



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
DEPARTAMENTO DO CURSO DE MEDICINA**

WILLIAM CATALDO TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE BIS-CHALCONAS
SINTÉTICAS (L05 E L08) EM LINHAGENS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS**

PARNAÍBA

2024

WILLIAM CATALDO TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE BIS-CHALCONAS SINTÉTICAS
(L05 E L08) EM LINHAGENS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de Medicina da Universidade Federal do Delta do Parnaíba como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho.

PARNAÍBA

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

T266a Teixeira, William Cataldo
Avaliação do efeito antiproliferativo de bis-chalconas sintéticas (L05 e L08) em linhagens tumorais e não tumorais [recurso eletrônico] / William Cataldo Teixeira. – 2024.
57 p.
TCC (Bacharelado em Medicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2024.
Orientação: Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho.
1. Anticâncer. 2. Bis-chalconas. 3. Citotoxicidade. 4. Morte celular. 5. Viabilidade celular. I. Marinho Filho, José Delano Barreto. II. Título.

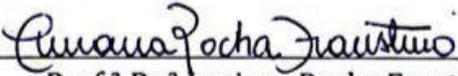
CDD: 610

ATA DE DEFESA DO PROJETO DE PESQUISA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao(s) 12 dia(s) do mês de Novembro de 2024, às 15h30min, em sessão pública na sala 284 da UFDPAr, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Prof.^o Dr.^o José Delano Barreto Marinho Filho e compostas pelos examinadores: (1) Prof.^a Dr.^a Luciana Rocha Faustino e 2) Prof.^o Me. Fabrício dos Santos Machado, o(a) aluno(a) William Cataldo Teixeira apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Medicina da UFDPAr-CMRV intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE BIS-CHALCONAS SINTÉTICAS (L05 E L08) EM LINHAGENS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS" como requisito curricular indispensável à integralização do curso. A Banca Examinadora após reunião em sessão reservada deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido Trabalho de Conclusão de Curso, divulgando o resultado formalmente ao(a) aluno(a) e aos demais presentes, e eu na qualidade de presidente da Banca lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo(a) aluno(a) orientado(a).



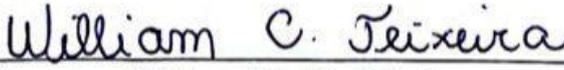
Prof.^o Dr.^o José Delano Barreto Marinho Filho
Presidente da Banca



Prof.^a Dr.^a Luciana Rocha Faustino
Examinadora 1



Prof.^o Me. Fabrício dos Santos Machado
Examinador 2



William Cataldo Teixeira
Orientando

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, amigos e à força que emana de mim, fonte inexorável de determinação e perseverança.

*“Vem por aqui” — dizem-me alguns com olhos doces,
Estendendo-me os braços, e seguros
De que seria bom se eu os ouvisse
Quando me dizem: "vem por aqui"!
Eu olho-os com olhos lassos,
(Há, nos meus olhos, ironias e cansaços)
E cruzo os braços,
E nunca vou por ali...
Se vim ao mundo, foi
Só para desflorar florestas virgens,
E desenhar meus próprios pés na areia inexplorada!
O mais que faço não vale nada.
Ah, que ninguém me dê piedosas intenções!
Ninguém me peça definições!
Ninguém me diga: "vem por aqui"!
A minha vida é um vendaval que se soltou.
É uma onda que se alevantou.
É um átomo a mais que se animou...
Não sei por onde vou,
Não sei para onde vou,
— Sei que não vou por aí.”*

Cântico Negro - José Régio - Adaptado

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e incentivo de muitas pessoas, e, por isso, não poderia deixar de expressar minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste projeto.

Primeiramente, agradeço aos meus pais Marco e Rosiane, pelo apoio e amor, pelo exemplo de perseverança e por sempre acreditarem em mim. A vocês, minha eterna gratidão por todos os sacrifícios, apoio e abstenções em cada etapa da minha vida.

Aos meus avós, Terezinha e Luiz, agradeço por serem meu porto seguro, por sempre terem sido base e por terem enorme contribuição na formação do meu caráter.

