Agradeço à **Prof. Dra. Caridad Noda Perez** (UFG) pela síntese e concessão das amostras.

À **Universidade Federal do Delta do Parnaíba** e às agências de fomento, **CAPES e CNPq**, pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de iniciação científica que sem dúvidas foi fundamental como auxílio financeiro.

Na jornada que me trouxe até aqui, muitas pessoas cruzaram meu caminho. A todos, sinto a profunda necessidade de expressar minha gratidão.

DEDICATÓRIA

À minha família. Mãe (Maria dos Reis Vieira da Silva), avó (Martina Vieira de Santana), tia (Maria do Amparo Vieira da Silva) e irmão (João Herus Riann Vieira Alves).

RESUMO

O câncer representa um grave problema de saúde pública, exercendo um impacto considerável na taxa de morbi-mortalidade no mundo. A terapia anticâncer enfrenta diversos desafios, incluindo a resistência a medicamentos e graves efeitos colaterais que comprometem a qualidade de vida dos pacientes, sendo necessária a busca por novas estratégias terapêuticas. A química medicinal emerge como uma área de destaque na síntese de novos compostos, buscando, principalmente, otimizar propriedades de eficácia e segurança, visando qualidade de vida para o enfrentamento do câncer. Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o perfil citotóxico *in vitro* e predições farmacocinéticas *in silico* de um derivado de chalcona tipo terpenóide (BR4Cl), contendo cloro como substituinte halogênico. Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade da BR4Cl em nove linhagens celulares (sete cancerosas e duas não-cancerosas). Através do teste do MTT demonstrou-se que a linhagem HCT-116 mostrou-se mais sensível aos efeitos da molécula, com CI_{50} de $8,58\mu M$ após 72h de tratamento. A BR4CL foi mais seletiva para células cancerosas após 72h de tratamento. No ensaio hemolítico, utilizando eritrócitos humanos O+, não houve lise nas concentrações testadas, demonstrando boa biocompatibilidade. Ao verificar o tempo de exposição mínima que a molécula começa a agir nas células, foi observado que, uma exposição de 3h já foi suficiente para apresentar alterações na proliferação celular. Com base na CI_{50} de 24h para HCT-116, foram realizados os ensaios de exclusão por azul de Tripán e análise morfológica por coloração com kit panóptico rápido nas concentrações de 7,5, 15 e 30 μM . Observou-se diminuição da viabilidade celular de forma significativa nas concentrações de 15 e 30 μM , quando comparado ao controle negativo. Na análise morfológica, foram observadas características celulares sugestivas de morte celular, destacando-se intensa vacuolização, principalmente na maior concentração testada. Em detrimento disso, realizou-se um ensaio de MTT, em 72h, com um co-tratamento de BR4Cl e Cloroquina, um inibidor autofágico tardio, para averiguar os efeitos deste inibidor na atividade citotóxica da molécula. Os resultados sugerem a participação da via autofágica no processo de morte celular induzida pela BR4Cl. Aliados aos ensaios *in vitro*, foram realizados testes *in silico* para verificar seus parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade no organismo, a qual demonstrou potencial promissor para administração oral, com boa absorção pelo trato gastrointestinal. Entretanto, os parâmetros de distribuição, metabolismo e excreção sugerem possíveis interações medicamentosas, efeitos adversos e desafios na depuração do composto, bem como na sua excreção. Além disso, a BR4Cl apresentou risco moderado de cardiotoxicidade, devido à inibição do gene hERG, e mostrou-se mutagênica, com potencial carcinogênico em camundongos, embora não em ratos. Modificações estruturais podem melhorar as propriedades farmacocinéticas da amostra e reduzir efeitos adversos, mantendo seu potencial anticâncer. Dessa forma, estudos adicionais serão realizados visando elucidar os mecanismos de ação da BR4Cl envolvidos no seu efeito citotóxico, mitigar riscos de toxicidade e interações medicamentosas e, dessa forma, explorar o potencial terapêutico dessa molécula.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Citotoxicidade; Chalcona; ADMET.

ABSTRACT

Cancer is a serious public health problem and has a considerable impact on the morbidity and mortality rate worldwide. Anticancer therapy faces several challenges, including drug resistance and serious side effects that compromise patients' quality of life, making it necessary to search for new therapeutic strategies. Medicinal chemistry is emerging as a leading area in the synthesis of new compounds, mainly seeking to optimize efficacy and safety properties, aiming to improve quality of life in the fight against cancer. In this context, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxic profile and *in silico* pharmacokinetic predictions of a terpenoid-type chalcone derivative (BR4Cl) containing chlorine as a halogen substituent. Initially, the cytotoxicity of BR4Cl was evaluated in nine cell lines (seven cancerous and two non-cancerous). The MTT test showed that the HCT-116 strain was more sensitive to the effects of the molecule, with a CI_{50} of 8.58 μ M after 72h of treatment. BR4Cl was more selective for cancer cells after 72 hours of treatment. In the hemolytic test, using O+ human erythrocytes, there was no lysis at the concentrations tested, demonstrating good biocompatibility. When checking the minimum exposure time for the molecule to start acting on the cells, it was observed that a 3-hour exposure was enough to show changes in cell proliferation. Based on the 24-hour CI_{50} for HCT-116, trypan blue exclusion assays and morphological analysis by staining with the rapid panoptic kit were carried out at concentrations of 7.5, 15 and 30 μ M. A significant decrease in cell viability was observed at concentrations of 15 and 30 μ M, when compared to the negative control. Morphological analysis revealed cellular characteristics suggestive of cell death, especially intense vacuolization, especially at the highest concentration tested. As a result, a 72-hour MTT test was carried out with a co-treatment of BR4Cl and Chloroquine, a late autophagic inhibitor, to ascertain the effects of this inhibitor on the cytotoxic activity of the molecule. The results suggest the participation of the autophagic pathway in the cell death process induced by BR4Cl. In addition to the *in vitro* tests, *in silico* tests were carried out to verify its absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity parameters in the body, which showed promising potential for oral administration, with good absorption from the gastrointestinal tract. However, distribution, metabolism and excretion parameters suggest possible drug interactions, adverse effects and challenges in the clearance of the compound as well as its excretion. In addition, BR4Cl presented a moderate risk of cardiotoxicity, due to inhibition of the hERG gene, and was shown to be mutagenic, with carcinogenic potential in mice, although not in rats. Structural modifications can improve the pharmacokinetic properties of the sample and reduce adverse effects, while maintaining its anticancer potential. Additional studies will therefore be carried out to elucidate the mechanisms of action of BR4Cl involved in its cytotoxic effect, mitigate the risks of toxicity and drug interactions, and thus exploit the therapeutic potential of this molecule.

Keywords: Colorectal cancer; Cytotoxicity; Chalcone; ADMET.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AIH	Absorção intestinal humana
BHE	Barreira Hematoencefálica
CI₅₀	Concentração inibitória média
CQ	Cloroquina
CYP	Citocromo P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
Gp-P	Glicoproteína P
hERG	Gene <i>héter-a-go-go</i> humano
IC	Intervalo de confiança
IS	Índice de seletividade
MTT	<i>3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-brometo de tetrazolium</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (Tampão Fosfato)
PPB	Ligação às proteínas plasmáticas
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema nervosa central
TGI	Trato gastrointestinal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de células utilizadas no estudo, suas origens histológicas e concentração de plaqueamento	20
Tabela 2. Perfil citotóxico da BR4Cl frente a linhagens celulares cancerosas e não cancerosas pelo teste do MTT em 72h de incubação	27
Tabela 3. Índice de seletividade da BR4Cl frente à linhagem HCT-116, MCF-10-A e L929, no intervalo de 72 h.....	28
Tabela 4. Atividade citotóxica da BR4Cl, frente a linhagem HCT-116, pelo ensaio de MTT nos tempos de 24, 48 e 72h	28
Tabela 5. Atividade citotóxica da BR4Cl e do co-tratamento com cloroquina frente a linhagem HCT-116 pelo ensaio de MTT no tempo de 72h.....	31
Tabela 6. Predição ADME para a BR4Cl	32
Tabela 7. Predição de toxicidade para a BR4Cl	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características do câncer - novas adições	10
Figura 2. Estrutura química geral das chalconas	14
Figura 3. Estrutura química da beta-ionona	16
Figura 4. Delineamento experimental do presente estudo	19
Figura 5. Estrutura química da chalcona tipo terpenóide (BR4Cl)	19
Figura 6. Ensaio de pulso-concentração da BR4Cl na linhagem HCT-116 em diferentes tempos de tratamento	29
Figura 7. Efeito da BR4Cl na viabilidade de células HCT-116 após 24h de tratamento pelo método de exclusão por azul de Tripán	30
Figura 8. Análise das alterações morfológicas em células HCT-116 após 24h de tratamento com BR4Cl, nas concentrações de 7,5, 15 e 30 μ M	31
Figura 9. Análise de bloqueio dos canais hERG para a BR4Cl	33

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	Aspectos gerais do câncer e problemática terapêutica.....	9
2.2	Química medicinal no tratamento do câncer	11
2.3	Chalconas.....	13
2.4	Chalconas tipo terpenóides.....	15
3.	OBJETIVOS	18
4.	METODOLOGIA.....	19
4.1	Delineamento experimental.....	19
4.2	Obtenção da amostra	19
4.3	Avaliação citotóxica <i>in vitro</i> pelo teste do MTT.....	20
	Procedimento experimental	20
4.4	Teste hemolítico.....	22
	Procedimento experimental	22
4.5	Ensaio de pulso-concentração	22
	Procedimento experimental	22
4.6	Ensaio de exclusão do azul de Tripan.....	23
	Procedimento experimental	23
4.7	Avaliação da morfologia celular por coloração com panótico rápido	24
	Procedimento experimental	24
4.8	Ensaio do MTT (Co-tratamento com Cloroquina).....	25
	Procedimento experimental	25
4.9	Análise da previsão ADMET.....	26
5	RESULTADOS	27
5.1	Citotoxicidade <i>in vitro</i>	27
5.2	Teste hemolítico.....	28
5.3	Ensaio de pulso-concentração	29
5.4	Ensaio de exclusão por azul de Tripan.....	29
5.5	Análise morfológica por coloração com panótico rápido.....	30
5.6	Ensaio do MTT com associação entre BR4Cl e inibidor de autofagia (Cloroquina).....	31
5.7	Perfil ADMET	32
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO 1	63

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um grave problema de saúde pública em nível global e uma das principais causas de óbito, com índices de incidência e mortalidade ascendentes. Estima-se, no Brasil, a ocorrência de 704 mil novos casos para o triênio 2023-2025 (INCA, 2022). O desenvolvimento desta patologia é complexo e está sujeito a uma série de influências.

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas em que alterações na arquitetura tecidual precedem o aparecimento do câncer propriamente dito. As células cancerígenas incorporam características que as permitem sobreviver além do seu tempo de vida normal, suprimindo e/ou anulando vias apoptóticas fisiológicas. Além disso, elas apresentam um crescimento desordenado, proliferação anormal e capacidade de invasão de órgãos e tecidos, processo este conhecido como metástase (Feitelson *et al.*, 2015; Hanahan; Weinberg, 2011).

A maioria das mortes relacionadas ao câncer é resultado de metástases (Gerstberger, Jiang e Ganesha, 2023; Celià-terrassa; Kang, 2016). Dada a complexidade do câncer, seu tratamento representa um desafio para a medicina. Atualmente, os tratamentos clínicos incluem ressecção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, terapia molecular direcionada, imunoterapia e medicina tradicional chinesa. O uso da terapia combinada visa alcançar resultados mais eficazes, permitindo a abordagem de diferentes estratégias de manejo do câncer em cada estágio de desenvolvimento do tumor. Em casos de metástases, o manejo clínico recomendado prioriza o controle da doença para aumentar a sobrevida do paciente (Zhang 2022).

No entanto, essas terapias envolvem quimioterápicos que atingem tecidos com alto nível basal de proliferação e regeneração e, embora tenham como alvo as células tumorais, esses agentes acabam por impactar outros tecidos não tumorais de renovação constante, como pele, cabelo e epitélio do trato gastrointestinal, o que causa o alto nível de toxicidade associado a tais tratamentos (Rayan *et al.*, 2017; Feitelson *et al.*, 2015). Devido à problemática de tratamento difícil, invasivo e altamente dispendioso, que compromete a qualidade de vida e causa graves efeitos adversos aos pacientes, existe um grande interesse na busca por alternativas que possam contornar essas dificuldades (Niculescu; Grumezescu, 2021).

Nesse cenário, a química medicinal emerge como uma área de destaque na busca por novos fármacos que combinem eficácia, segurança e qualidade de vida para o enfrentamento do câncer. Dentre as estratégias de modificação molecular empregadas nesse campo, o

bioisosterismo, a latenciação de medicamentos e a hibridização molecular são os exemplos de última geração mais utilizados, sendo a hibridização molecular, em particular, uma estratégia poderosa para o design de medicamentos (Barreiro; Fraga, 2008; Gomes *et al.*, 2017).

Nesse contexto, as moléculas conhecidas como chalconas são uma das classes mais importantes de flavonóides. A química delas chama atenção da comunidade científica devido ao grande número de hidrogênios substituíveis, o que permite a geração de muitos derivados e uma variedade de atividades biológicas promissoras, as quais já são bastante conhecidas e incluem atividades anticancerosas, antimutagênicas, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, dentre outras (Jandial *et al.*, 2014). Apesar dessas aplicações medicinais das chalconas, seu amplo espectro de bioatividade indica um perfil alvo potencialmente promíscuo, pois podem estabelecer ligações irreversíveis com macromoléculas biológicas, resultando em uma série de efeitos tóxicos, como reações alergênicas, carcinogenicidade e mutagenicidade, ou ainda, podem ter sua reatividade afetada, representando um desafio clínico (Gomes *et al.*, 2017).

Os derivados de chalconas tipo terpenóides são compostos híbridos que possuem, em sua estrutura química, núcleos de chalconas conjugados a núcleos de β -ionona, que é um composto terpenóide cíclico. Terpenos são compostos simples de hidrocarbonetos, e os terpenóides são terpenos modificados, contendo diferentes grupos funcionais e grupos metil oxidados, que proporcionam diversas propriedades e funcionalidades biológicas, que tornam esses compostos aplicáveis para o tratamento de muitas doenças, incluindo o câncer. Dessa forma, a hibridização entre núcleos de chalconas e de β -iononas pode oferecer mais aplicações físicas e biológicas do que a chalcona, possibilitando o sinergismo das características (Manoel *et al.*, 2022).

Assim, os cientistas estão usando o conhecimento tradicional de plantas medicinais e a exploração sustentável de produtos naturais para sintetizar novos fármacos antitumorais, mais potentes e eficazes, aproveitando diferentes mecanismos de modificação molecular, oferecidos pela química farmacêutica. Nesse ínterim, o desenho e a síntese de novos análogos são particularmente importantes para o desenvolvimento futuro de derivados de chalconas clinicamente úteis (Zhou; Xing, 2015; Oyuang *et al.*, 2021).

Nesse contexto, como parte de uma busca contínua por novos compostos anticâncer, o presente estudo visa avaliar o potencial citotóxico *in vitro* e predições *in silico*, de um derivado de chalcona tipo terpenóide (BR4Cl) que contém um átomo de cloro como substituinte halogênico ligado ao núcleo do híbrido na posição *para* da estrutura da chalcona.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do câncer e problemática terapêutica

O câncer é um problema de saúde pública mundial, caracterizado como um conjunto de vários tipos de doenças complexas, causadas pelo acúmulo de mutações genéticas, em razão de fatores ambientais e/ou hereditários, ou ainda por alterações epigenéticas (Jamasi *et al.*, 2022; Hanahan; Weinberg, 2000). O desenvolvimento normal depende de um ciclo celular fortemente regulado, para garantir uma proliferação controlada e diferenciação celular adequada, visando manter a homeostase dos tecidos. Para tal, as células eucariotas possuem genes denominados oncogenes, que estão envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação, e genes supressores de tumor, responsáveis por prevenir a progressão do câncer. Quando mutados, estes genes que regulam o ciclo celular produzem oncogenes com ganho de função dominante e genes supressores de tumor com perda de função recessiva, com potencial de induzir a transformação neoplásica, conferindo à célula proliferação descontrolada e agressiva (Torry; Cooper, 1991; Hanahan; Weinberg, 2000).

No câncer, o equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular, que normalmente mantém a homeostase do tecido saudável, é perturbado e as células neoplásicas são capazes de superar a resposta apoptótica (morte celular programada) por diferentes mecanismos moleculares (Fouad; Aanei, 2017). Caso os mecanismos do sistema imunológico de reparação ou destruição celular falhem, a modulação do metabolismo e do comportamento das células favorece a progressão do câncer. A disparidade entre proliferação e morte celular gera uma massa celular anormal (tumor), salvo em cânceres hematológicos. Este tumor primário cresce, induz nova vascularização e as células tumorais podem permanecer no local de origem ou adquirir, progressivamente, a capacidade de migrar e invadir tecidos circundantes e distantes, podendo retomar a proliferação e colonizar esses órgãos, para formar tumores secundários. Este processo, conhecido como metástase, é responsável por mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer (Herrero; Medarde, 2015; Fouad; Aanei, 2017).

O câncer exibe diversas características e capacidades, as quais orquestram a patogênese e o desenvolvimento desta doença, conferindo grande complexidade (Figura 1). Nesse sentido, as células cancerosas são capazes de evitar supressores de crescimento, resistir à morte celular programada, sustentar os sinais proliferativos, induzir angiogênese, permitir imortalidade

replicativa devido a ativação da telomerase, ativar invasão e metástase, desregular a energética celular, evitar destruição imunológica e promover inflamação que gera instabilidade e mutação do genoma (Hanahan, 2022). Em geral, as células tumorais adquirem a maioria dessas características, enquanto poucas ganham todas elas. Assim, os cânceres humanos se desenvolvem como produtos de processos de várias etapas e o microambiente tumoral, notadamente, desempenha um papel integral na tumorigênese e progressão maligna (Darwiche, 2020; Singhal *et al.*, 2023).

Figura 1. Características do câncer - novas adições.



Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

Um tumor não é simplesmente um grupo de células cancerosas, mas sim uma coleção heterogênea de células hospedeiras infiltrantes e residentes, fatores secretados e matriz extracelular (Anderson; Simão, 2020). A composição do microambiente tumoral varia entre os diferentes tumores, mas, no geral, este componente fundamental dos tecidos malignos compreende, além das células cancerosas, células imunes, células adiposas, células inflamatórias, miofibroblastos e fibroblastos, bem como constituintes acelulares que remodelam a matriz extracelular (MEC) e que estimulam mudanças moleculares, celulares e

físicas significativas nos tecidos para controlar a progressão do câncer (Dominiak *et al.*, 2020; Anderson; Simão, 2020).

Dessa forma, a aquisição e manutenção das características do câncer dependem, em vários graus, das contribuições do microambiente tumoral, dada as interações constantes, dinâmicas e recíprocas (Xiao; Yu, 2020). Ressalta-se que, no microambiente tumoral, a função antitumoral é reduzida e o mecanismo de ativação sustentada da via NF- κ B também parece favorecer a sobrevivência do tumor e conduzir a morte das células imunitárias. Nesse sentido, a tumorigênese e a progressão do câncer não estão apenas relacionadas às células cancerígenas, mas estão também intimamente ligadas aos processos dinâmicos que ocorrem dentro do microambiente tumoral (Niculescu; Grumezescu, 2022; Zhang *et al.*, 2022; Dominiak *et al.*, 2020).

Tendo em vista a grande complexidade do câncer, o tratamento imediato e adequado é necessário para evitar o crescimento descontrolado de tumores e a carga que eles representam para os pacientes. Apesar dos tratamentos atuais e da combinação entre eles terem certa eficácia, há um grande desafio na terapêutica desta doença, que muitas vezes resulta em recidiva tumoral, baixa qualidade de vida e conseqüente declínio nas taxas de sobrevivência de pacientes com câncer. Tais barreiras incluem invasividade, baixa solubilidade da droga, circulação curta dos quimioterápicos na corrente sanguínea, resistência a múltiplas drogas devido a instabilidade genômica das células cancerosas, direcionamento inespecífico e os graves efeitos adversos sistêmicos (Rodrigues *et al.*, 2019; Niculescu; Grumezescu, 2022). Nesse sentido, o principal foco da terapia anticâncer segue sendo o desenvolvimento de novos medicamentos alternativos que possuam múltiplos alvos, aos quais apresentem baixa citotoxicidade, alta eficiência e capacidade de evitar a proliferação celular e/ou promover a apoptose (Zhang *et al.*, 2022).

2.2 Química medicinal no tratamento do câncer

Atualmente, a busca por produtos naturais com potencial na terapia do câncer tornou-se proeminente, uma vez que possuem efeitos secundários, menos tóxicos e características multidirecionadas que são frequentemente utilizadas para prevenção e melhoria dos sintomas na fase inicial do câncer, bem como no tratamento do câncer avançado. Portanto, os produtos naturais seriam uma composição crítica da terapia combinada, compensando a deficiência da cirurgia, quimioterapia e imunoterapia (Zhang *et al.*, 2022).

Existem oito categorias principais de produtos naturais anticâncer em uso, dentre elas, os flavonóides e isoflavonas, como genisteína, apigenina e baicaleína (Guo *et al.*, 2022). Porém, na maioria dos casos, os medicamentos naturais requerem otimização estrutural para melhorar a eficácia, segurança e acessibilidade química, bem como a farmacocinética. Nesse sentido, a química medicinal destina-se à criação, inovação, descoberta e síntese de compostos com atividade farmacológica. Essa modalidade de estudo tem alcançado sucesso nos últimos tempos, dando início a uma nova era na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, priorizando compostos seguros, de fácil obtenção, preferencialmente por meios sintéticos ou semissintéticos a baixo custo (Zhang *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2007; Sangi, 2016).

A química medicinal aplica estratégias de modificação molecular, onde o bioisosterismo, a homologação, a simplificação e a hibridização molecular são as técnicas mais empregadas. As estratégias de modificação molecular por métodos biotecnológicos estão sendo amplamente aplicadas em estudos de fármacos antineoplásicos e podem otimizar a estrutura do possível fármaco, a fim de melhorar as taxas de absorção, otimizar a seletividade, o aumento da potência e biodisponibilidade, e reduzir a toxicidade causada pelo fármaco, conferindo maior atividade farmacêutica e menor ocorrência de efeitos adversos (Barreiro; Fraga, 2008; Valente *et al.*, 2022).

No âmbito da química medicinal, a técnica de hibridização molecular merece destaque. Essa é uma estratégia que se baseia no acoplamento de dois ou mais fragmentos moleculares de diferentes substâncias bioativas (farmacóforos), de perfil biológico reconhecido, em uma nova e única entidade química, originando compostos híbridos, que mantêm características pré-selecionadas dos modelos originais (Zhang *et al.*, 2022). As moléculas híbridas podem ter modos de ação diferentes do que é manifestado nas moléculas parentais, ou ainda, potencializados, dado o sinergismo que pode ocorrer entre os grupos farmacofóricos. Além disso, compostos híbridos podem ter perfil de seletividade modificado, perfil de segurança melhorado, efeitos adversos reduzidos e capacidade de superar a resistência a múltiplas drogas. Recentemente, a hibridização molecular foi reconhecida como uma abordagem eficaz para projetar ligantes capazes de modular múltiplos alvos de interesse, sendo, portanto, uma estratégia valiosa para criação de agentes anticâncer multialvo (Marchesi; Perroni; Nacacchia, 2023).

Do ponto de vista químico, diversos produtos naturais bioativos de plantas possuem centros reativos que permitem ligações com outras moléculas para formar compostos híbridos,

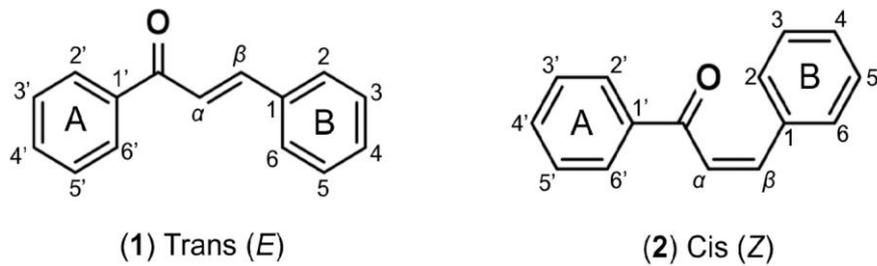
o que tem sido uma estratégia interessante para potencializar as suas propriedades biológicas. Embora muito promissor, o desenvolvimento de híbridos moleculares enfrenta problemas críticos, tanto da combinação de alvos correta, como da obtenção de uma atividade equilibrada em relação a eles. Porém, um aumento no número de publicações relevantes acerca do desenho lógico e racional de ligantes que funcionam seletivamente em múltiplos alvos, reflete o potencial de moléculas híbridas no desenvolvimento de agentes anticancerígenos (Singh *et al.*, 2022; Marchesi; Perroni; Nacacchia, 2023; Szumilak *et al.*, 2021).

2.3 Chalconas

As chalconas são moléculas de ocorrência natural em diversas espécies de plantas e produtos vegetais, incluindo especiarias, vegetais, frutas e chás. Possuem uma estrutura química simples (Figura 2), pequena, não quirais, de baixo peso molecular, lipofilicidade relativamente alta e de síntese fácil. Quimicamente, podem ser definidas como um grupo de compostos orgânicos do tipo cetonas α , β insaturadas, onde tanto o grupamento carbonila quanto a porção olefínica (alceno) estão ligadas a grupamentos aromáticos. Estruturalmente, pertencem ao grupo dos flavonóides de cadeia aberta e atuam também como o principal precursor da biossíntese de outros flavonóides e isoflavonóides (Zhuang *et al.*, 2017; Dhaliwal *et al.*, 2022).

As chalconas formam o núcleo central de muitos compostos biológicos importantes e apresentam uma ampla gama de atividades biológicas que, apesar de extensivamente pesquisadas, ainda carecem de uma compreensão precisa dos mecanismos de ação subjacentes. O vasto espectro de aplicações terapêuticas apresentado pelas chalconas atrai interesse na pesquisa e já as qualificaria como promissoras para a obtenção de princípios ativos. Porém, a possibilidade de sua produção sintética e biossintética também chama atenção. Em relação à síntese destes compostos, a metodologia mais comum ocorre pela reação de condensação de Claisen-Schmidt (Souza, 2012; Zhuang *et al.*, 2017). Além disso, a versatilidade ao incorporar diferentes farmacóforos e explorar os derivados de chalconas, aumenta consideravelmente o interesse químico e farmacológico nessas moléculas (Souza, 2012; Pereira *et al.*, 2023).

Figura 2. Estrutura química geral das chalconas.



Fonte: Gomes *et al.*, 2017.

Os compostos de chalcona têm uma estrutura química comum de 1,3-diaril-2-propen-1-ona, também conhecida como chalconóide, que existe como isômeros *trans* e *cis* (Figura 2), sendo o isômero *trans* termodinamicamente mais estável (em altas temperaturas), na maioria dos casos. Acredita-se que a presença de ligações duplas nas chalconas, combinadas com o grupo carbonila, é a principal responsável pela sua atividade biológica e que a sua ausência, ou qualquer alteração na porção farmacófora de propenona de 3 carbonos, leva à perda da atividade biológica da molécula. Esta região é quimicamente reativa e atua como potencial aceitador de Michael, com muitos hidrogênios substituíveis. A adição de diferentes grupos funcionais (arilas, halogênios, hidroxilas, carboxilas, fenilas etc.), confere uma vasta diversidade estrutural às chalconas, dependendo da quantidade, da posição e da natureza dos substituintes nos resíduos aromáticos (Zhuang *et al.*, 2017; Burmaoglu *et al.*, 2021; Ouyang *et al.*, 2021).

Sabe-se que as chalconas possuem propriedades antioxidantes (Aoki *et al.*, 2008; Vogel; Heilmann, 2008), anticancerígenas (Motani *et al.*, 2008; Orlikova *et al.*, 2011), antimetastática (Kimura; Baba, 2003), antiparasitária (Chen *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 2020; De Mello *et al.*, 2018), antimicrobianas (Semwal *et al.*, 2009), anti-inflamatória (Herencia *et al.*, 1999; Yadav *et al.*, 2011), antimutagênicas (Inami *et al.*, 2017), anti-histamínicas (Yamamoto *et al.*, 2004). No entanto, as diversas atividades das chalconas representam um desafio para o seu desenvolvimento clínico, no que diz respeito a encontrar alvos farmacológicos para sua atuação, devido à baixa seletividade em suas interações biológicas, o que explica, em parte, o motivo do sucesso clínico limitado com chalconas, apesar de intensas pesquisas (Jandial *et al.*, 2014; Ouyang *et al.*, 2021).

Nesse ínterim, modificações moleculares na estrutura das chalconas têm o potencial de melhorar suas propriedades físico-químicas e perfis biológicos, abrindo caminho para interação com diferentes alvos moleculares, outras moléculas e receptores biológicos específicos,

promovendo propriedades farmacológicas aprimoradas (Zhou, Xing, 2015; George *et al.*, 2022). Com isso, as chalconas exibiriam um espectro de atividades biológicas muito maior.

No que se refere ao câncer, nos últimos anos, numerosos estudos avaliaram e revelaram o potencial anticancerígeno das chalconas e de seus derivados através de estudos *in vitro*, *in vivo* e de acoplamento molecular. Além disso, dados indicam que as chalconas são compostos com atividade anticancerígena multialvo, demonstrando sucesso e relevância significativos. A integração da porção chalcona com outros farmacóforos anticancerígenos para criar compostos híbridos tem o potencial de superar a resistência aos medicamentos, uma vez que diferentes farmacóforos podem atuar através de múltiplos mecanismos de ação (Michalckova *et al.*, 2023; Bulakowska *et al.*, 2023; Dhaliwal *et al.*, 2022). Isso torna estas moléculas um grupo promissor para o desenvolvimento de novos agentes com propriedades anticancerígenas, especificidade terapêutica e eficácia aumentada.

Existem numerosas moléculas híbridas em ensaios clínicos. Recentemente, vários híbridos de chalcona foram desenvolvidos e testados quanto à sua eficácia anticancerígena, sendo alguns deles eficazes tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Constantinescu; Lungu, 2021; Gao *et al.*, 2020; Burmaoglu *et al.*, 2021). Dessa forma, a síntese de derivados de chalconas tem atraído atenção no campo da pesquisa anticâncer devido ao seu potencial como agentes terapêuticos eficazes, buscando obter moléculas mais biologicamente ativas.

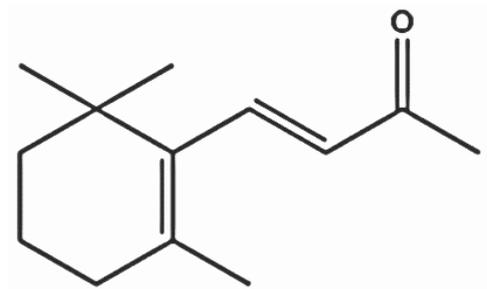
2.4 Chalconas tipo terpenóides

São denominados chalconas tipo terpenóides aqueles compostos obtidos pela reação de condensação de Claisen-Schmidt entre α ou β -ionona e um benzaldeído substituído, apresentando, portanto, em sua estrutura química, núcleos de ionona e núcleos de chalcona (Lima *et al.*, 2019). A ionona é uma substância química derivada da degradação dos carotenóides e faz parte de um grupo de compostos aromáticos encontrados em uma variedade de óleos essenciais. Ademais, podem ser extraídas, assim como seus derivados, de óleos vegetais de diversas espécies de plantas, além de serem encontradas também em frutas, vegetais e grãos contendo betacarotenos. Alternativamente, podem ser preparadas por métodos sintéticos (Silva, 2008; Ansari; Emami, 2016).

A β -ionona (figura 3) é um composto terpenóide cíclico, com uma estrutura de trimetilciclohexeno, que forma a estrutura básica do núcleo do ácido retinóico, retinol, β -

caroteno e vitamina A. Terpenóides são terpenos modificados, ou seja, são hidrocarbonetos constituídos por unidades de isoprenos, contendo diferentes grupos funcionais e grupos metil oxidados. Tais alterações proporcionam propriedades e funcionalidades, conferindo atividade biológica, úteis no tratamento do câncer (Ansari; Emami, 2016; Manoel *et al.*, 2022). Nesse sentido, a β -ionona pode ser usada como bloco de construção no projeto e síntese de agentes anticancerígenos derivados de ionona, uma vez que são compostos promissores de agentes quimioterápicos e quimiopreventivos (Ansari; Emami, 2016; Aloum *et al.*, 2020).

Figura 3. Estrutura química da beta-ionona.



Fonte: Aloum *et al.*, 2020.

Verificou-se, em estudos anteriores, que a β -ionona e seus derivados podem exibir uma variedade de atividades farmacológicas significativas, incluindo atividade antitumoral em melanoma, câncer de estômago, fígado, osso, cólon, mama e próstata, bem como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e quimiopreventiva. Estudos recentes também demonstraram propriedades antiproliferativas e antimetastáticas. Além disso, a β -ionona tem chamado atenção por induzir apoptose, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e devido à sua seletividade para células tumorais (Custodio *et al.*, 2021; Aloum *et al.*, 2020; Ansari; Emami, 2016; Zhou *et al.*, 2009).

O anel ciclohexenila, presente na β -ionona, pode ser modificado para sintetizar diversos derivados com potenciais propriedades anticancerígenas. Devido aos seus grupos metil, a união da β -ionona com moléculas de chalconas resulta em chalconas tipo terpenóides ao sofrer a reação de Claisen-Schmidt (Lima *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021). A estrutura tipo terpenóide aumenta a conjugação de estruturas de chalconas e pode ser responsável pelo aumento da estabilidade estrutural destes compostos (Manoel *et al.*, 2022). Embora a aplicabilidade da β -ionona contra diversas linhagens celulares de câncer tenha sido exaustivamente investigada, a

atividade citotóxica de chalconas tipo terpenóides, bem como seus mecanismos de ação, ainda não são bem compreendidos e necessitam ser estudados (Custodio *et al.*, 2021).

Estudos recentes descrevem uma variedade de atividades biológicas de derivados de chalcona tipo terpenóides, incluindo propriedades antiandrogênicas (Zhou *et al.*, 2009), antimicrobianas, antiproliferativas (Zhou *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2019; Custodio *et al.*, 2021), antimalárica (Valla *et al.*, 2005), e potencial para aplicações em fotônica devido às suas propriedades ópticas não lineares (Manoel *et al.*, 2022). Estudos realizado por Lemes e colaboradores (2018) investigaram a citotoxicidade de um derivado de chalcona tipo terpenóide, substituído por cloro, e descobriram que este composto inibe o avanço das células do sarcoma 180, além de ser um potencial ligante de DNA, que induz necrose e apoptose.