Aos meus irmãos, de sangue e de alma, Wallace e Carolina, que sempre foram base, colo, acalento e proteção, muito obrigado pelo apoio incondicional e pelo amor transcendental. Vocês são norte e guiam meu caminho.

Às minhas amigas e colegas de curso, Milena e Joyce, pela parceria e incentivo nos momentos de desafios e conquistas. Estar ao lado de pessoas tão especiais foi essencial para enfrentar as dificuldades com leveza e otimismo.

Ao meu orientador, Prof.º José Delano, por sua paciência e simpatia, por compartilhar seu conhecimento e por todas as orientações e conselhos ao longo desta pesquisa. Sua dedicação e disponibilidade foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação. Agradeço também à Prof.ª Ana Jérsia por sua contribuição neste trabalho, pelas maravilhosas instruções e por ser fonte de inspiração para todos na árdua batalha acadêmica. Além dos membros da banca, Prof.º Fabrício Machado e Prof.ª Luciana Faustino, obrigado por suas considerações e orientações.

Agradeço aos amigos que fiz no grupo de pesquisa do LCCDelta e aos que fiz na UFDPAr, pelas discussões extremamente enriquecedoras, pelos momentos de descontração e por compartilharem seus conhecimentos comigo.

Ao Matheus, que esteve comigo durante esses 6 anos de caminhada, que foi minha família e meu incentivo, mesmo longe de casa, me apoiando, protegendo e sendo colo nos momentos de medo, saudade e aflição, muito obrigado por cada minuto que passamos juntos até aqui e por sua contribuição neste trabalho. Juntos até o fim.

Por fim, ao universo e ao Òrìsà, dono do meu Orí, fonte de vida, energia e arquiteto de minha existência e destino, este trabalho é também uma homenagem a você, que está ao meu lado espiritualmente, com fé e coragem, guiando-me nos momentos de incerteza e fortalecendo-me nas adversidades.

OBRIGADO!

RESUMO

O câncer é caracterizado por um conjunto de diferentes tipos de alterações malignas, de origem genética e epigenética, que culminam em crescimento desordenado de células anormais. As terapias farmacológicas mais avançadas atualmente envolvem a administração de quimioterápicos e agentes bloqueadores hormonais não-específicos, que levam a diversos efeitos colaterais, prejudicando a adesão ao tratamento. Por isso, pesquisas com novas moléculas sintéticas e inéditas, como as bis-chalconas L05 e L08, são promissoras, uma vez que há estudos demonstrando diversos efeitos anticâncer de substâncias pertencentes a mesma classe. O presente estudo visou investigar o perfil antiproliferativo das bis-chalconas sintéticas L05 e L08 por meio de experimentos *in vitro*. Os ensaios utilizados para avaliação da citotoxicidade das bis-chalconas frente a diversas linhagens tumorais e não-tumorais foram: o método do MTT, nos tempos de 24, 48 e 72h, com concentração de tratamento decrescente de razão 2, iniciando em 100 μM ; o teste em pulso de tempo-concentração, nos tempos de 24 e 30h, também iniciando em concentração de 100 μM ; ensaio de MTT com SDS, no tempo de 72h, iniciando em concentração de tratamento de 25 μM . Além disso, foram realizados o teste de viabilidade celular, por meio do Azul de Tripán, nos tempos de 24 e 48h, em concentrações de tratamento de 2, 4, 8 e 16 μM , e, por fim, o ensaio morfológico, através do panóptico rápido, nas mesmas concentrações e tempos de tratamento do teste anterior. Pelo método do MTT, a L05 apresentou efeito frente a quatro linhagens cancerosas, sendo os menores valores de CI_{50} de 10,7 μM e 16,8 μM em Mel-501 e HCT-116, respectivamente, não apresentando citotoxicidade para a linhagem não-tumoral. Observa-se que a L08 apresentou melhor efeito frente às linhagens celulares testadas, uma vez que foi ativa em um maior número de linhagens, com os menores valores de CI_{50} sendo 2,5 μM e 4,7 μM em HCT-116 e Mel-501, respectivamente. Em face a esses resultados encontrados no MTT de 72h, optou-se por dar continuidade à pesquisa utilizando-se apenas a bis-chalcona inédita L08 e a linhagem HCT-116. Em relação ao teste da viabilidade celular, foi possível observar que a L08 foi capaz de reduzir de forma significativa, o número de células viáveis, desde a menor concentração utilizada para ambos os tempos de tratamento, sem modificar o número de células não-viáveis com significância estatística. Por meio da análise morfológica, observou-se o surgimento de alterações sugestivas de início de um processo de morte celular, como prolongamento da membrana plasmática (“*blebs*” ou corpos apoptóticos), aparecimento de vacúolos no citoplasma, condensação da cromatina (picnose) e fragmentação nuclear, assim como surgimento de restos celulares. Por fim, os resultados explicitados neste estudo mostram efeito citotóxico tempo-dependente das bis-chalconas sintéticas e inéditas L05 e L08, com destaque de atividade para a segunda amostra, a qual também promoveu o início de um processo de morte celular. Com a finalidade de aprofundar os mecanismos envolvidos na citotoxicidade e na morte celular, são necessários outros experimentos *in vitro* e *in vivo* para elucidação e ratificação de sua ação antiproliferativa em HCT-116 e em outras linhagens celulares.