A análise comparativa de polimorfos conformacionais de chalconas tipo terpenóide revelou diferenças significativas em suas propriedades físico-químicas e biológicas, enfatizando a importância dessas variações estruturais para aplicações farmacológicas futuras (Silva *et al.*, 2021). Finalmente, estudos recentes sobre as propriedades ópticas não lineares das chalconas tipo terpenóides destacam a influência dos grupos substituintes na estrutura molecular sobre essas propriedades, o que também pode afetar sua atividade biológica (Pereira *et al.*, 2023; Manoel *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2019).

Na busca de novas moléculas para melhorar e ampliar o tratamento de doenças malignas e para superar a resistência a drogas e toxicidade, faz-se necessário pesquisar mais sobre essa classe que se mostra altamente promissora, de forma a desvendar o seu mecanismo de ação, que carece de descrição abrangente. Descobertas anteriores evidenciaram que a presença de bromo (Br) ou cloro (Cl) halogenados no composto, diminui a atividade citotóxica das chalconas semelhantes a terpenóides. No entanto, verificou-se que a β -ionona e um conjunto adicional de carbonos α , β -insaturados podem aumentar a atividade anticancerígena de Br ou Cl, aumentando a lipofilicidade do composto (Dias *et al.*, 2013).

Nesse sentido, com base nas propriedades biológicas conhecidas dos compostos com esqueleto de chalcona e de ionona, incluindo atividades anticancerígenas, o presente estudo busca avaliar o efeito citotóxico *in vitro* de uma chalcona do tipo terpenóide de origem sintética, a fim de avaliar se esta molécula pode exibir perfil farmacológico aprimorado no câncer.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito citotóxico de um derivado de chalcona do tipo terpenóide, denominado BR4Cl, por meio de ensaios *in vitro* e predições farmacocinéticas *in silico*.

3.2 Objetivos específicos

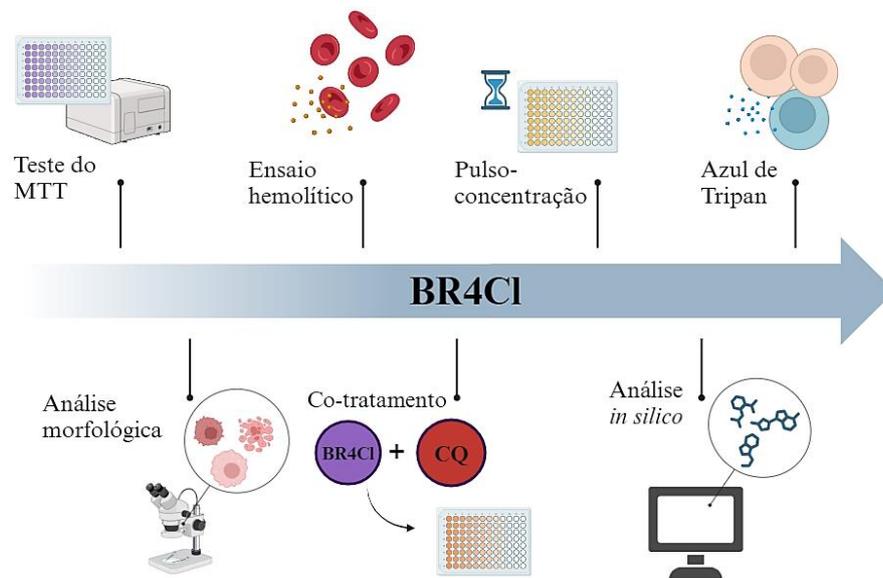
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* da BR4Cl frente um painel de células cancerosas e não cancerosas através do teste do MTT;
- ✓ Analisar a biocompatibilidade da BR4Cl em eritrócitos humanos O+ por meio do ensaio de hemólise;
- ✓ Investigar o perfil tempo-dependência e a exposição mínima necessária para a ação da BR4Cl em células de câncer colorretal humano (HCT-116) através do ensaio de pulso-concentração;
- ✓ Avaliar a viabilidade celular de células HCT-116 expostas ao tratamento com BR4Cl pelo ensaio de exclusão por azul de Tripan;
- ✓ Identificar as alterações morfológicas induzidas pela BR4Cl na linhagem celular HCT-116 através da coloração por panótico rápido;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade da BR4Cl associada a um inibidor de autofagia (cloroquina) por meio do teste do MTT;
- ✓ Avaliar parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade por meio de análises *in silico*.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental

A Figura 4 ilustra o delineamento experimental, apresentando, de maneira esquemática, as principais etapas do desenvolvimento da pesquisa e as técnicas empregadas.

Figura 4. Delineamento experimental do presente estudo.

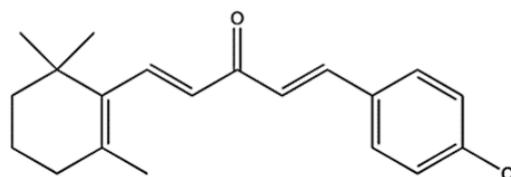


Fonte: Criado em Biorender.

4.2 Obtenção da amostra

A chalcona tipo terpenóide avaliada neste estudo foi sintetizada na Universidade Federal de Goiás e gentilmente cedida pela Profa. Dra. Caridad Noda Pérez para a realização de testes de citotoxicidade em células cancerosas e não cancerosas. O composto apresenta o cloro como substituinte halogênico e possui fórmula molecular $C_{20}H_{23}OCl$ e peso molecular de 314,6 g/mol. Sua estrutura química está representada abaixo (Figura 5). Até o momento, os relatos a respeito desta molécula *in vitro* e *in vivo* são escassos.

Figura 5. Estrutura química da chalcona do tipo terpenóide (BR4Cl), alvo da pesquisa.



Fonte: Lima *et al.*, 2019.

4.3 Avaliação citotóxica *in vitro* pelo teste do MTT

A molécula foi testada para avaliação da sua atividade citotóxica *in vitro* através do teste do MTT em diversas linhagens celulares, cancerosas e não cancerosas, com diferentes origens histológicas (Tabela 1). O teste do MTT consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, em cristais de formazan, um composto de cor azul/púrpura. Tal conversão ocorre apenas em células metabolicamente ativas, por enzimas oxidorredutases, como a succinil-desidrogenase, presente nas mitocôndrias. Sendo assim, é possível quantificar indiretamente a porcentagem de células vivas, bem como a perda de células viáveis (Mosmann, 1983; Berridge et al., 1996; Kuete, Karaosmanoglu, Sivas, 2017).

Tabela 1. Linhagens de células utilizadas no estudo, suas origens histológicas e concentração de plaqueamento.

Linhagens	Origem histológica	Concentração de plaqueamento (células/mL)
HCT-116	Carcinoma colorretal humano	6×10^4
PC3	Adenocarcinoma de próstata humano	1×10^5
MCF-7	Adenocarcinoma mamário humano	1×10^5
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário humano	8×10^4
MEL-501	Melanoma humano	5×10^4
HT-29	Adenocarcinoma de cólon humano	1×10^6
HCT-116^{p53-/-}	Carcinoma colorretal humano	5×10^4
L929	Fibroblasto murino	1×10^5
MCF-10A	Epitélio mamário não tumorigênico	1×10^5

Procedimento experimental

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura, com meio de cultura adequado para cada linhagem, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). Após chegarem em um nível de confluência visivelmente superior a 70%, as células foram dispostas em placas de 96 poços, seguindo a concentração de plaqueamento de cada célula, a qual é diferente para cada linhagem celular, a depender de suas

características intrínsecas *in vitro*, como tempo de divisão celular. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa com ambiente interno controlado, a 37°C e umidificada com 5% de CO₂, por 24 horas para favorecer a adesão.

Após o período de incubação, realizou-se o tratamento das células plaqueadas, as quais foram tratadas com um controle negativo (meio DMEM ou RPMI completo), o qual serve como controle normal de crescimento celular; um controle positivo, um fármaco padrão utilizado no tratamento de diversos tipos de cânceres, no caso, doxorrubicina (5 – 0,078 µg/mL); e a amostra em diluições seriadas de razão dois (25 – 0,39 µg/mL).

Após tratadas, as placas foram reincubadas. Para cada linhagem celular, o teste do MTT foi realizado em triplicata, de modo que a leitura da placa foi realizada após 72h de incubação. Três horas antes do final do período da reincubação, o sobrenadante de cada poço foi retirado cuidadosamente, e foi adicionado à cada poço da placa 150µL da solução de MTT (0,5mg/mL) diluído em meio DMEM ou meio RPMI (a depender da linhagem testada). Então, a placa foi incubada novamente por mais 3h, para completar o tempo de incubação e, conseqüentemente, dar início da leitura. Este tempo é necessário para que o MTT reaja com as células metabolicamente ativas e seja convertido em formazan.

Passado este tempo, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante novamente e adicionou-se 150µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço da placa, a qual ficou em agitação por cerca de 20 minutos para que o formazan fosse ressuspendido e solubilizado no solvente orgânico, permitindo sua quantificação em leitor ELISA SPECTRAMAX 190. A leitura da placa foi realizada sob comprimento de onda de 595 nm, indicado como comprimento de maiores picos de absorbância do formazan.

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0. Os valores das absorbâncias foram transformados em porcentagem de inibição, baseado na média da absorbância do controle negativo. A concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi obtida por regressão não linear.

O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da razão entre o valor de CI₅₀ para linhagens não cancerosas e para linhagens cancerosas ($IS = CI_{50} \text{ de células não cancerosas} / CI_{50} \text{ de células cancerosas}$) (Razak *et al.*, 2019).

4.4 Teste hemolítico

O ensaio de hemólise foi realizado para analisar a biocompatibilidade sanguínea e a segurança da BR4Cl (Quelemes *et al.*, 2017). O projeto encontra-se aprovado sob o número de parecer: **5.689.795** e CAAE: **63749722.8.0000.0192** (Anexo 1).

Procedimento experimental

Os glóbulos vermelhos humanos O+, obtidos por punção venosa, foram dispostos em placas de 96 poços e submetidos a tratamento por Triton X a 0,1% como controle positivo, solução salina a 0,85% como controle negativo e diferentes concentrações da amostra variando de 500 a 1,95 µg/mL. Então foram incubados em temperatura ambiente sob agitação constante por um período de 1 hora.

Após esse período, os sobrenadantes foram transferidos para outra placa de 96 poços e a absorbância dos poços foi medida em 492 nm em leitor de placas ELISA SPECTRAMAX 290. A porcentagem de hemólise (%h) foi calculada pela expressão: $\%h = (ABS_{amostra} - ABS_{salina}) / (ABS_{triton} - ABS_{salina})$. O resultado está expresso em percentual de hemólise.

4.5 Ensaio de pulso-concentração

O ensaio de pulso-concentração foi realizado para investigar o tempo mínimo de exposição necessário para que a molécula inicie seu efeito biológico (Almeida *et al.*, 2019). Tal ensaio segue a metodologia do MTT, no entanto, antes de fazer a leitura da placa, realiza-se a interrupção do tratamento pela remoção do meio contendo a amostra e a substituição por meio de cultura completo, sem tratamento, em intervalos de tempo pré-determinados.

Procedimento experimental

A linhagem HCT-116 foi disposta em placas de 96 poços, em uma concentração de plaqueamento de 6×10^4 células/mL. Após 24 h, as células foram tratadas com BR4Cl diluída em meio suplementado, resultando em concentrações variando de 25 – 0,39 µg/mL. Após tempos pré-determinados de exposição ao fármaco (a saber: 3h, 6h, 12h, 24h e 48h), retirou-se o tratamento, os poços foram lavados com PBS e em seguida foi adicionado 200 µL de meio suplementado, a fim de restituir as condições habituais de sobrevivência celular.

Após o último tratamento ser retirado (48h), a placa permaneceu incubada por mais 21 horas, quando o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e, então, foi adicionado a cada poço da placa uma solução contendo MTT (0,5 mg/mL) diluída em meio DMEM não suplementado. Após isso, a placa foi reincubada por mais 3 horas. Passado este tempo, descartou-se o sobrenadante e então adicionou-se 150 µL de DMSO para ressuspensão do formazan (em agitação por cerca de 20 minutos). Procedeu-se a leitura da placa em leitor de placas ELISA SPECTRAMAX 190, a 595 nm.

Os valores das absorbâncias foram plotados no software GraphPad Prism versão 8.0, que transforma os valores em porcentagem de inibição baseada na média da absorbância do controle negativo e, posteriormente, fornece a CI_{50} com os respectivos intervalos de confiança, por regressão linear.

4.6 Ensaio de exclusão do azul de Tripán

O ensaio de exclusão do azul de Tripán é um método quantitativo direto, que permite avaliar a viabilidade celular. O teste baseia-se na carga negativa do corante, na permeabilidade seletiva e na integridade da membrana celular (esta última foi estabelecida como critério básico para classificar uma célula como viável ou inviável). Nesse sentido, as células íntegras e viáveis não permitem a entrada do corante na célula e, caso este entre, tais células possuem meios para expulsá-lo. Em contrapartida, o corante penetra nas células que não possuem a membrana plasmática íntegra e fica retido, exibindo uma coloração azul nessas células, indicando que são inviáveis (Avelar-Freitas *et al.*, 2015; Strober, 2015).

Procedimento experimental

As células HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços, numa concentração de 1×10^5 células/mL. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com controle positivo (Doxorrubicina a 5 µM) e com a amostra teste nas concentrações de 7,5, 15 e 30 µM por 24 horas, determinadas a partir dos resultados obtidos pelo teste do MTT. O DMSO foi utilizado como controle negativo. Após o período de incubação, as células foram transferidas dos poços para microtubos, os quais foram centrifugados a 2500 RPM por 5 minutos. Então, o sobrenadante dos microtubos foi desprezado e o pellet de células foi ressuspendido em 1mL de PBS. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 90 µL da suspensão de células e adicionou-se 10

μL de azul de tripan a 0,4%, seguindo para a contagem das células viáveis e não viáveis em câmara de Neubauer.

Os dados foram analisados com base na média \pm erro padrão da média da triplicata de pelo menos dois experimentos. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida por pós-teste de Tukey para comparação com o controle negativo, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.7 Avaliação da morfologia celular por coloração com panótico rápido

Com o objetivo de avaliar as alterações morfológicas causadas pelo tratamento das células com a BR4Cl, as células foram coradas com o kit panótico rápido (Laborclin®). Essa coloração é fundamentada no método de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky, que facilita o estudo microscópico de tecidos por colorir o conteúdo ácido e básico com cores diferentes. Dessa forma, permite a visualização de características morfológicas por meio da marcação diferenciada do citoplasma e do núcleo, baseado nas suas respectivas cargas elétricas. O primeiro reagente do kit tem a função de fixar as células; o segundo confere cor avermelhada ao citoplasma das células, devido ao seu caráter ácido; e o terceiro corante do kit produz coloração azulada ao núcleo, devido ao seu caráter alcalino (Liu *et al.*, 2021).

Procedimento experimental

As células HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em uma concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas em estufa a 37°C umidificada com 5% de CO₂. Após 24h de incubação, as células foram tratadas com um controle negativo (DMSO), um controle positivo (Doxorrubicina a 5 μM) e com a BR4Cl nas concentrações de 7,5 μM , 15 μM e 30 μM , sendo reincubadas por 24 horas.

Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas na placa, para que se soltassem do fundo do poço e pudessem ser dispostas em microtubos, os quais foram centrifugados a 2500 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de PBS. Desta solução de células, retirou-se 100 μL e colocou-se em uma citocentrífuga, com lâminas acopladas, a 1500 RPM por 5 minutos, para que as células aderissem à superfície das lâminas. Passado este tempo, as lâminas foram coradas

com o kit de coloração panótico rápido (Laborclin®), passando cerca de 15 segundos no primeiro corante (fixador), 15 segundos no segundo corante (eosinofílico) e 10 segundos no terceiro corante (basofílico). Após retirar o excesso dos corantes com água destilada e secar as lâminas, estas foram observadas em microscópio óptico e fotografadas.

As lamínulas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das análises foi feito por fotografia em microscopia óptica.

4.8 Ensaio do MTT (Co-tratamento com Cloroquina)

A fim de avaliar o envolvimento da autofagia no processo de morte celular induzido pela BR4Cl, realizou-se um co-tratamento entre a amostra avaliada e a cloroquina (CQ), um agente lisossomotrópico comumente utilizado como inibidor autofágico (Xu *et al.*, 2022), para determinar o valor de CI_{50} pelo teste do MTT após incubação de 72 horas.

Procedimento experimental

Seguiu-se a metodologia do teste do MTT. As células da linhagem HCT-116 foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades, em densidade de 6×10^4 células/mL. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas inicialmente com concentrações seriadas da amostra teste (25 – 0,39 $\mu\text{g/mL}$). Logo em seguida, adicionou-se 2 μL de CQ a 10 μM em cada poço tratado com a chalcona. Após tratadas, as placas foram reincubadas por 72h. Três horas antes do final do período da reincubação, o sobrenadante de cada poço foi retirado, cuidadosamente, e foi adicionado à cada poço da placa 150 μL da solução de MTT (0,5mg/mL) diluído em meio DMEM. Então, a placa foi incubada novamente por mais 3 horas, para completar o tempo de incubação e conseqüentemente de início da leitura.

Passado este tempo, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante novamente e adicionou-se 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço da placa, a qual ficou em agitação por cerca de 20 minutos para que o formazan fosse ressuspendido e solubilizado, permitindo sua quantificação em leitor ELISA SPECTRAMAX 190, utilizando comprimento de onda de 595 nm e obtendo as absorbâncias de cada poço.

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0. Os valores das absorbâncias foram transformados em porcentagem de inibição, baseado na média da absorbância do controle negativo. A concentração inibitória média capaz de provocar 50%

do efeito máximo (CI50) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi obtida por regressão não linear.