Palavras-chave: Anticâncer; Bis-chalconas; Citotoxicidade; Viabilidade celular; Morte celular.

ABSTRACT

Cancer is characterized by a set of different types of malignant alterations, of genetic and epigenetic origin, which culminate in the disordered growth of abnormal cells. The most advanced pharmacological therapies currently involve the administration of chemotherapy and non-specific hormone-blocking agents, which lead to various side effects and impair adherence to treatment. For this reason, research into new synthetic molecules, such as the bis-chalcones L05 and L08, is promising, since there have been studies showing various anticancer effects of substances belonging to the same class. This study aimed to investigate the antiproliferative profile of the synthetic bis-chalcones L05 and L08 through *in vitro* experiments. The tests used to assess the cytotoxicity of the bis-chalcones against various tumor and non-tumor cell lines were: the MTT method, at 24, 48 and 72 hours, with treatment concentration decreasing by a ratio of 2, starting at 100 μM ; the time-concentration pulse test, at 24 and 30 hours, also starting at a concentration of 100 μM ; the MTT assay with SDS, at 72 hours, starting at a treatment concentration of 25 μM . In addition, the cell viability test was carried out using Trypan blue at 24 and 48 hours, at treatment concentrations of 2, 4, 8 and 16 μM , and finally, the morphological test using rapid panopticon, at the same concentrations and treatment times as the previous test. Using the MTT method, L05 showed an effect against four cancerous lineages, with the lowest IC_{50} values being 10.7 μM and 16.8 μM in Mel-501 and HCT-116, respectively, while showing no cytotoxicity for the non-tumorous lineage. It can be seen that L08 had a better effect on the cell lines tested, since it was active in a greater number of lines, with the lowest IC_{50} values being 2.5 μM and 4.7 μM in HCT-116 and Mel-501, respectively. In view of these results found in the 72-hour MTT, it was decided to continue the research using only the unpublished bis-chalcone L08 and the HCT-116 strain. With regard to the cell viability test, it was observed that L08 was able to significantly reduce the number of viable cells, from the lowest concentration used for both treatment times, without modifying the number of non-viable cells with statistical significance. Morphological analysis showed the appearance of changes suggestive of the start of a cell death process, such as prolongation of the plasma membrane (“blebs” or apoptotic bodies), the appearance of vacuoles in the cytoplasm, chromatin condensation (pyknosis) and nuclear fragmentation, as well as the appearance of cell debris. Finally, the results of this study show a time-dependent cytotoxic effect of the synthetic and novel bis-chalcones L05 and L08, with the second sample being the most active, which also promoted the onset of cell death. In order to further investigate the mechanisms involved in cytotoxicity and cell death, further *in vitro* and *in vivo* experiments are needed to elucidate and ratify their antiproliferative action on HCT-116 and other cell lines.

Keywords: Anticancer; Bis-chalcones; Cytotoxicity; Cell Viability; Cell Death.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características para o desenvolvimento tumoral.....	13
Figura 2 - Ativação de vias de sinalização durante a progressão do câncer.....	14
Figura 3 - Estrutura básica das chalconas: isômeros Z e E.....	16
Figura 4 - Mecanismo de formação de derivados de chalconas em meio básico.....	17
Figura 5 - Mecanismo de síntese de bis-chalconas a partir do benzaldeído e acetona.....	19
Figura 6 - Informações químicas das bis-chalconas L05 e L08.....	21
Figura 7 - Ensaio de pulso de tempo com a linhagem de células tumorais HCT-116. O gráfico de barras indica a duração do tratamento com a bis-chalcona L08 (barra azul) e o tempo de incubação em meio sem a substância (barra laranja).....	30
Figura 8 - Avaliação dos efeitos fenotípicos por visualização microscópica direta das células tumorais HCT-116 após 24h exposição a bis-chalcona L08.....	31
Figura 9 - Efeito da bis-chalcona L08 na viabilidade da linhagem tumoral HCT-116 determinado pelo ensaio de exclusão de azul de Tripán após 24 horas de tratamento.....	32
Figura 10 - Efeito da bis-chalcona L08 na viabilidade da linhagem tumoral HCT-116 determinado pelo ensaio de exclusão de azul de Tripán após 48 horas de tratamento.....	33
Figura 11 - Avaliação de possíveis alterações na morfologia celular em células HCT-116 após 24h e 48h de tratamento com bis-chalcona L08, por meio do panóptico rápido.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais.....	16
Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas no experimento.....	21
Tabela 3 - Efeito antiproliferativo de bis-chalconas sintéticas (L05 e L08) em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h.....	27
Tabela 4 - Índice de seletividade da bis-chalcona L08 frente à linhagem de células tumorais HCT-116 e não-tumorais MCF10A, no tempo de 72h.....	28
Tabela 5 - Efeito antiproliferativo de bis-chalcona sintética (L08) em linhagem de células tumorais HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, após 24, 48 e 72 horas.....	29
Tabela 6 - Efeito antiproliferativo de bis-chalcona sintética (L08) em linhagem de células tumorais HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT com SDS, após 72 horas de incubação e mais 12 horas “overnight”.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Serine threonine kinase (Quinase serina treonina)
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de variância)
CI₅₀	Concentração inibitória média
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro Padrão da Média
ERK	Extracellular signal-regulated kinases (Quinases reguladas por sinal extracelular)
IC	Intervalos de Confiança
IS	Índices de seletividade
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-brometo de tetrazolium
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF- κB	Fator nuclear kappa B (do inglês, factor nuclear kappa B)
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão fosfato)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases (Fosfatidilinositol 3-quinase)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. Câncer: características gerais	13
2.2. Epidemiologia do câncer colorretal no Brasil	14
2.3. Potencial farmacológico de biomoléculas	15
2.4. Chalconas.....	16
2.5. Bis-chalconas	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral:.....	20
3.2. Objetivos específicos:.....	20
4. METODOLOGIA	21
4.1. Obtenção das amostras.....	21
4.2. Cultura das células utilizadas	21
4.3. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	22
4.3.1 Teste do MTT	22
4.3.2 Teste em pulso de tempo-concentração	23
4.3.3 Teste MTT com SDS.....	24
4.3.4 Análise de dados dos experimentos com MTT	25
4.4. Avaliação da viabilidade celular por Exclusão de Azul de Tripán	25
4.5. Avaliação das alterações morfológicas por coloração com panótico rápido	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Avaliação do efeito citotóxico pelo método do MTT.....	27
5.2. Teste em pulso de tempo-concentração	29
5.3. Avaliação do efeito citotóxico pelo método do MTT com SDS	31
5.4. Quantificação da viabilidade celular utilizando o ensaio de exclusão por azul de Tripán	32
5.5. Avaliação das alterações morfológicas por coloração com panótico rápido	33
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado por um conjunto de mais de 100 diferentes tipos de alterações malignas, de origem genética e/ou epigenética, como o bloqueio de supressores de crescimento, angiogênese e elevação da resistência à apoptose, que culminam em crescimento desordenado de células anormais, capazes de invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância (Hanahan, 2022). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2023), hodiernamente, a afecção é o principal problema de saúde pública no mundo, figurando como uma das principais causas de morte.