4.9 Análise da previsão ADMET

A previsão ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) busca analisar parâmetros farmacocinéticos para verificar a segurança do uso da nova droga em desenvolvimento, através de *softwares* online gratuitos, que realizam a comparação entre a estrutura química da molécula estudada com a estrutura de outras moléculas conhecidas e que estão disponibilizadas em bancos de dados (Er-Rajy *et al.*, 2022). Os dois *softwares* utilizados nesse estudo para processar a estrutura da BR4Cl, foram o Pre-ADMET, utilizado para avaliar propriedades ADMET, e o Pred-hERG, que fornece informações sobre a capacidade do composto testado provocar bloqueio dos canais hERG, presentes principalmente no tecido cardíaco. Isto é um dos requisitos para a segurança no uso de drogas, visto que fármacos com potencial bloqueador podem levar a cardiotoxicidade (Braga *et al.*, 2015).

Os parâmetros fornecidos e avaliados pelo *software* pre-ADMET, referentes à absorção, foram: absorção intestinal humana (AIH), modelos celulares Caco-2 (câncer epitelial de cólon) e MDCK (células renais caninas Madin-Darby), para avaliar a permeabilidade celular *in vitro*. Para avaliar a distribuição da droga, o *software* analisou a permeabilidade através da barreira hematoencefálica (BHE) e a ligação às proteínas plasmáticas (PPB). Os parâmetros que verificam o metabolismo referem-se à interação da molécula com as enzimas do citocromo P450 (CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4) e os parâmetros fornecidos para analisar a excreção da droga referem-se à ligação à glicoproteína P (Lee *et al.*, 2003).

Quanto à toxicidade, o *software* abrange o teste de Ames e de carcinogênese em ratos e camundongos. No teste de Ames, cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* (TA100 e TA1535) são dotadas de uma mutação que inibe o crescimento da bactéria em meio isento de histidina. O teste avalia a capacidade do composto testado reverter a mutação das cepas bacterianas. São consideradas mutagênicas as moléculas que causam a reversão em pelo menos uma das cepas testadas (Ames; McCann; Yamasaki, 1975).

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade *in vitro*

Os resultados demonstraram que a BR4Cl apresentou citotoxicidade para todas as linhagens tumorais testadas, com valores de CI_{50} que variaram de 8,58 a 32,8 μM para HCT-116 e MCF-7, respectivamente. Nas linhagens celulares não cancerosas, a CI_{50} foi de 22,5 (L929) e 12,2 μM (MCF-10A). Diante dos resultados, foi demonstrado que a linhagem de câncer colorretal humano (HCT-116) foi a mais sensível aos efeitos da molécula, sendo escolhida para dar prosseguimentos aos estudos (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil citotóxico da BR4Cl frente a linhagens celulares cancerosas e não cancerosas pelo teste do MTT em 72h de incubação.

Linhagens	CI_{50} (μM)		
	BR4Cl	DOX	
Cancerosas	HCT-116	8,58 (7,3 - 10,2)	0,21 (0,16 - 0,29)
	PC-3	16,4 (14,1 - 19,1)	2,6 (1,74 - 4,19)
	MCF-7	32,8 (27,3 - 39,2)	0,12 (0,03 - 0,28)
	MDA-MB-231	21,1 (19,2 - 23,7)	0,18 (0,13 - 0,23)
	MEL-501	17,6 (15,6 - 19,7)	0,1 (0,08 - 0,10)
	HT-29	9,7 (8,3 - 11,3)	0,8 (0,6 - 1,0)
	HCT-116 ^{p53} -/-	9,5 (8,5 - 10,8)	0,34 (0,28 - 0,40)
Não cancerosas	L929	22,5 (20 - 25,1)	0,72 (0,52 - 1,07)
	MCF-10A	12,2 (9,2 - 15,7)	0,17 (0,14 - 0,21)

Os valores de CI_{50} foram calculados a partir de regressão não linear, utilizando o programa GraphPadPrism Software versão 8.0. Fonte: elaborado pela autora.

O índice de seletividade foi calculado comparando a citotoxicidade para as linhagens não cancerosas (L929 e MCF-10A) e para a linhagem de células cancerosas HCT-116, em 72 horas (Tabela 3). Conforme os valores apresentados, observa-se que a BR4Cl foi 1,5 vezes mais seletiva para HCT-116 quando comparada à MCF-10A e 2,6 vezes quando comparada à L929.

Tabela 3. Índice de seletividade (IS) da BR4Cl frente às linhagens HCT-116, MCF-10A e L929, no intervalo de 72 horas.

	Índice de seletividade (IS)	
	MCF-10A/HCT-116	L929/HCT-116
BR4Cl	1,5	2,6
DOX	0,8	3,4

IS = CI_{50} de células não cancerosas / CI_{50} de células cancerosas. Fonte: elaborado pela autora.

Com base no melhor efeito para a linhagem HCT-116, prosseguiu-se com avaliação em diferentes tempos, 24 e 48 horas. Os resultados demonstraram um valor de CI_{50} de 17,4 μ M para o tempo de 48h e 27,3 μ M para o tempo de 24h (Tabela 4). Com base na CI_{50} de 24h, foram escolhidas três concentrações para a realização de novos ensaios.

Tabela 4. Atividade citotóxica da BR4Cl, frente a linhagem HCT-116, pelo ensaio de MTT nos tempos de 24, 48 e 72h.

HCT-116	CI_{50} (μ M)		
	(Intervalo de confiança 95%)		
	24h	48h	72h
BR4Cl	27,3 (22,9-32,4)	17,4 (13,7-21,2)	8,58 (7,3-10,2)
DOX	0,8 (0,6-0,8)	0,5 (0,4-0,6)	0,21 (0,16-0,29)

Os valores de CI_{50} foram calculados a partir de regressão não linear, utilizando o programa GraphPadPrism Software versão 8.0. Fonte: elaborado pela autora.

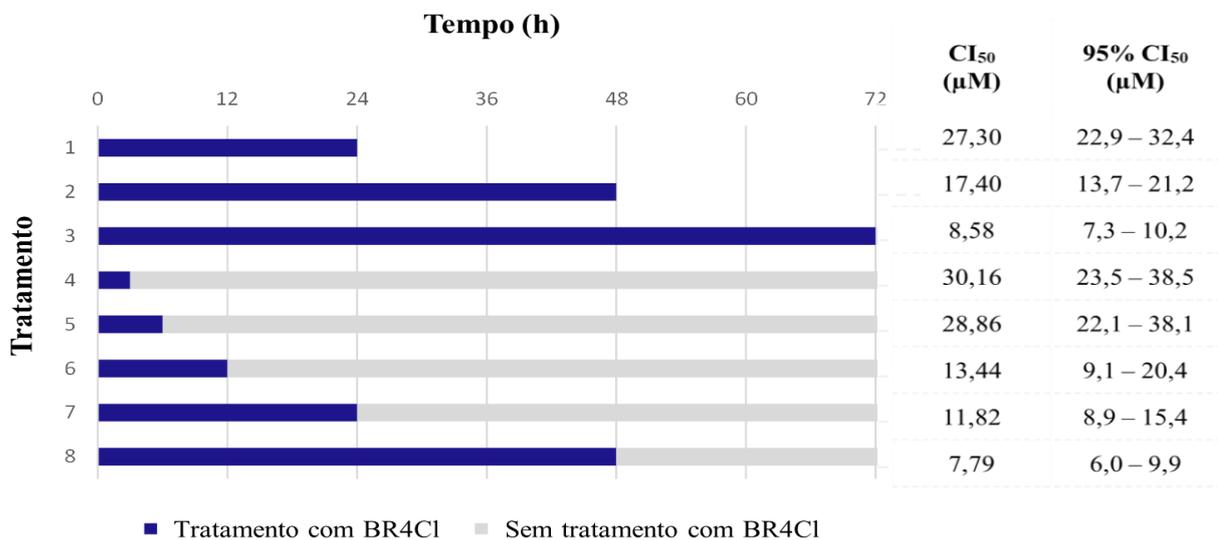
5.2 Teste hemolítico

Por meio dos resultados analisados, foi possível observar que a BR4Cl não demonstrou potencial hemolítico na maior concentração avaliada, ou seja, não houve a lise das hemácias. Diante do exposto, sugere-se que a amostra apresenta biocompatibilidade e ausência de citotoxicidade aos eritrócitos em concentração elevada de 1,6 mM.

5.3 Ensaio de pulso-concentração

Um protocolo de exposição intermitente utilizando o ensaio de pulso-concentração com BR4Cl foi conduzido por 3, 6, 12, 24 e 48h, seguido de incubação em meio livre de amostra até completar o período de 72h, utilizando células HCT-116. O tratamento com o composto resultou em citotoxicidade dependente do tempo. Notavelmente, um pulso de 3 horas com o composto foi suficiente para significativamente reduzir a viabilidade celular após um período total de incubação de 72h. Isso sugere que mesmo um breve tempo de incubação com a molécula apresenta efeitos citotóxicos (Figura 6).

Figura 6. Ensaio de pulso-concentração da BR4Cl na linhagem HCT-116 em diferentes tempos de tratamento.



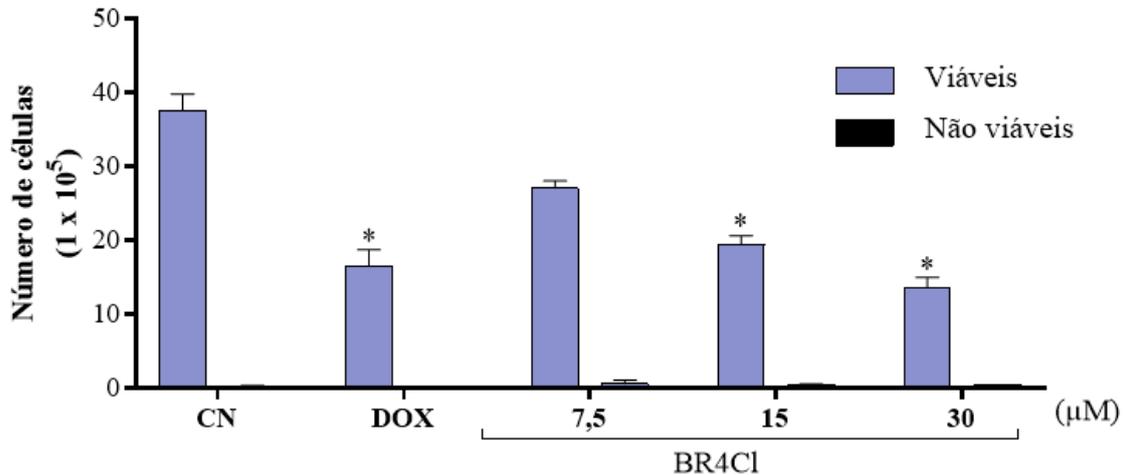
Os valores de CI₅₀ estão apresentados em µM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism Software versão 8.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Fonte: elaborado pela autora.

5.4 Ensaio de exclusão por azul de Tripan

A partir dos resultados de CI₅₀ obtidos pelo ensaio do MTT na linhagem HCT-116 em 24h, foram escolhidas três concentrações para dar continuidade aos experimentos (7,5, 15 e 30 µM). Os resultados de viabilidade foram obtidos após quantificação de células viáveis e não viáveis. Foi possível perceber que, em relação ao controle negativo, a BR4Cl foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de células viáveis nas concentrações de 15 e 30µM,

sem aumento no número de células não viáveis, após 24h de tratamento. A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, seguiu o mesmo padrão (Figura 7).

Figura 7. Efeito da BR4Cl na viabilidade de células HCT-116 em 24h de tratamento pelo método de exclusão por azul de Tripán.



Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de no mínimo dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$) comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey. O controle negativo (CN) recebeu o veículo utilizado para diluição do composto (DMSO). Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Fonte: elaborado pela autora.

5.5 Análise morfológica por coloração com panótico rápido

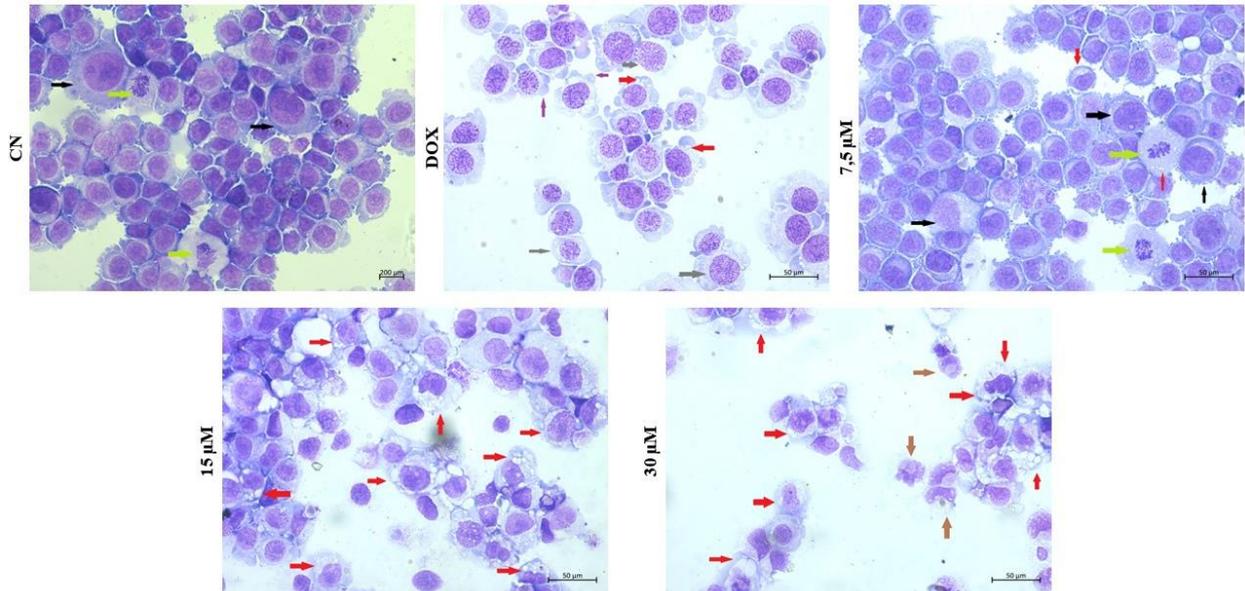
O protocolo de coloração com o kit panótico rápido (Laborclin®) foi realizado com o objetivo de ter uma análise morfológica das células após a exposição ao composto e, através disso, poder avaliar um possível perfil de morte celular pelas alterações morfológicas.

O grupo de células pertencentes ao controle negativo (CN), não tratadas com a BR4Cl, apresentaram membranas plasmáticas e nucleares íntegras, alta relação núcleo-citoplasma e algumas figuras mitóticas, indicando morfologia típica da linhagem. Já o grupo de células do controle positivo, tratadas com doxorrubicina, apresentou características típicas de morte celular como rarefação celular, núcleos eosinofílicos, vacuolização e presença de corpos apoptóticos (“blebs”) (Figura 8).

Após as 24h de incubação, observou-se várias alterações celulares, principalmente nas maiores concentrações testadas da amostra sugestivas de morte celular provocada pela BR4Cl. No grupo tratado com 7,5 μ M de BR4Cl, foi possível perceber a presença de vacúolos citoplasmáticos, aumento do volume celular e ainda algumas figuras mitóticas, indicando atividade celular. Já o grupo tratado com 15 μ M de BR4Cl, exibiu maior vacuolização e menor

relação núcleo/citoplasma. Quanto ao grupo tratado com 30 μM de BR4Cl, foi possível notar rarefação celular, intensa vacuolização e desintegração nuclear.

Figura 8. Análise das alterações morfológicas em células HCT-116 após 24 horas de tratamento com BR4Cl, nas concentrações de 7,5, 15 e 30 μM . Coloração por kit panótico rápido.



As células foram analisadas por microscopia óptica (400x). Escala de 50 μm . CN: controle negativo. DOX: doxorubicina. Setas pretas – aumento do volume celular, setas vermelhas – vacuolização, setas verdes – figuras mitóticas, setas marrons – desintegração celular. Setas cinzas – fragmentação nuclear. Setas roxas – “blebs”.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Ensaio do MTT com associação entre BR4Cl e inibidor de autofagia (Cloroquina)

A associação da amostra teste com o inibidor de autofagia representa uma possível participação do processo autofágico na via de morte induzida pela BR4Cl, visto que a CI_{50} praticamente dobrou (Tabela 5), contudo, mais ensaios tornam-se necessários para desvendar o mecanismo de ação citotóxico da molécula.

Tabela 5. Atividade citotóxica da BR4Cl e do co-tratamento com cloroquina frente a linhagem HCT-116 pelo ensaio de MTT no tempo de 72h.

Amostras	CI_{50} (μM) (Intervalo de confiança 95%)
BR4Cl	8,58 (7,3 - 10,2)
BR4Cl + CQ	15,9 (13,7-18,7)

Os valores de CI_{50} estão apresentados em μM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism Software versão 8.0. Os intervalos de confiança (IC 95%), apresentado entre parênteses, foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. CQ: cloroquina ($10\mu M$). Fonte: elaborado pela autora.

5.7 Perfil ADMET

De acordo com os resultados, os parâmetros de absorção indicaram que a BR4Cl possui máxima absorção intestinal, permeabilidade de 55,96 nm/s em células Caco-2, indicativo de boa absorção e potencial de permeabilidade de membrana intermediário em células MDCK, apresentando valores de 35,09 nm/s. Em relação ao parâmetro de distribuição, o resultado da previsão para a BR4Cl foi de 15,98, que indica que a molécula é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e apresentou índice de PPB de 100%. Quanto à interação com as enzimas do citocromo P-450, a BR4Cl inibiu as enzimas CYP2C19 e CYP2C9, mas não foi capaz de inibir CYP2D6 e CYP3A4. Além disso, a BR4Cl foi capaz de inibir a glicoproteína P, importante na excreção de metabólitos (tabela 6).

Tabela 6. Predição ADME para a BR4Cl.

Pre-ADME									
Absorção		Distribuição			Metabolismo			Excreção	
AIH (%)	Caco-2 (nm/s)	MDCK (nm/s)	BHE (C_{brain}/C_{blood})	PPB (%)	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	CYP2C19	Gp-P
100	55,96	35,09	15,98	100	Inibitória	Não inibiu	Não inibiu	Inibitória	Inibitória

AIH: absorção intestinal humana; BHE: barreira hemato encefálica; CYPs: enzimas do citocromo P450; PPB: ligação às proteínas plasmáticas. Fonte: Dados obtidos no *software* Pre-ADMET.

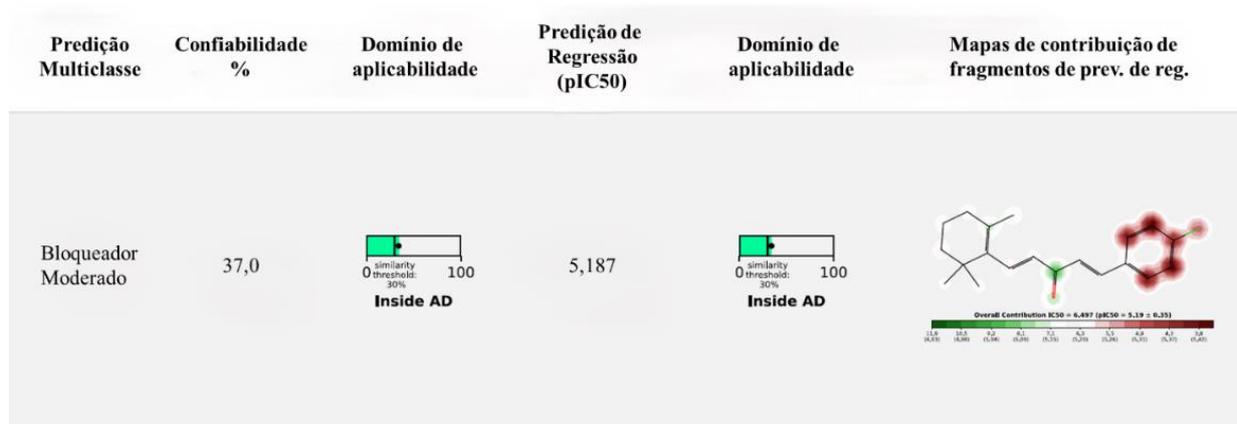
Quanto aos dados de toxicidade, demonstrados abaixo, é possível observar que a amostra testada é considerada mutagênica, por induzir a mutação de uma das cepas da bactéria. Já em relação à carcinogênese em camundongos e em ratos, a substância apresentou potencial carcinogênico para a primeira espécie, mas não apresentou o mesmo resultado na segunda. Quanto ao potencial de bloqueio dos canais hERG e consequente risco de cardiotoxicidade, a molécula apresentou risco moderado de inibição (tabela 7).

Tabela 7. Predição de toxicidade para a BR4Cl.

Toxicidade						hERG
Teste de Ames				Carcinogênese		
TA100_10LRI	TA100_NA	TA1535_TLRI	TA1535_NA	Camundongos	Ratos	Médio risco
Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	

10LRI – modelo de cepa de índice de regressão linear / NA – cepa sem ativação metabólica. Fonte: Dados obtidos no *software* pre-ADMET.

O *software* pred-hERG baseia-se na similaridade entre a estrutura da molécula pesquisada com estruturas já conhecidas e dispostas em bancos de dados. Segundo o *software*, a substância apresenta potencial moderado de cardiotoxicidade, corroborando com o resultado encontrado no *software* pre-ADMET, com confiabilidade de 37%. O mapa de probabilidades, fornecido pelo *website*, indica a influência de uma região da molécula com a cardiotoxicidade. Nesse sentido, as áreas marcadas em tons de vermelho não contribuem para o bloqueio dos canais hERG, enquanto as regiões em verde indicam a presença de um átomo ou fragmento molecular com maior contribuição para o bloqueio dos canais hERG. Vale ressaltar que, quanto mais intensa a cor, maior a probabilidade daquela região apresentar potencial cardiotoxíco (BRAGA, 2015).

Figura 9. Análise de bloqueio dos canais hERG para a BR4Cl

Fonte: Pred-HERG, 2024.

6 DISCUSSÃO

A ciência progride constantemente ao colaborar com a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer, visando criar métodos diagnósticos cada vez mais sensíveis, precisos e específicos, bem como tratamentos alternativos que combinem eficácia no combate à progressão tumoral e melhoria na qualidade de vida aos pacientes oncológicos (Debela *et al.*, 2021). Nesse sentido, pesquisadores de diversas linhas buscam o descobrimento de moléculas bioativas para melhorar a saúde humana e que sirvam como novas estratégias terapêuticas para esta patologia.

Assim como as chalconas, derivados de β -ionona possuem diversas atividades biológicas, incluindo atividade anticâncer (Ansari; Emami, 2016). O uso de híbridos de chalcona e β -ionona em estudos de potencial anticancerígeno tem sido alvo de estudos nos últimos anos, dado as capacidades promissoras que estas moléculas apresentam. A conjugação das duas estruturas em uma só molécula visa potencializar atividades primárias pré-selecionadas, como o potencial anticâncer, e formar um composto com atividade direcionada a múltiplos alvos atrelada a menor toxicidade. (Custodio *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a chalcona tipo terpenóide utilizada no presente estudo (BR4Cl) possui núcleos de β -ionona e chalcona, substituída por um átomo de cloro na posição *para* do anel arila da chalcona. Inicialmente, a molécula foi testada frente a várias linhagens celulares cancerosas e não cancerosas, com diferentes origens histológicas, visando avaliar a sua citotoxicidade e seletividade. A BR4Cl foi capaz de inibir o crescimento das linhagens celulares e apresentou atividade citotóxica significativa em algumas linhagens, principalmente contra HT-29, HCT-116^{P53} e HCT-116 ($CI_{50} < 10\mu M$), após 72 h de exposição. Esses dados corroboram com os resultados de Lima e colaboradores (2019), onde a BR4Cl apresentou valor de CI_{50} de 9,27 μM em HCT-116 após 72h de tratamento.

Um dos grandes problemas descritos na quimioterapia do câncer é a ocorrência dos seus efeitos colaterais. Esta modalidade de tratamento atua nas células cancerígenas, principalmente, devido a proliferação celular descontrolada. Com isso, a maioria dos agentes quimioterápicos age interrompendo direta ou indiretamente as vias de divisão celular, evitando que as células cancerosas cresçam e se multipliquem ainda mais. Entretanto, a alta dosagem e o tempo prolongado de tratamento ocasiona baixa seletividade dos fármacos por células tumorais, afetando também células saudáveis. Nesse sentido, os órgãos saudáveis mais afetados são

aqueles formados por células em divisão contínua, como pele, cabelo, trato gastrointestinal e células do sangue. Com isso, efeitos como erupções cutâneas, alopecia e mucosite são comuns em pacientes submetidos à quimioterapia (Anand *et al.*, 2023).

Apesar da baixa seletividade, os medicamentos quimioterápicos ainda são a opção terapêutica de escolha mais viável na grande maioria dos casos de câncer. Entretanto, torna-se necessário investigar se o composto teste é seletivo para células cancerosas e não citotóxico para células saudáveis (Duarte *et al.*, 2022). Assim, as linhagens MCF-10-A e L929 foram escolhidas para avaliar a citotoxicidade da BR4Cl frente a células não cancerosas. Ao comparar os valores de CI_{50} obtidos após o tratamento das células cancerosas e não cancerosas com a chalcona testada, foi observado que o perfil citotóxico da molécula é diferente dependendo da linhagem avaliada. Em células de câncer colorretal, o valor de CI_{50} foi de 8,58 μM após 72 h de tratamento, enquanto em células não cancerosas (MCF-10-A e L929) foi de 12,2 e 22,5 μM , respectivamente, apresentando índice de seletividade de 1,5 e 2,6, na mesma ordem. Esses resultados indicam que a seletividade de uma molécula depende da linhagem celular testada. É digno de nota que, valores de índice de seletividade iguais ou superiores a 2 são considerados significativos (Suffness; Pezzuto 1991).

A doxorubicina é um dos agentes quimioterápicos comumente utilizados (Kullenberg *et al.*, 2021) e serviu como controle positivo no presente trabalho. O fármaco padrão exibiu IS de 3,4 e 0,8, comparando as linhagens não cancerosas L929 e MCF-10-A, respectivamente, com a linhagem cancerosa HCT-116. Embora a BR4Cl tenha sido menos seletiva do que a doxorubicina para células HCT-116 em comparação com as células L929, notavelmente a molécula exibiu uma redução substancial da citotoxicidade nas células não cancerosas. Os resultados apresentados corroboram com o estudo de Araújo *et al.*, (2024), no qual um híbrido de chalcona-sulfonamida exibiu índice de seletividade, em 24h de tratamento, de 5,05, ao comparar células de melanoma metastático (B16-F10) com células L929. Em contrapartida, a doxorubicina apresentou, para as mesmas condições, índice de seletividade superior a 10. Ainda assim, os autores relatam o potencial anticancerígeno da molécula. Noutra instância, a BR4Cl foi duas vezes mais seletiva que a doxorubicina, para células HCT-116 em comparação às células MCF-10-A. Nossos dados corroboram com a literatura, em que mostra que a seletividade da doxorubicina pode variar de acordo com a linhagem celular testada (Marinho-Filho *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2013).

Diante dos resultados acima, a linhagem HCT-116 foi escolhida para dar continuidade aos estudos de mecanismo de ação citotóxico. Inicialmente, o perfil citotóxico da BR4Cl, em células HCT-116, foi avaliado em diferentes tempos de tratamento, utilizando o teste do MTT. Foi observado que a eficácia da amostra variou de acordo com o tempo de exposição, com valores de CI_{50} de 27,3; 17,4 e 8,58 μM , quando tratadas por 24, 48 ou 72 horas, respectivamente. Esses dados sugerem que o aumento no tempo de incubação, aumenta a eficácia do composto.

A estrutura química da molécula pode influenciar na sua citotoxicidade e seletividade. Nesse sentido, a inspeção dos valores de CI_{50} também permite relacionar a estrutura com a atividade do composto. Em muitos outros estudos relatados na literatura, moléculas de chalconas tipo terpenóides, chalconas à base de iononas ou mesmo derivados/híbridos de chalconas contendo cloro como substituinte halogênico apresentam efeito inibitório e citotóxico em diversas linhagens celulares cancerosas. Nota-se que, tanto a natureza dos grupos substituintes quanto a posição deles na molécula desempenham importante papel nesta relação. (Sharma *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014). Um átomo ou um grupamento substituinte é um modulador de atividade. O seu tamanho, quantidade, posição e eletronegatividade resultam em alterações distintas nas características físico-químicas dos compostos bioativos, podendo ser determinantes na atividade biológica (Huo *et al.*, 2024).

Mais precisamente, descobriu-se que a presença e a força de grupos removedores de elétrons no anel fenil de chalconas derivadas de β -ionona é decisiva para sua citotoxicidade (Sharma *et al.*, 2013). Neste estudo, 22 chalconas derivadas de β -ionona foram sintetizadas com diferentes substituintes, desde grupos doadores de elétrons a grupos aceptores, fracos e fortes, em diferentes posições na estrutura química. Os compostos foram testados contra várias linhagens celulares de câncer humano e verificou-se que os mais potentes apresentavam grupos fortemente aceptores de elétrons e, portanto, muito eletronegativos. Observou-se que, dos três compostos que continham cloro como radical substituinte, destacou-se a molécula substituída na posição *para*, com elevada citotoxicidade contra câncer de próstata (PC3) e mama (MCF-7), com CI_{50} de 9,5 μM e 10,2 μM , respectivamente.

Da mesma forma, dentre os híbridos de chalconas sintetizados no estudo de Lamie e Philoppes (2020), os compostos que apresentaram atividade citotóxica e inibitória mais potentes tinham em comum um anel fenil *para*-substituído com um grupo aceptor de elétrons (NO_2 ou Cl) no núcleo da pirimidina. Outrossim, Mphahlele *et al.*, (2024) sintetizaram uma

série de nitrochalconas, com estrutura geral comum e diferentes grupos adicionados na estrutura, inclusive o cloro, em um dos compostos. Foi observada atividade reduzida para o análogo substituído com cloro na posição *para*, contra a linhagem celular A549 ($CI_{50} = 34,69 \pm 0,19 \mu\text{M}$). Contudo, este mesmo composto exibiu atividade mais pronunciada contra a linhagem celular MCF-7 ($CI_{50} = 13,60 \pm 0,12 \mu\text{M}$), em comparação com o análogo contendo um átomo de flúor na mesma posição ($CI_{50} = 26,16 \pm 1,25 \mu\text{M}$). Isso mostra que a posição *para* foi mais atraente para o átomo de cloro que para o átomo de flúor. Em ambos os trabalhos, houve relação entre a presença de grupos doadores de elétrons ou aceptores de elétrons, e a atividade citotóxica nas diferentes linhagens celulares testadas. Com isso, verificou-se que o efeito biológico do átomo de cloro varia, não só de acordo com a posição na amostra, como também segundo a linhagem testada (Mphahlele *et al.*, 2024).

Descobriu-se anteriormente que a presença de um átomo de cloro em um anel fenil leva ao ligeiro aumento da lipofilicidade molecular e permeabilidade da membrana, impactando na absorção e distribuição dos compostos bioativos. Além disso, tal incorporação também polariza o anel fenil para resultar em interações não-ligantes aumentadas com grupos de proteínas no local de ligação do receptor, servindo também como um método eficaz para bloquear sítios metabólicos. Nesse sentido, halogênios pesados, como o cloro, podem formar ligações não covalentes com grupos nucleofílicos, enxofre ou anéis aromáticos, ligações estas que podem melhorar significativamente a afinidade de ligação (Mphahlele *et al.*, 2024; Huo *et al.*, 2024).

Há muito tempo se fala da introdução do átomo de cloro em posições específicas de moléculas bioativas como forma de melhorar substancialmente a atividade biológica. Embora este átomo possa diminuir a atividade biológica do composto, ele também pode ser crucial para uma atividade significativa, principalmente em compostos naturais ou advindos de síntese química. De tal forma, o cloro é um dos substituintes mais utilizados na química orgânica sintética e continua sendo importante para sondar relações de estrutura-atividade, a fim de fornecer soluções mais seguras, produtos mais seletivos e mais compatíveis com o meio ambiente (Naumann, 2000).

Aparentemente, a presença de bromo ou cloro diminui a atividade citotóxica das chalconas tipo terpenóides, quando estão situados na posição *para*. Em contrapartida, a porção nitro, em qualquer posição do anel aromático, é decisiva para a atividade antiproliferativa destas moléculas, uma vez que é mais fortemente eletronegativa. (Lima *et al.*, 2019). Entretanto, a busca por compostos que sejam, além de citotóxicos, seletivos, é importante na aplicação de

moléculas com potencial anticancerígeno, visto que a seletividade é um fator que pode implicar nos potenciais efeitos adversos ao organismo, como já observado para os quimioterápicos clinicamente disponíveis. No estudo de Ammaji *et al.* (2022), análogos de chalcona substituídos por cloro na composição estrutural, mostraram-se seletivos para células cancerosas e poderiam ser considerados como compostos seguros para passar para a próxima fase do ciclo de descoberta de medicamentos.

No estudo realizado por Mai e colaboradores (2014), foi sintetizada uma série de 46 chalconas substituídas, por halogênios ou grupos doadores de elétrons, no anel A ou no anel B da chalcona. Os compostos foram avaliados quanto à citotoxicidade, seletividade e relação estrutura-atividade. Os autores verificaram que a presença de um grupo aceptor de elétrons no anel B da chalcona é importante na determinação da potência e seletividade do composto testado. Vale ressaltar que as chalconas 23 e 32, substituídas com um átomo de cloro no anel B, foram classificadas como potentes e seletivas, o que permite inferir que este halogênio contribui para a atividade antiproliferativa das chalconas sintetizadas. Em contrapartida, a presença de dois ou mais grupos aceptores na molécula, embora seja compatível com a maior citotoxicidade do composto, não confere seletividade.

No estudo de Azambuja (2015), os compostos contendo grupos aceptores de elétrons, em especial flúor (3cj), cloro (3ck) e nitro (3ci), possuíram melhores taxas de inibição de crescimento das células tumorais. Embora o composto 3ci tenha maior atividade, ele foi menos seletivo. Alguns derivados de chalconas foram analisados quanto ao seu potencial bioativo no trabalho de Ramalho (2011). De forma geral, as substâncias 35 e 37 que apresentam, respectivamente, grupo nitro e Cl na posição *para* do anel B, possuíram elevado potencial de inibição e atividade citotóxica. O composto 37 apresentou maior atividade citotóxica, porém sem seletividade.

Isso pode ocorrer devido ao fato de o grupo nitro possuir eletronegatividade tanto do nitrogênio quanto dos átomos de oxigênio, ambos altamente eletronegativos, atuando tanto por efeito indutivo quanto por efeito ressonante em compostos orgânicos, influenciando na alta reatividade destes compostos (Szatyłowicz *et al.*, 2019). Levando isso em consideração, provavelmente, grupos com caráter fortemente retirador de elétrons com capacidade de ressonância, podem não ser tão interessantes como substituinte, visto que influenciam negativamente na atividade da molécula contra células normais. Isso dá mais espaço a átomos como o flúor e cloro, que, apesar de ter efeito um pouco menor, ainda sim são altamente

eletronegativos, reativos, fortes aceptores de elétrons, por efeito indutivo, sem apresentar ressonância, e potentes.