Acredita-se que o aumento nos casos esteja diretamente relacionado às transições demográficas e epidemiológicas mundiais. Aquela, associa-se a redução nas taxas de fertilidade e mortalidade infantil, com conseqüente aumento na proporção de idosos, e, no que concerne à transição epidemiológica, atualmente observa-se a substituição progressiva da mortalidade por doenças infecciosas pelas mortes relacionadas às doenças crônicas (INCA, 2023).

Outrossim, os pilares que sustentam o aumento nos casos de câncer no mundo estribam-se principalmente nesse envelhecimento populacional em conjunto com as mudanças de comportamento e do ambiente, incluindo alterações estruturais, o que influencia negativamente a mobilidade, recreação, dieta e exposição a poluentes e agentes cancerígenos. Esses fatores, por sua vez, contribuem para a elevação na incidência e mortalidade pela doença em questão (Wild; Weiderpass; Stewart, 2020).

De acordo com as estimativas do Global Cancer Observatory (Globocan), elaboradas pela International Agency for Research on Cancer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes por câncer no mundo em 2022. Em consonância com Ferlay *et al.* (2021), um em cada cinco indivíduos terão câncer durante alguma etapa de sua vida, sendo o câncer de mama feminino o mais incidente no mundo (11,7%), seguido pelo câncer de pulmão (11,4%) e câncer de cólon e reto (10,0%). Para o Brasil, conforme dados do INCA (2023), estima-se que para o triênio de 2023 a 2025 haja 704 mil novos casos de câncer, sendo o mais incidente o câncer de pele não melanoma (31,3%), seguido pelos cânceres de mama (10,5%), próstata (10,2%) e cólon e reto (6,5%).

A alta mortalidade por câncer está diretamente relacionada à sua fisiopatologia, uma vez que as células de neoplasias malignas manifestam maior grau de autonomia, atividade proliferativa descontrolada, resistência aos mecanismos de morte celular e habilidade para invasão de tecidos adjacentes e à distância, cursando geralmente com metástase em outros órgãos secundários (Guan, 2015; Das; Mandal; Kögel, 2018).

As terapias farmacológicas mais avançadas no mundo envolvem a administração de quimioterápicos e agentes bloqueadores hormonais (Bonassa, 2012). No entanto, a adesão ao tratamento constitui-se como um importante entrave ao tratamento adequado, uma vez que os pacientes desenvolvem diversos efeitos colaterais, em função da baixa especificidade dos fármacos às células cancerosas, como náusea, parestesia, diarreia, vômito e neutropenia (Alves, 2014).

Em razão disso, novas pesquisas na área de biotecnologia têm evidenciado a potencialidade da biodiversidade mundial na descoberta por novas moléculas capazes de mitigar os potenciais efeitos adversos das terapias convencionais e sintéticas existentes no momento. O Brasil é promissor para essas pesquisas, visto que possui uma das maiores biodiversidades do planeta, contando com cerca de 60 mil espécies de plantas, o que pode aumentar ainda mais as chances de haver a descoberta de novas moléculas antitumorais e com menos efeitos colaterais ao tratamento do câncer (Stehmann; Sobral, 2017).

As Chalconas fazem parte de uma importante classe de precursores de flavonoides e isoflavonoides de ocorrência natural, que podem ser encontradas em plantas. São classificadas como cetonas aromáticas α , β -insaturadas que apresentam como núcleo principal a 1,3-diarilprop-2-en-1-ona (Sahu *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2017). Devido ao grande número de hidrogênios substituíveis, as Chalconas permitem que um grande número de derivados e uma variedade de atividades biológicas promissoras sejam geradas, tais como atividade anti-inflamatória (Shi *et al.*, 2017), atividade antibacteriana (Yadav *et al.*, 2018), atividade anti-leishmania (Mello *et al.*, 2016), antimalárica (Singh *et al.*, 2017), antiviral (Zhou *et al.*, 2018) e anticâncer (Abou-Zied *et al.*, 2019).