Embora os dados obtidos não sejam suficientes para conclusões mais sólidas acerca da relação estrutura-atividade, os resultados do presente trabalho, em consonância com os dados da literatura, revelam que, além das chalconas sintéticas terem potencial antitumoral, muitos compostos desta classe e derivados dela, como chalconas do tipo terpenóide, apresentam seletividade para células tumorais. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade e seletividade para a BR4Cl foram promissores e, por isso, resolveu-se investigar demais parâmetros para averiguar se são promissores para o desenvolvimento de um novo medicamento para combater o câncer.

O ensaio de hemólise avalia a ocorrência de ruptura das membranas dos eritrócitos após exposição a um composto teste, sendo, portanto, um medidor de toxicidade celular e de hemocompatibilidade da molécula (Ansari *et al.*, 2018; Mukherjee *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado que derivados de chalconas, de maneira geral, apresentam baixo potencial hemolítico. No entanto, as buscas nas bases de dados disponíveis para acesso na íntegra não relatam dados relativos a ensaios hemolíticos com chalconas tipo terpenóide, sendo este o primeiro estudo *in vitro*, até o momento, sobre a avaliação da natureza biocompatível da BR4Cl em eritrócitos humanos O+.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a BR4Cl não demonstrou potencial hemolítico na maior concentração avaliada (1.589 μM), corroborando com dados da literatura que expressam pouca ou nenhuma atividade hemolítica de derivados de chalconas em eritrócitos humanos ou de mamíferos. Por exemplo, Cuadrado e colaboradores (2024) verificaram que o derivado de chalcona (5) não possui efeito hemolítico em eritrócitos humanos em nenhuma das concentrações testadas, as quais variaram de 0,2 a 100 μM . No estudo de Nayak *et al.* (2023), o derivado DKO7, uma chalcona modificada pela adição de furano, reduziu a hemólise induzida pela hipotonicidade em diferentes doses (25, 50, 100 e 150 μM) e exibiu eficácia dependente da dose, reduzindo o potencial hemolítico após exposição das células à maior concentração (150 $\mu\text{mol/L}$), em mais de 80%.

Corroborando com os resultados gerais descritos na literatura, o derivado sintético LQFM064, relatado no estudo de Alonso e colaboradores (2020), apresentou atividade hemolítica muito baixa contra eritrócitos humanos, com um percentual de apenas 1,8% na maior concentração testada (10 mmol/L). Arif *et al.* (2020) verificaram que o derivado de chalcona

1b exibiu alta taxa de hemólise (92%) na maior concentração testada (1 mg/mL), entretanto, na concentração de 100 µg/mL, o composto exibiu um percentual de hemólise de apenas 4%. Por sua vez, na concentração de 25 µg/mL, o composto 1b mostrou-se completamente seguro, causando apenas 0,05% de lise celular. Ademais, o composto mostrou menos toxicidade do que o medicamento padrão ciprofloxacina até a concentração de 50 µg/mL.

No geral, pode-se perceber que os estudos verificaram certa dependência da porcentagem de lise em relação à concentração do composto teste, onde a ruptura dos eritrócitos é mais pronunciada em maiores concentrações. Dados os resultados do presente estudo, é importante notar que, apesar da ausência de efeito hemolítico em eritrócitos humanos, sugerir que a ação citotóxica não ocorre pelo rompimento direto da membrana celular, não indica, necessariamente, a segurança global das chalconas e seus derivados, sendo desejável avaliar outros efeitos potenciais destas moléculas em diferentes tipos de células ou tecidos.

O ensaio de pulso-concentração é um importante método que permite observar o início do efeito citotóxico da molécula sobre as células, a partir da diferença de metabolização do MTT. Além disso, pode-se prever a eficácia do tratamento pela análise da reversão, ou não, do efeito da molécula na viabilidade celular, após cessação da administração e restituição das condições habituais (Galzip *et al.*, 2010). Não há, na literatura, estudos que averiguem esta metodologia em chalconas tipo terpenóides.

Verificou-se que, em um tratamento de pulso da molécula por curtos períodos (3 e 6 horas), a molécula apresentou citotoxicidade análoga ao teste do MTT em 24h, reduzindo a viabilidade celular na mesma intensidade. Observou-se que a CI_{50} reduziu significativamente com o aumento do tempo de exposição, indicando que o tratamento com a BR4Cl apresenta um perfil tempo dependente. Isto leva a crer que a molécula foi internalizada pelas células, ao longo do tempo, e continua agindo, mesmo com a restituição das condições habituais. Do ponto de vista translacional, 6h de vida plasmática ou tempo de infusão de um fármaco é suficiente para alcançar um efeito terapêutico a longo prazo (Almeida *et al.*, 2019).

Diante dos resultados do ensaio de pulso-concentração, avaliou-se o perfil citotóxico da BR4Cl de forma mais direta pelo método de exclusão por azul de Tripán, após 24h de exposição à molécula teste. As células foram tratadas com concentrações baseadas no resultado do ensaio do MTT de 24h, sendo então utilizadas três concentrações diferentes, a saber: 30 µM, 15 µM e 7,5 µM, a fim de verificar o efeito de diferentes concentrações da molécula na viabilidade celular. Neste ensaio, a viabilidade celular foi avaliada pela integridade da membrana

plasmática. Nele, somente as células que possuem sua membrana não íntegra são invadidas pelo azul de Tripán e ficam coradas de azul, diferente das células íntegras (Strober, 2015).

Os resultados deste ensaio mostraram que houve diminuição da quantidade de células viáveis, em todas as concentrações testadas, proporcionalmente ao aumento da concentração. Na menor concentração, a redução das células viáveis foi apenas numérica e visual, sem significância estatística em relação ao controle negativo. Os resultados da maior concentração corroboram com os resultados do MTT, visto que essa concentração reduziu a quantidade de células viáveis em mais da metade. Além disso, a diminuição das células viáveis não acompanhou aumento de células não viáveis, em nenhuma das concentrações testadas.

Corroborando com os resultados aqui apresentados, Rao e colaboradores (2004) verificaram que o derivado de chalcona 2POCD reduziu a viabilidade de células cancerosas de várias origens histológicas. Entretanto, poucas células inviáveis foram detectadas pelo ensaio de exclusão por azul de Tripán. Tal informação contribuiu para o entendimento dos resultados obtidos na análise do ciclo celular, que indicou efeito de inibição da progressão do ciclo celular.

A fim de realizar análise morfológica, foi utilizado kit de coloração por panóptico rápido. Esta é uma coloração simples, constituída de corantes ácido e básico, que coram o núcleo e o citoplasma de maneira diferente, dada as suas propriedades químicas e afinidades. As proteínas e demais componentes citoplasmáticos possuem afinidade pelo corante ácido e são corados em tons de rosa, enquanto os componentes ácidos da célula (ácidos nucleicos, núcleo) possuem afinidade pelo corante básico e são corados em tons de azul/roxo. Através dessa coloração, é possível analisar morfológicamente as alterações causadas nas células pelas substâncias teste (Bednarczuk *et al.*, 2010).

Neste ensaio, as células expostas à menor concentração da amostra (7,5 μM), mantiveram-se semelhantes ao controle negativo. À medida que a concentração da BR4Cl aumentou, a densidade celular diminuiu e as células passaram a apresentar morfologia celular alterada, incluindo vacuolização e outras características celulares compatíveis com morte celular, sendo estas condições mais intensas na concentração de 30 μM .

Não há, na literatura, estudos que avaliem o tipo de morte celular provocado por chalconas tipo terpenóide. Entretanto, é sabido que, no geral, chalconas e seus derivados possuem citotoxicidade mediada pela indução de apoptose (Chen *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2018), geração de estresse oxidativo (Zhang *et al.*, 2017), regulação do gene p53 (Santos *et al.*, 2019), fragmentação de DNA e indução da despolarização da membrana mitocondrial

(Kubalkova *et al.*, 2009) ou, ainda, promoção de parada do ciclo celular na fase G2/M (Kello *et al.*, 2016). Da mesma forma, a β -ionona demonstra propriedades indutoras de apoptose, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Liu *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2012; Abu-Izneid *et al.*, 2020).

Os resultados da análise morfológica sugerem que a BR4Cl apresenta um perfil citotóxico diferente do que é encontrado na literatura para a maioria das chalconas e seus derivados, uma vez que o aparecimento de vacúolos no citoplasma das células é associado à morte celular autofágica (Galluzi *et al.*, 2017). Entretanto, Hou *et al.* (2023) verificaram que a β -ionona aumenta a autofagia. Da mesma forma, Champelovier *et al.*, 2013 observaram que a chalcona B induziu morte celular por autofagia, com acúmulo substancial de vacúolos, sem afetar a proliferação de células normais. He e colaboradores (2013) verificaram um efeito potente de metoxichalconas, através da ativação de uma via autofágica, em múltiplas linhagens celulares. Ademais, Zhang *et al.* (2018) relataram que uma chalcona sintética induziu vias de apoptose e autofagia nas linhagens celulares de leucemia humana (HEL) e K562. Nesse sentido, não existe um padrão de citotoxicidade para chalconas e seus derivados, e isto ressalta a necessidade de estudos subsequentes de mecanismo de ação, para melhores conclusões.

Visando verificar a possível indução de autofagia pela BR4Cl, realizou-se um ensaio de MTT, associando a amostra com um inibidor de autofagia (cloroquina), para avaliar a influência do inibidor na citotoxicidade da molécula.

A autofagia é uma via catabólica dependente de lisossomos, pela qual organelas danificadas ou senescentes são removidas (Li *et al.*, 2022). Todo o processo de autofagia, conhecido como fluxo autofágico, se inicia com a segregação do material citoplasmático por estruturas conhecidas como autofagossomos, os quais são responsáveis pela entrega da carga aos lisossomos, fundindo-se e formando autofagolisossomos (Qiu *et al.*, 2014). Isso promove a ativação das hidrolases lisossomais, que degradam a carga autofagossômica. O conteúdo da degradação é liberado no citosol, através de transportadores da membrana lisossomal, e são reciclados por circuitos anabólicos ou bioenergéticos, conferindo nutrição e energia para a manutenção da célula. A autofagia pode ser induzida em resposta a um amplo painel de estímulos, incluindo sinais nutricionais, de hipóxia, oxidativos (Kroemer *et al.*, 2010). Em cenários fisiológicos, o fluxo autofágico prossegue em níveis basais, mediando uma função homeostática (Galluzi *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao câncer, a autofagia pode atuar como um supressor de tumor, ao degradar organelas danificadas ou substâncias nocivas, suprimindo a propagação de danos,

como estresse oxidativo e instabilidade genômica. Mas, em contrapartida, ao facilitar a reciclagem intracelular, pode atuar fornecendo substratos necessários para o metabolismo das células cancerosas no microambiente tumoral (Lee *et al.*, 2023). As respostas autofágicas geralmente apoiam o crescimento e progressão de tumores estabelecidos, reduzindo a sensibilidade das células tumorais a estímulos que normalmente promoveriam a sua morte, como hipóxia e apoptose (Galluzi *et al.*, 2015). Entretanto, além desse efeito citoprotetor da autofagia desregulada, estudos indicam que a autofagia em excesso é capaz de acelerar a morte celular, em virtude de perturbações na homeostase (Galluzi *et al.*, 2017).

A maioria das bases fracas, como a cloroquina (CQ) e seus derivados, podem ser protonadas e acumular-se nos lisossomos, resultando na desacidificação dos seus lúmens, e conseqüentemente no bloqueio do fluxo autofágico. Foi demonstrado que a CQ é um inibidor tardio de autofagia, que bloqueia a fusão dos autofagossomos aos lisossomos e a subseqüente etapa de degradação, induzindo o acúmulo de autofagossomos (Qiu *et al.*, 2014). Como a CQ exibe efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo*, suprimindo a autofagia, ensaios clínicos são realizados constantemente combinando-a com medicamentos anticâncer (Qiu *et al.*, 2014; Ramirez *et al.*, 2020) .

O ensaio foi realizado com concentrações não citotóxicas de cloroquina (Ramirez *et al.*, 2020) e o resultado do ensaio de MTT mostrou que a associação da CQ com a BR4Cl diminuiu a atividade citotóxica da molécula, o que poderia indicar que a autofagia faz parte do processo de morte celular induzido pela BR4Cl. Nesse caso, a cloroquina, como bom inibidor de autofagia, estaria funcionando como barreira para a atividade do composto. Estes dados são sugestivos e, portanto, faz-se necessário a utilização de métodos de biologia molecular para elucidar os mecanismos subjacentes ao efeito observado. Entretanto, resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Ji *et al.*, (2017), em que a cloroquina reverteu significativamente os efeitos inibitórios da licoricidina (LCD), uma isoflavona natural, na viabilidade das células SW480, sugerindo que LCD promove citotoxicidade induzindo a morte celular autofágica.

Para compreender as ações benéficas ou adversas das substâncias no corpo humano, é preciso saber quanto da dose externa chegará aos locais de ação (dose interna) e em quanto tempo será eliminada do corpo. Absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) são as quatro etapas da farmacocinética que determinam a dose interna e a concentração nos locais-alvo do corpo. A letra T, refere-se à toxicidade na sigla (ADMET), e demonstra a ligação entre as propriedades do ADME e os resultados tóxicos (Raunio *et al.*, 2015). Estas determinações

ajudam a descrever e compreender a probabilidade de interação físico-química do composto teste com o alvo (Prabakaran *et al.*, 2022; Vasudha *et al.*, 2024). Dessa forma, a previsão das propriedades ADMET é crucial na fase inicial da descoberta e desenvolvimento de medicamentos para aumentar a eficácia e evitar falha tardia dos compostos candidatos ao uso clínico terapêutico (Faudzi *et al.*, 2020; Amin *et al.*, 2023; Hawas *et al.*, 2023).

A absorção de um fármaco, proposto para administração oral, depende do seu transporte através do trato gastrointestinal (TGI). A porcentagem de AIH indica o processo de absorção, pelo TGI, de medicamentos administrados via oral. Resultados na faixa de 0 a 20 indicam má absorção intestinal, de 20 a 70 indica absorção intestinal moderada e de 70 a 100 indica que o composto teve boa absorção intestinal (Bilkan *et al.*, 2024; Prabakaran *et al.*, 2022). As células Caco-2 são derivadas de adenocarcinoma de cólon humano, capazes de expressar aspectos de diferenciação característicos de células intestinais maduras, como microvilosidades e a presença de junções celulares, mimetizando a barreira epitelial intestinal. Dessa forma, são ótimos modelos para estudar a previsão da absorção e biodisponibilidade oral de novos compostos, permitindo verificar a permeabilidade intestinal e o transporte de drogas, uma vez que interagem em múltiplas vias de transporte farmacêutico, como transporte paracelular, transcelular e transporte ativo. Compostos com permeabilidade a Caco-2 menor que 4 nm/s, apresentam pouca permeabilidade e absorção, entre 4 e 70 nm/s, apresentam média absorção e maior que 70 nm/s são bastante permeáveis, sendo muito bem absorvidos pelo epitélio intestinal (Prabakaran *et al.*, 2022).

As células MDCK são células epiteliais polarizadas com junções estreitas desenvolvidas e bordas em escova. Elas são amplamente utilizadas para investigar a função epitelial e para avaliar a permeabilidade de medicamentos, auxiliando na previsão da absorção do medicamento através de uma barreira epitelial, como no intestino (Harwood *et al.*, 2023). Possuem vida útil menor que as células Caco-2, por isso, são consideradas uma boa ferramenta para triagem rápida de permeabilidade, onde os resultados correlacionam-se em alto grau com os resultados de Caco-2. Valores inferiores a 25 nm/s, indicam que a molécula possui baixa permeabilidade, valores entre 25 e 500 nm/s, indicam média permeabilidade e valores acima de 500nm/sec, indicam maior permeabilidade do composto (Wadapurkar *et al.*, 2018).

Para os parâmetros de absorção, os resultados indicam que a BR4Cl possui máxima absorção pelo TGI, com bons parâmetros de absorção por difusão passiva pelo epitélio intestinal e potencial intermediário de permeabilidade de membrana. Tais resultados refletem bom

potencial para administração oral e são particularmente importantes, uma vez que a absorção pelo intestino humano é a principal porta de entrada dos compostos para a corrente sanguínea, por onde chegarão até o seu órgão-alvo (Prabakaran *et al.*, 2022).

A barreira hematoencefálica é uma barreira fisiológica, constituída por células endoteliais fortemente ligadas, que protegem o cérebro de patógenos e toxinas transmitidos pelo sangue, nutre o tecido cerebral e interfere significativamente na entrada de drogas e outros compostos exógenos no sistema nervoso central (SNC) (Tan *et al.*, 2023; Prabakaran *et al.*, 2022). Os compostos com finalidade de atuar no SNC são as únicas substâncias que devem atravessar a barreira, enquanto medicamentos com alvos periféricos devem ter penetração mínima ou nula desta barreira (Tan *et al.*, 2023; Wadapurkar *et al.*, 2018). Sendo assim, a taxa de penetração da BHE prevê a capacidade de um composto penetrar a barreira e atingir o SNC. Compostos com taxa de penetração da BHE abaixo de 0,1 possuem pouca permeabilidade e absorção pelo cérebro, sendo inativo neste órgão; taxas entre 0,1 e 2,0 indicam que o composto possui média absorção pelo SNC e taxas acima de 2,0 indicam que o composto possui alta permeabilidade pela BHE e absorção pelo SNC (Prabakaran *et al.*, 2022). O resultado deste parâmetro, para a BR4Cl, foi de 15,98, indicando que a molécula tem capacidade de atravessar a BHE. Ou seja, pode cursar com efeitos secundários no SNC, assim como, pode ser um composto atuante em cânceres neurológicos.