As bis-chalconas são moléculas derivadas das chalconas, possuem região dienona conectada a dois anéis aromáticas, podendo ser simétricas ou assimétricas, de origem natural, como a curcumina, ou sintética (Silva, 2021). Os primeiros trabalhos a respeito da síntese e avaliação do potencial de bis-chalconas sintéticas datam da década de 60, a partir dos estudos de Tsukerman *et al* (1969), que relatam a pesquisa luminescente do sistema das chalconas classificadas como dichalconas e isodichalconas. Ao longo dos anos, diversas atividades têm sido relacionadas à atuação desses heterociclos biologicamente ativos, como suas propriedades anti-maláricas (Modzelewska, 2006) e antibióticas (Mobinikhaledi, 2012). Além disso, as bis-chalconas sintéticas possuem importantes atividades citotóxicas frente a linhagens cancerosas diferentes (Almeida *et al.*, 2019).

Segundo Constantinescu (2021), os flavonoides e isoflavonoides suprimem o crescimento de células tumorais por meio do bloqueio do ciclo celular, por indução de apoptose

ou pela combinação desses mecanismos. Por isso, pesquisas como as citadas anteriormente indicam que essas substâncias podem ser promissoras antineoplásicas, potencialmente com menores efeitos sistêmicos colaterais ao tratamento do câncer. Além disso, não existem pesquisas descartando a possibilidade de que as bis-chalconas tenham algum efeito anticâncer. Dessa maneira, o presente estudo visa investigar o perfil antiproliferativo das bis-chalconas sintéticas L05 e L08 em experimentos *in vitro*, com a finalidade de avaliar o potencial anticâncer desses compostos inéditos.

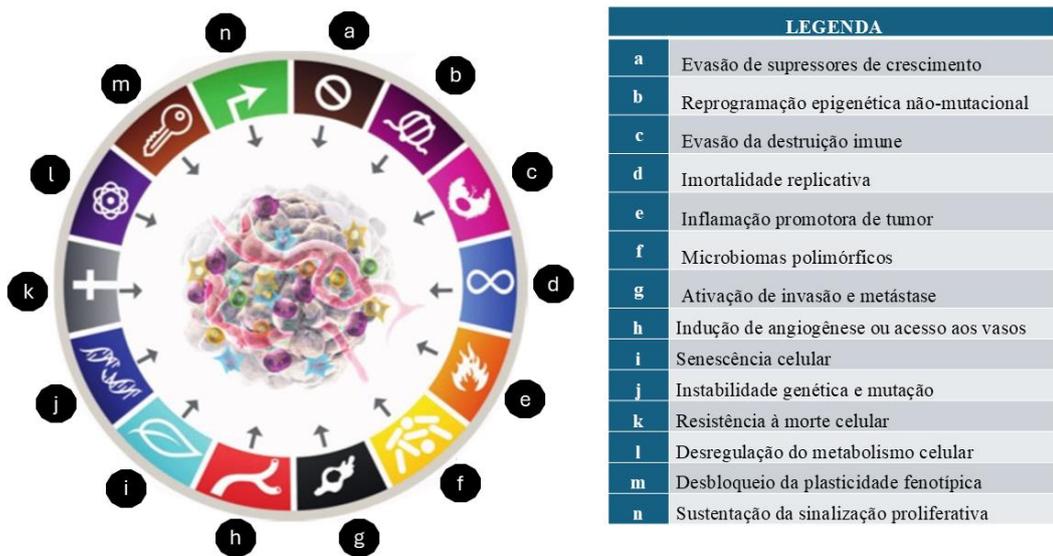
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer: características gerais

O câncer configura-se como uma proliferação celular anormal de qualquer tecido corporal, capaz de invadir tecidos adjacentes e órgãos à distância, resultando, assim, em cerca de uma centena de tipos diferentes da doença. Essa vasta gama de neoplasias impacta diretamente na singularidade comportamental e em sua resposta aos tratamentos conhecidos atualmente. Como cerne do problema, observa-se, primariamente, a perda generalizada do controle proliferativo das células cancerosas, resultado de uma série de anormalidades cumulativas em múltiplos sistemas reguladores de crescimento (Cooper, 2018).

De maneira similar, além da perda da responsividade aos mecanismos fisiológicos antiproliferativos, diversos outros artifícios contribuem para a oncogênese (Figura 1). Entre eles destacam-se a habilidade de evasão da morte celular programada e do sistema imunológico, conferindo um potencial replicativo ilimitado, a capacidade de reprogramação do metabolismo energético, o fenômeno da metástase e até mesmo a estimulação da angiogênese no microambiente tumoral (Hanahan, 2022).