A distribuição de um medicamento também é determinada pela ligação às proteínas plasmáticas, que está relacionada com a biodisponibilidade do medicamento, predizendo dados sobre distribuição, meia-vida e depuração. Refere-se à força da ligação do composto à albumina, proteína transportadora mais abundante no sangue. Como apenas moléculas livres interagem com os alvos terapêuticos, este dado auxilia na determinação da dosagem necessária para que o medicamento possa atingir o seu efeito biológico (Prabakaran *et al.*, 2022).

Para este parâmetro, os dados indicam que a BR4Cl possui forte capacidade de ligação às proteínas plasmáticas. Um medicamento ligado à albumina não é capaz de difundir-se passivamente através das barreiras fisiológicas para o tecido do órgão-alvo. Por isso, uma ligação forte à albumina (acima de 90%) impacta na menor ação do fármaco, além de poder causar problemas de segurança do medicamento, interações medicamentosas graves e efeitos adversos, incluindo baixa depuração. Por outro lado, a fraca interação proteica (abaixo de 90%) reduz a duração da ação do medicamento, uma vez que a ligação às proteínas plasmáticas confere maior meia-vida do medicamento, que é importante principalmente no seu transporte

até o órgão-alvo. Como as proteínas plasmáticas estão presentes em altas concentrações, mesmo interações fracas, em grande quantidade, podem causar diminuição na concentração livre do fármaco (Woziński *et al.*, 2024; Prabakaran *et al.*, 2022).

Os xenobióticos são submetidos a uma ou múltiplas vias enzimáticas para serem metabolizados e mais facilmente eliminados do corpo. De todas as enzimas metabolizadoras de xenobióticos, as enzimas do citocromo P450 são as mais importantes devido à sua abundância e versatilidade. Elas medeiam as reações do metabolismo de fase I e constituem uma grande superfamília de proteínas heme. Dentre as isoformas das CYPs, cerca de sete são responsáveis pelo metabolismo de quase 90% de todos os medicamentos (Raunio *et al.*, 2015).

Os resultados mostraram que a BR4Cl possui atividade inibitória nas enzimas CYP2C19 e CYP2C9. A capacidade de inibir as CYPs pode relacionar-se com propriedades físico-químicas do composto, uma vez que, quanto mais átomos aceitadores de hidrogênio, maior o potencial inibitório. Isto entra em concordância quando se observa a estrutura química da BR4Cl. Além disso, vale ressaltar que a inibição das CYPs pode levar a interações medicamentosas indesejadas e efeitos terapêuticos imprevisíveis, como aumento nas concentrações plasmáticas ou diminuição na eficiência do medicamento (Panikar *et al.*, 2021). Dados os resultados, estudos adicionais são exigidos para entender o mecanismo e a potência da inibição, visando mitigar potenciais problemas de interações medicamentosas, toxicidade e efeitos adversos, bem como possíveis ajustes de dose (Deb *et al.*, 2021; Adido *et al.*, 2023).

Em contrapartida, a molécula não é capaz de inibir as enzimas CYP2D6 e CYP3A4, sendo resultados que devem ser destacados. Essas enzimas podem promover um mecanismo compensatório de metabolização, pois, dependendo do status relativo das atividades das enzimas do CYP450, a CYP2D6 e a CYP3A4 podem contribuir em maior extensão para a metabolização da BR4Cl. Além disso, a informação de que a BR4Cl não inibe a enzima CYP3A4 é particularmente importante, pois esta é a mais abundante, e sua inibição seria desfavorável para um fármaco antitumoral (Deb *et al.*, 2021; Adido *et al.*, 2023). Segundo Hawas *et al.*, (2023), moléculas não inibidoras do CYP2D6, sugerem menor chance de interações medicamentosas.

Outro parâmetro importante, avaliado pelo perfil ADME, refere-se à excreção. É avaliado pela inibição ou não da glicoproteína P (gp-P), uma proteína de superfície celular, presente em diversos órgãos, como intestino, cérebro, fígado e rim. Tal glicoproteína está envolvida no efluxo xenobiótico, é amplamente associada a resistência a múltiplos

quimioterápicos contra o câncer e pode desempenhar um papel na depuração biliar e renal de medicamentos (Nisha *et al.*, 2016; Ranjbar *et al.*, 2023; Taskar *et al.*, 2022). O resultado deste parâmetro indica que a BR4Cl atua promovendo a inibição da gp-P, o que dificulta a sua excreção nos locais onde esta glicoproteína é expressa e, como consequência, favorece o acúmulo intracelular da molécula. A função de efluxo da gp-P é protetiva em células normais, especialmente na BHE, barreira intestinal e renal, e sua inibição pode tornar estas barreiras mais suscetíveis aos efeitos de substâncias tóxicas (Taskar *et al.*, 2022). Dada a origem histológica das células MDCK, elas também podem prever dados sobre a depuração renal e eliminação da molécula do organismo (Deb *et al.*, 2021). Avaliando estes dados em conjunto, pode-se inferir que a molécula tem permeabilidade por transporte passivo para ser excretada.

Os parâmetros de toxicidade da molécula foram avaliados segundo o teste de mutagenicidade de AMES, carcinogenicidade em ratos, carcinogenicidade em camundongos e inibição do gene h-ERG. O teste de AMES avalia a mutagenicidade da molécula em relação à cepas da bactéria *Salmonella typhimurim*, o qual analisa a reversão ou não de uma mutação que inibe o crescimento da bactéria em meio isento de histidina. Se a molécula causar reversão em pelo menos uma das cepas testadas, é considerada mutagênica (Dantas *et al.*, 2018). A avaliação do potencial carcinogênico foi realizada em ratos e camundongos, dadas as muitas vias biológicas e metabólicas semelhantes às dos seres humanos. Dessa forma, a BR4Cl apresentou-se mutagênica, por induzir a mutação de uma das cepas da bactéria. Segundo Buzun e colaboradores (2022), estes dados também podem sugerir possíveis interações do composto com o DNA das células cancerosas. Além disso, apresentou resultado negativo para o perfil de carcinogenicidade em ratos, entretanto, apresentou resultado positivo para a carcinogenicidade em camundongos, indicando ser uma substância com potencial de carcinogenicidade, sendo necessário ter cautela na administração

Ademais, a estrutura da BR4Cl foi avaliada quanto à sua capacidade de bloqueio dos canais de potássio hERG. Tais canais estão presentes em grande quantidade no tecido cardíaco e são essenciais para regular a atividade elétrica no coração humano, através da repolarização dos potenciais de ação nos cardiomiócitos. O bloqueio dos canais hERG, provocado por alguns fármacos, pode levar a reações tóxicas a este órgão (Chen *et al.*, 2023). Como resultado da avaliação da segurança cardíaca da BR4Cl, a substância apresentou médio risco, revelando que a BR4Cl pode conferir efeitos secundários no sistema cardíaco. A análise do mapa de

contribuição de fragmentos mostrou que o carbono e o oxigênio do grupamento carbonila parecem ser os principais responsáveis pelo potencial cardiotoxico da molécula.

No entanto, modificações estruturais da molécula poderiam melhorar as suas propriedades farmacocinéticas e reduzir os seus efeitos secundários. Dessa forma, as promissoras atividades anticancerígenas estariam melhoradas para estudos adicionais. Dadas as perspectivas de aplicação da BR4Cl no desenvolvimento de medicamentos, embora a molécula possua riscos de desenvolver efeitos secundários, os mesmos podem ser reduzidos, adicionando ou eliminando grupos e átomos específicos (Chen *et al.*, 2023; Lv *et al.*, 2021).

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a BR4Cl, um híbrido de chalcona e ionona, demonstrou atividade citotóxica significativa frente a diversas linhagens de células cancerosas, especialmente HCT-116. A amostra mostrou perfil seletivo para células cancerosas quando comparado a células não cancerosas, sugerindo um perfil de segurança favorável, reforçado pela ausência de potencial hemolítico nas concentrações testadas. Apesar de desafios em estudos *in silico*, como potencial cardiotoxicidade e mutagenicidade, a molécula se mostra promissora como agente anticancerígeno. Modificações estruturais podem melhorar suas propriedades farmacocinéticas e reduzir efeitos adversos. Ademais, estudos adicionais são necessários para elucidar completamente seus mecanismos de ação e potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. C. *et al.* Pradimicin-IRD exhibits antineoplastic effects by inducing DNA damage in colon cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 168, p. 38-47, 2019.
- analytical chemistry, v. 50, n. 12, 2022.
- AMMAJI, S. *et al.* Antitubercular and antioxidant activities of hydroxy and chloro substituted chalcone analogues: Synthesis, biological and computational studies. **Arabian journal of chemistry**, v. 15, n. 2, p. 103581, 2022.
- AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347-64, 1975.
- AMIN, M. M. *et al.* Design, synthesis, cytotoxic activities, and molecular docking of chalcone hybrids bearing 8-hydroxyquinoline moiety with dual tubulin/EGFR kinase inhibition. **Bioorganic chemistry**, v. 134, n. 106444, p. 106444, 2023.
- ANAND, U. *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes & diseases**, v. 10, n. 4, p. 1367–1401, 2023.
- ANSARI, M.; EMAMI, S. β -Ionone and its analogs as promising anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 123, p. 141–154, 2016.
- ANSARI, A. *et al.* Facile one-pot multicomponent synthesis and molecular docking studies of steroidal oxazole/thiazole derivatives with effective antimicrobial, antibiofilm and hemolytic properties. **Steroids**, v. 134, p. 22–36, 2018.
- AOKI, N. *et al.* C-geranylated chalcones from the stems of *Angelica keiskei* with superoxide-scavenging activity. **Journal of natural products**, v. 71, n. 7, p. 1308–1310, 2008.
- ARAÚJO, G. S. DE *et al.* Sulfonamide-chalcone hybrid compound suppresses cellular adhesion and migration: Experimental and computational insight. **Chemico-biological interactions**, v. 398, n. 111115, p. 111115, 2024.
- ARIF, R. *et al.* Facile synthesis of chalcone derivatives as antibacterial agents: Synthesis, DNA binding, molecular docking, DFT and antioxidant studies. **Journal of molecular structure**, v. 1208, n. 127905, p. 127905, 2020.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 2^a ed., Artmed, 2008.

- BEDNARCZUK, V. O. *et al.* Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.44, 2010.
- BERRIDGE, M. V. *et al.* The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, n. 1, p. 14-19, 1996.
- BRAGA, R. C. *et al.* Pred-hERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity. **Molecular informatics**, v. 34, n. 10, p. 698-701.
- BILKAN, M. T. *et al.* Synthesis, spectroscopic analysis, quantum chemical calculations and in silico biological activity studies of a new series of 8-aryl xanthine. **Journal of molecular structure**, v. 1302, n. 137485, p. 137485, 2024.
- BUŁAKOWSKA, A. *et al.* New chalcone derivatives containing 2,4 di-chloro-benzene-sulfonamide moiety with anticancer and antioxidant properties. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 1, p. 274, 2023.
- BURMAOGLU, S. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel bischalcone derivatives as potential anticancer agents. **Bioorganic chemistry**, v. 111, n. 104882, p. 104882, 2021.
- BUZUN, K. *et al.* 2-5-[(Z,2Z)-2-Chloro-3-(4-nitrophenyl)-2-propenylidene]-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl-3-methylbutanoic Acid as a Potential Anti-Breast Cancer Molecule. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 8, p. 4091, 2022.
- CARDOSO, M. F. C. *et al.* A new approach for the synthesis of 3-substituted cytotoxic nor- β -lapachones. **J Braz Chem Soc**, v. 24, n. 1, p. 12-16, 2013.
- CELIÀ-TERRASSA, T.; KANG, Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. **Genes & development**, v. 30, n. 8, p. 892-908, 2016.
- CHAMPELOVIER, P. *et al.* Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 27, n. 8, p. 2305–2315, 2013.
- CHEN, M. *et al.* Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 12, p. 2550–2556, 1993.
- CHEN, X.; GU, J.; WU, Y.; LIANG, P.; SHEN, M.; XI, J.; QIN, J. Clinical characteristics of colorectal cancer patients and anti-neoplasm activity of genistein. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 124, 2020.

- CHEN, Y.-F. *et al.* In vitro and in silico biological studies of 4-phenyl-2-quinolone (4-PQ) derivatives as anticancer agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 2, p. 555, 2023.
- CHENG, P. *et al.* Chalcone hybrids and their antimalarial activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 4, 2020.
- CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N. Anticancer activity of natural and synthetic chalcones. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11306, 2021.
- DARWICHE, N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 7, p. 1954–1978, 2020.
- CUSTODIO, J. M. F. *et al.* Alternative mechanisms of action for the apoptotic activity of terpenoid-like chalcone derivatives. **New journal of chemistry**, v. 45, n. 34, p. 15267–15279, 2021.
- DHALIWAL, J. S. *et al.* Pharmacotherapeutics applications and chemistry of chalcone derivatives. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 20, p. 7062, 2022.
- DEB, S. *et al.* ADME and pharmacokinetic properties of remdesivir: Its drug interaction potential. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 7, p. 655, 2021.
- DEBELA, D. T. *et al.* New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. **SAGE open medicine**, v. 9, p. 205031212110343, 2021.
- DE MELLO, M. V. P. *et al.* A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 150, p. 920–929, 2018.
- DIAS, T. A. *et al.* Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin. **European journal of medicinal chemistry**, v. 65, p. 500–510, 2013.
- DOMINIAK, A., *et al.* Communication in the cancer microenvironment as a target for therapeutic interventions. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1232, 2020.
- DONG, N. *et al.* Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 195-203, 2018.
- EDENHARDER, R.; VON PETERSDORFF, I.; RAUSCHER, R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylnidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. **Mutation research**, v. 287, n. 2, p. 261–274, 1993.
- ER-JARY, M., *et al.* QSAR, molecular docking, ADMET properties in silico studies for a

- series of 7-propanamide benzoxaboroles as potent anti-cancer agents. **Chinese journal of analytical chemistry**, v. 50, n. 12, 2022.
- FALLON ADIDO, H. E. *et al.* In silico studies on cytotoxicity and antitumoral activity of acetogenins from *Annona muricata* L. **Frontiers in chemistry**, v. 11, 2023.
- FEITELSON, M. A. *et al.* Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in cancer biology*, v. 35 Suppl, p. S25–S54, 2015.
- FINDIK, E. *et al.* Synthesis of terpenoid-like bischalcones from α - and β -ionones and their biological activities. **Synthetic communications**, v. 39, n. 24, p. 4362–4374, 2009.
- FOUAD, Y.A., AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res.**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036. 2017.
- GALLUZZI, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO journal**, v. 34, n. 7, p. 856–880, 2015.
- GALLUZZI, L. *et al.* Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 16, n. 7, p. 487–511, 2017.
- GALZI, J.-L. *et al.* Neutralizing endogenous chemokines with small molecules. **Pharmacology & therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 39–55, 2010.
- GAO, F.; HUANG, G.; XIAO, J. Chalcone hybrids as potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship. **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 5, p. 2049–2084, 2020.
- GEORGE, G. *et al.* Structural modifications on chalcone framework for developing new class of cholinesterase inhibitors. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 6, p. 3121, 2022.
- GOMES, M. *et al.* Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 8, p. 1210, 2017.
- GUO, M. *et al.* Research advances on anti-cancer natural products. **Frontiers in oncology**, v. 12, 2022.
- HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

- HARWOOD, M. D. *et al.* Interlaboratory variability in the madin–Darby canine kidney cell proteome. **Molecular pharmaceuticals**, v. 20, n. 7, p. 3505–3518, 2023.
- HAWAS, S. S. *et al.* New 2-alkoxycyanopyridine derivatives as inhibitors of EGFR, HER2, and DHFR: Synthesis, anticancer evaluation, and molecular modeling studies. **Bioorganic chemistry**, v. 141, n. 106874, p. 106874, 2023.
- HE, W. *et al.* A JNK-mediated autophagy pathway that triggers c-IAP degradation and necroptosis for anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 33, n. 23, p. 3004–3013, 2014.
- HERENCIA, F. *et al.* Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages. *FEBS letters*, v. 453, n. 1–2, p. 129–134, 1999.
- HOU, T. *et al.* β -Ionone represses renal cell carcinoma progression through activating LKB1/AMPK-triggered autophagy. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, v. 37, n. 6, 2023.
- HUO, T. *et al.* Late-stage modification of bioactive compounds: Improving druggability through efficient molecular editing. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, v. 14, n. 3, p. 1030–1076, 2024.
- INAMI, K. *et al.* Antimutagenic components in *Glycyrrhiza* against *N*-methyl-*N*-nitrosourea in the Ames assay. *Natural Product Research*, v. 31, n. 6, p. 691–695, 2017.
- JAMASBI, E. *et al.* The cell cycle, cancer development and therapy. **Molecular biology reports**, v. 49, n. 11, p. 10875–10883, 2022.
- JANDIAL, D. D. *et al.* Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones. **Current cancer drug targets**, v. 14, n. 2, p. 181–200, 2014.
- JI, S. *et al.* Licoricidin inhibits the growth of SW480 human colorectal adenocarcinoma cells in vitro and in vivo by inducing cycle arrest, apoptosis and autophagy. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 326, p. 25–33, 2017.
- JONES, S. *et al.* B-ionone induces cell cycle arrest and apoptosis in human prostate tumor cells. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 4, p. 600–610, 2013.
- KIMURA, Y.; BABA, K. Antitumor and antimetastatic activities of *Angelica keiskei* roots, part 1: Isolation of an active substance, xanthoangelol. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 106, n. 3, p. 429–437, 2003.
- KROEMER, G.; MARIÑO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, v. 40, n. 2, p. 280–293, 2010.

KULLENBERG, F. et al. In vitro cell toxicity and intracellular uptake of doxorubicin exposed as a solution or liposomes: Implications for treatment of hepatocellular carcinoma. *Cells* (Basel, Switzerland), v. 10, n. 7, p. 1717, 2021.

KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, O.; SIVAS, H. Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. In: *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. **Academic Press**, p. 271-297, 2017.

L. Aloum, E. Alefishat, A. Adem and G. Petroianu, Ionone Is More than a Violet's Fragrance: A Review, **Molecules**, 2020, 25(24), E5822, DOI: 10.3390/molecules25245822

LAMIE, P. F.; PHILOPPES, J. N. 2-Thiopyrimidine/chalcone hybrids: design, synthesis, ADMET prediction, and anticancer evaluation as STAT3/STAT5a inhibitors. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 35, n. 1, p. 864–879, 2020.

LEE, S. *et al.* Unraveling the intricacies of autophagy and mitophagy: Implications in cancer biology. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 23, p. 2742, 2023.

LEI, S. *et al.* The preclinical analysis of TW-37 as a potential anti-colorectal cancer cell agent. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0184501, 2017.

LEMES, S. R. *et al.* Optical properties and antiangiogenic activity of a chalcone derivate. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 204, p. 685–695, 2018.

LI, J. *et al.* Isoalantolactone induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy in colorectal cancer cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, 2022.

LI, Z. *et al.* Synthesis and biological evaluation of bis-chalcone conjugates containing lysine linker as potential anticancer agents. **Journal of molecular structure**, v. 1288, n. 135785, p. 135785, 2023.

LIARGKOVA, T. *et al.* Simple chalcones and bis-chalcones ethers as possible pleiotropic agents. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 2, p. 302–313, 2016.

LIMA, L.M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Quim Nova.**, v.30, n.6, p.1456-68, 2007.

LIMA, R. S. *et al.* Structure and cytotoxic activity of terpenoid-like chalcones. **Arabian journal of chemistry**, v. 12, n. 8, p. 3890–3901, 2019.

- LIU, Qian *et al.* Apoptosis initiation of β -ionone in SGC-7901 gastric carcinoma cancer cells via a PI3K-AKT pathway. **Archives of toxicology**, v. 87, p. 481-490, 2013.
- LIU, C.-Y. *et al.* Constitutive cytomorphologic features of medullary thyroid carcinoma using different staining methods. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 8, p. 1396, 2021.
- LV, X. *et al.* Computational study on novel natural inhibitors targeting BCL2. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 38, n. 8, 2021.
- MAI, C. W. *et al.* Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure–activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. **European journal of medicinal chemistry**, v. 77, p. 378–387, 2014.
- MANOEL, D. S. *et al.* Second- and third-order nonlinear optical properties of mono-substituted terpenoid-like chalcones. **Journal of photochemistry and photobiology. A, Chemistry**, v. 429, n. 113898, p. 113898, 2022.
- MARCHESI, E.; PERRONE, D.; NAVACCHIA, M. L. Molecular hybridization as a strategy for developing artemisinin-derived anticancer candidates. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 9, p. 2185, 2023.
- MARINHO-FILHO, J. D. B. *et al.* Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico-biological interactions**, v. 183, n. 3, p. 369–379, 2010.
- M.D. RIZVI, S. *et al.* The flavonoid hesperidin methyl chalcone as a potential therapeutic agent for cancer therapy: Molecular docking, *in vitro* cytotoxicity, and *in vivo* antitumor activity. **Arabian journal of chemistry**, v. 16, n. 6, p. 104769, 2023.
- MICHALKOVA, R. *et al.* Chalcones and gastrointestinal cancers: Experimental evidence. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 6, 2023.
- MIZUNO, C. S. *et al.* Synthesis and biological evaluation of retinoid-chalcones as inhibitors of colon cancer cell growth. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 24, p. 7385–7387, 2010.
- MO, H.; ELSON, C. E. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and Murine tumor cells are initiated by isoprenoids. **The journal of nutrition**, v. 129, n. 4, p. 804–813, 1999.
- MOHD FAUDZI, S. M. *et al.* Inhibition of nitric oxide and prostaglandin E2 production by pyrrolylated-chalcones: Synthesis, biological activity, crystal structure analysis, and molecular docking studies. **Bioorganic chemistry**, v. 94, n. 103376, p. 103376, 2020.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 55- 63. 1983.
- MPHAHLELE, M. J. *et al.* Design, synthesis and evaluation of the 2'-hydroxy-3'-iodo-5'-nitrochalcones for cytotoxicity (MCF-7 & A549) and potential to inhibit tyrosine kinase (VEGFR-2) activity. **Journal of molecular structure**, v. 1305, n. 137785, p. 137785, 2024.
- MOTANI, K. *et al.* Proteomic analysis of apoptosis induced by xanthoangelol, a major constituent of *Angelica keiskei*, in neuroblastoma. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 4, p. 618–626, 2008.
- MUKHERJEE, A. *et al.* Molecular recognition of synthesized halogenated chalcone by calf thymus DNA through multispectroscopic studies and analysis the anti-cancer, anti-bacterial activity of the compounds. **Journal of molecular liquids**, v. 337, n. 116504, p. 116504, 2021.
- NAUMANN, K. Influence of chlorine substituents on biological activity of chemicals: a review. **Pest management science**, v. 56, n. 1, p. 3–21, 2000.
- NAYAK, S. P. R. R. *et al.* Furan based synthetic chalcone derivative functions against gut inflammation and oxidative stress demonstrated in in-vivo zebrafish model. **European journal of pharmacology**, v. 957, n. 175994, p. 175994, 2023.
- NICULESCU, A.-G.; GRUMEZESCU, A. M. Novel tumor-targeting nanoparticles for cancer treatment—A review. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 9, p. 5253, 2022.
- NISHA, C. M. *et al.* Docking and ADMET prediction of few GSK-3 inhibitors divulges 6-bromoindirubin-3-oxime as a potential inhibitor. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 65, p. 100–107, 2016.
- OLIVEIRA, C. DOS R. *et al.* Novos sistemas de delivery, uso tecnológico e reposicionamento da cloroquina e hidroxicloroquina: Uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29910716589, 2021.
- ORLIKOVA, B. *et al.* Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes & nutrition**, v. 6, n. 2, p. 125–147, 2011.
- ORLIKOVA, B. *et al.* Methylenedioxy flavonoids: Assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **European journal of medicinal chemistry**, v. 84, p. 173–180, 2014.
- OUYANG, Y. *et al.* Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 894, 2021.

- PANIKAR, S. *et al.* Essential oils as an effective alternative for the treatment of COVID-19: Molecular interaction analysis of protease (Mpro) with pharmacokinetics and toxicological properties. **Journal of infection and public health**, v. 14, n. 5, p. 601–610, 2021.
- PEREIRA, R. *et al.* Bis-chalcones: A review of synthetic methodologies and anti-inflammatory effects. **European journal of medicinal chemistry**, v. 252, n. 115280, p. 115280, 2023.
- PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 93, p. 52–79, 2015.
- POLO-CUADRADO, E. *et al.* Nonlinear optical and spectroscopic properties, thermal analysis, and hemolytic capacity evaluation of quinoline-1,3-benzodioxole chalcone. **RSC advances**, v. 14, n. 15, p. 10199–10208, 2024.
- PRABAKARAN, G.; MANIVARMAN, S.; BHARANIDHARAN, M. Catalytic synthesis, ADMET, QSAR and molecular modeling studies of novel chalcone derivatives as highly potent antioxidant agents. **Materials today: proceedings**, v. 48, p. 400–408, 2022.
- QIU, W. *et al.* Tetrandrine blocks autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in cancer cells. **Cell death & disease**, v. 5, n. 3, p. e1123–e1123, 2014.
- QUELEMES, P.V., *et al.* Quartenized cashew gum: an anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polimers**. 157, 567-575, 2017.
- RAKAZ, N. A., *et al.* Cytotoxicity of eupatorine in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.
- RAMALHO, S. D. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DE DERIVADOS DE CHALCONAS**. [s.l.] Universidade Estadual de Goiás, 2011.
- RANJBAR, S. *et al.* 5-Oxohexahydroquinolines bearing 4-pyridyl methyl carboxylate as P-glycoprotein inhibitors and multidrug resistance reversal agents in cancer cells. **Journal of molecular structure**, v. 1285, n. 135427, p. 135427, 2023.
- RAO, Y. K.; FANG, S.-H.; TZENG, Y.-M. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 10, p. 2679–2686, 2004.

- RAUNIO, H. *et al.* Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, 2015.
- RAYAN, Anwar; RAIYN, Jamal; FALAH, Mizied. Nature is the best source of anticancer drugs: indexing natural products for their anticancer bioactivity. **Plos One**, v. 12, n. 11, p. 1-12, 9 nov. 2017.
- ROMA-RODRIGUES, C. *et al.* Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 840, 2019.
- SALLUM, L. O. **ANÁLISE ESTRUTURAL E TEÓRICA DE DERIVADOS DE CHALCONAS COM ATIVIDADE BIOLÓGICA E PROPRIEDADES TÉRMICAS**. Anápolis, GO: Universidade Estadual de Goiás, 2021.
- SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Quím. Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.
- SEM WAL, D. K. *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Boehmeria rugulosa* with antidiabetic and antimicrobial activities. **Journal of Asian natural products research**, v. 11, n. 12, p. 1045–1055, 2009.
- SHAO, X. *et al.* Diprenylated flavonoids from licorice induce death of SW480 colorectal cancer cells by promoting autophagy: Activities of lupalbigenin and 6,8-diprenylgenistein. **Journal of ethnopharmacology**, v. 296, n. 115488, p. 115488, 2022.
- SHARMA, V. *et al.* β -Ionone derived chalcones as potent antiproliferative agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 69, p. 310–315, 2013.
- SHARMA, U. K. *et al.* Facile synthesis of vanillin-based novel bischalcones identifies one that induces apoptosis and displays synergy with Artemisinin in killing chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 155, p. 623–638, 2018.
- SILVA, M. C. **Análise estrutural e topológica dos flavonóides epicatequina e chalcona terpenóide**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS, 2021.
- SILVA, S.J. **Síntese de análogos de chalconas do tipo retinóide com potencial atividade biológica**. [s.l.] Universidade Estadual de Goiás, 2008.
- SINGH, A. K. *et al.* Concept of hybrid drugs and recent advancements in anticancer hybrids. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 9, p. 1071, 2022.

- SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 85, p. 758–777, 2014.
- SINGHAL, S. S. *et al.* Recent advancement in breast cancer research: Insights from model organisms-mouse models to zebrafish. **Cancers**, v. 15, n. 11, 2023.
- SOUSA C. J. P., UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS. Disponível em: <
https://www.bdt.d.ueg.br/bitstream/tede/625/2/Paulo_de_S._Carvalho_Jnior.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2024.
- STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan, 2015.
- Suffness M, Pezzuto JM. Assays for Bioactivity. In *Methods in Plant Biochemistry*. K. Hostettmann (Editor). **London Academic Press**; 1991
- SZATYLOWICZ, H.; JEZUITA, A.; KRYGOWSKI, T. M. On the relations between aromaticity and substituent effect. **Structural chemistry**, v. 30, n. 5, p. 1529–1548, 2019.
- SZUMILAK, M.; WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; STANCZAK, A. Hybrid drugs—A strategy for overcoming anticancer drug resistance? **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 9, p. 2601, 2021.
- TAKAC, P.; KELLO, M.; PILATOVA, M.; B.; KUDLICKOVA, Z.; VILKOVA, M.; SLEPICKOVA, P.; PETIK, P.; MOJZIS, J. New chalcone derivative exhibits antiproliferative potential by inducing G2/M cell cycle arrest, mitochondrial-mediated apoptosis and modulation of MAPK signalling pathway. **Chemico-Biological Interactions**. v. 292, p. 37-49, 2018.
- TANG, S. *et al.* Isoangustone A induces autophagic cell death in colorectal cancer cells by activating AMPK signaling. **Fitoterapia**, v. 152, n. 104935, p. 104935, 2021.
- TASKAR, K. S. *et al.* Clinical relevance of hepatic and renal P-gp/BCRP inhibition of drugs: An International Transporter Consortium perspective. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 112, n. 3, p. 573–592, 2022.
- TORRY, D. S.; COOPER, G. M. Proto-oncogenes in development and cancer. **American journal of reproductive immunology**, v. 25, n. 3, p. 129–132, 1991.
- VALENTE, P. M., *et al.* Vincristina: Perfil farmacológico e história e perspectiva. Passado, presente e futuro. **International Journal of Development Research**, v. 12, n.06, p. 5707-57011, Jun. 2022.

- VAN TRAN, T. T.; TAYARA, H.; CHONG, K. T. Recent studies of artificial intelligence on in silico drug distribution prediction. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 3, p. 1815, 2023.
- VASUDHA, D. *et al.* Development of orally active anti-inflammatory agents: *In vivo* and in silico analysis of naphthalene-chalcone derivatives based on 2-acetyl-6-methoxy naphthalene. **Chemical Physics Impact**, v. 8, n. 100472, p. 100472, 2024.
- VIJAYA B. REDDY, M. *et al.* Bis-chalcone analogues as potent NO production inhibitors and as cytotoxic agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 1, p. 97–103, 2012.
- VOGEL, S.; HEILMANN, J. Synthesis, cytotoxicity, and antioxidative activity of minor prenylated chalcones from *Humulus lupulus*. **Journal of natural products**, v. 71, n. 7, p. 1237–1241, 2008.
- WADAPURKAR, R. M. *et al.* In silico drug design for Staphylococcus aureus and development of host-pathogen interaction network. **Informatics in medicine unlocked**, v. 10, p. 58–70, 2018.
- WOZIN'SKI, M. *et al.* Modification of gradient HPLC method for determination of small molecules' affinity to human serum albumin under column safety conditions: Robustness and chemometrics study. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 239, n. 115916, p. 115916, 2024.
- XIAO, Y.; YU, D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. **Pharmacology & therapeutics**, v. 221, n. 107753, p. 107753, 2021.
- Xu J, Yang KC, Go NE, Colborne S, Ho CJ, Hosseini-Beheshti E, Lystad AH, Simonsen A, Guns ET, Morin GB, Gorski SM. Chloroquine treatment induces secretion of autophagy-related proteins and inclusion of Atg8-family proteins in distinct extracellular vesicle populations. **Autophagy**. 2022 Nov;18(11):2547-2560.
- YADAV, V. R. *et al.* The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 295–309, 2011.
- YAMAMOTO, T. *et al.* Antiallergic activity of the naringenin chalcone from a tomato peel extract. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, p. 1706–1711, 2004.
- ZHANG, S. *et al.* A novel chalcone derivative S17 induces apoptosis through ROS dependent DR5 up-regulation in gastric cancer cells. **Scientific Reports**. n. 7, 2017.

ZHANG, W. *et al.* Remodeling tumor microenvironment with natural products to overcome drug resistance. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 1051998, 2022.

ZHANG, Y.-Q. *et al.* A novel synthesized 3', 5'-diprenylated chalcone mediates the proliferation of human leukemia cells by regulating apoptosis and autophagy pathways. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 106, p. 794–804, 2018.

ZHOU, B.; XING, C. Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 8, p. 388–404, 2015.

ZHOU, J. *et al.* Syntheses and potential anti-prostate cancer activities of ionone-based chalcones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 4, p. 1183–1186, 2009.

ZHUANG, C. *et al.* Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
DELTA DO PARNAÍBA -
UFDPAR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE HEMOLÍTICA DE BISCHALCONAS SINTÉTICAS DO TIPO RETINÓIDES

Pesquisador: ANA JERSIA ARAUJO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 53029321.3.0000.0192

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAIBA - UFDPAR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.195.003

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE HEMOLÍTICA DE BISCHALCONAS SINTÉTICAS DO TIPO RETINÓIDES", sob coordenação da Profa. Ana Jérsia Araújo e assistência em pesquisa do acadêmico Dakson Douglas Araújo. Segundo apresentado no projeto, a obtenção de novas substâncias, particularmente aquelas que podem apresentar atividade biológica tem grande interesse econômico e social. A indústria farmacêutica baseada na pesquisa vem empregando cada vez mais métodos modernos de síntese química bem como modelagem molecular como ferramentas promissoras para síntese de novas moléculas com diferentes atividades biológicas.

Dessa forma, a síntese de novos compostos com propriedades ativas é promissor devido suas atuações nas mais diferentes patologias humanas. Nesse sentido, quando ocorre a síntese de uma molécula nova tem-se a necessidade de estudos mais aprofundados quanto a relação estrutura-atividade, e, conhecimentos relacionados a farmacodinâmica bem como farmacocinética.

Nesse contexto de síntese de novas moléculas, foram desenvolvidas três novas moléculas de Bischalconas do Tipo Retinóides denominadas BR4CL, BR4BR e BR4NO2 como objetos de avaliação em diferentes áreas. Contudo, dentre os ensaios a serem desenvolvidos torna-se importante a investigação da atividade da capacidade hemolítica dessas moléculas em eritrócitos humanos para traçar um perfil de segurança e biocompatibilidade.

Endereço: Av. SAO SEBASTIAO 2819, Setor II, Bloco 3, Pavimento 3º, Lado Oeste, Sala 01

Bairro: NOSSA SENHORA DE FATIMA **CEP:** 64.202-020

UF: PI **Município:** PARNAIBA

Telefone: (86)3323-5125

E-mail: cep.ufdpar@ufpi.edu.br