Figura 1 - Características para o desenvolvimento tumoral

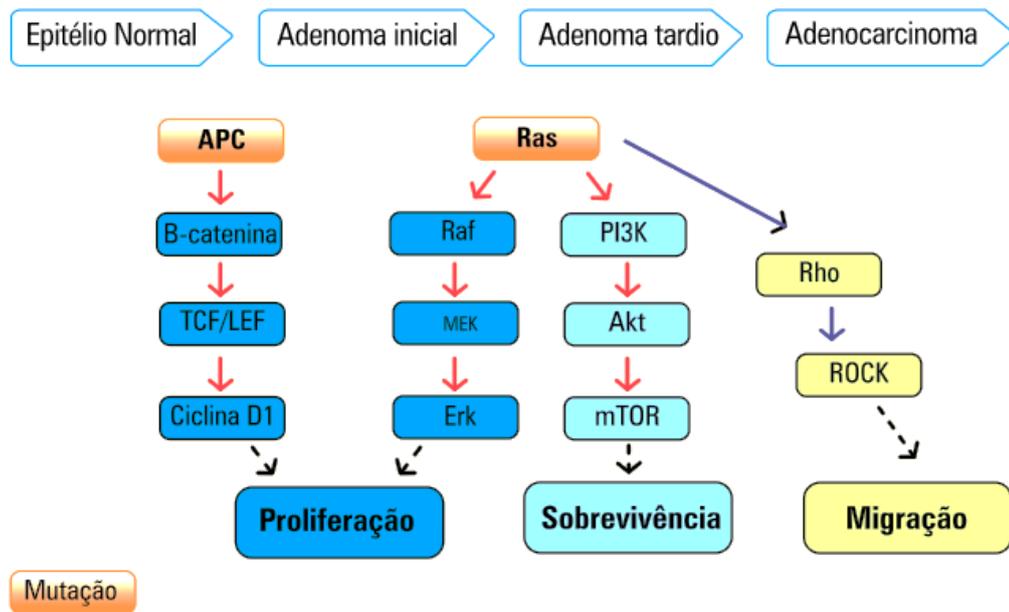


Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

O microambiente tumoral e as alterações na sinalização celular são elementos imprescindíveis para a tumorigênese. Este microambiente funciona como um nicho especializado que abriga células tumorais, células imunes, células supressoras derivadas de mielóides, células dendríticas, entre outros componentes, além de facilitar a interação com o entorno circundante e à distância, através dos sistemas circulatório e linfático (Yu; Ho, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

A sinalização celular constitui-se como um mecanismo essencial, responsável por induzir a proliferação, a apoptose e uma miríade de eventos intracelulares. Esta comunicação intercelular é mediada por moléculas-sinal, as quais são secretadas ou expostas na superfície celular e reconhecidas por receptores, geralmente proteínas, presentes na superfície celular ou no interior das células. Essa transdução de sinal alterada leva à ativação de vias de sinalização importantes à perpetuação do câncer, como as vias ERK e PI3K, responsáveis respectivamente pela proliferação e sobrevivência dessas células (Figura 2) (Souza *et al.*, 2014).

Figura 2 – Ativação de vias de sinalização durante a progressão do câncer



Fonte: Souza *et al.* (2014).

2.2. Epidemiologia do câncer colorretal no Brasil

Espera-se que para o triênio de 2023 a 2025, haja 704 mil novos casos de câncer no Brasil, sendo 6,5% desse número para neoplasia de cólon e reto (INCA, 2023). O câncer colorretal inclui os tumores que se originam no cólon, uma porção do intestino grosso, no reto, que é a parte final do intestino imediatamente antes do ânus, e no próprio ânus. Esta é uma

doença heterogênea, que geralmente surge de mutações genéticas em lesões benignas, como pólipos adenomatosos e serrilhados (Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva, 2021; Sullivan; Noujaim; Roper, 2022).

Para o Brasil, estima-se que o número de novos casos de câncer de cólon e reto (ou câncer de intestino) será de 45.630 por ano durante o triênio de 2023 a 2025. Isso representa um risco estimado de 21,10 casos por 100 mil habitantes. Dentre esses casos, espera-se que 21.970 ocorram entre os homens e 23.660 entre as mulheres, correspondendo a um risco estimado de 20,78 novos casos a cada 100 mil homens e 21,41 novos casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023).

Desprezando os tumores de pele não-melanoma, o câncer colorretal ocupa a terceira posição entre os tipos mais frequentes de câncer no Brasil (INCA, 2023). O tratamento padrão dessa condição envolve ressecção cirúrgica e terapia quimioterápica adjuvante em muitos casos. Esta adjuvância pode ser realizada por meio de fármacos baseados em fluoropirimidina (5-fluorouracila ou capecitabina), oxaliplatina e outros medicamentos (Brasil, 2014). Os efeitos colaterais do tratamento quimioterápico justificam-se pela falta de especificidade às células cancerosas, dentre eles destacam-se a queda de cabelo, constipação, diarreia, náusea e vômito, irritabilidade, insônia e outros sintomas sistêmicos (Schulze, 2007).

2.3. Potencial farmacológico de biomoléculas

O Brasil é um país de proporções continentais, conta com cerca de 8,5 milhões de km² e ocupa aproximadamente metade de toda América do Sul. Em decorrência de suas dimensões territoriais, pode-se observar diversas zonas climáticas pelo país, desde o semiárido nordestino até o subtropical sulista. Essa grande variedade de climas, portanto, leva ao surgimento de diferentes biomas e à grande variação ecológica. Em decorrência disso, a vasta variedade de biomas brasileiros traduz a riqueza da flora do país: o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, cerca de 20% do número total de espécies existentes em todo o planeta (Brasil, 2023).

Esse patrimônio genético da biodiversidade brasileira é acompanhado de um inestimável valor econômico-estratégico para diversos campos, destacando-se as potencialidades farmacológicas das substâncias que podem ser derivadas dessa diversidade da flora. Na área do tratamento ao câncer, cerca de 53% das terapias usuais utilizam fármacos derivados direta ou indiretamente de produtos naturais (Newman e Cragg, 2020). A tabela 1 explicita alguns exemplos de medicamentos extraídos direta ou indiretamente de produtos naturais, os quais embasam a afirmação supracitada.

Tabela 1 – Medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais

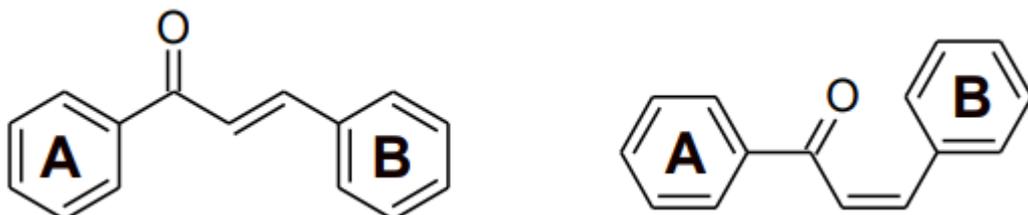
Fármaco	Uso terapêutico	Fonte
Ácido acetilsalicílico	Anti-inflamatório	<i>Salix alba L.</i>
Vimblastina	Antineoplásico	<i>Catharanthus roseus</i>
Acheflan®	Analgésico	<i>Cordia curassavica</i>
Pilocarpina	Glaucoma	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Imunomax	Analgésico	<i>Uncaria tomentosa</i>
Digoxina	Insuficiência cardíaca	<i>Digitalis lanata</i>

Fonte: Calixto (2003).

Estima-se que 40% dos medicamentos atuais foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% extraídos de plantas da biodiversidade mundial. Em decorrência disso, as maiores farmacêuticas da atualidade possuem laboratórios de pesquisa na área de produtos naturais, em vistas do vasto potencial bioquímico das moléculas naturais e de sua baixa toxicidade aos organismos humanos (Brasil, 2016). Exemplo de novas alternativas para terapia são os compostos naturais puros denominados de Chalconas, várias moléculas derivadas da mesma foram aprovadas para uso clínico e pesquisas em humanos (Nakao, 2021).

2.4. Chalconas

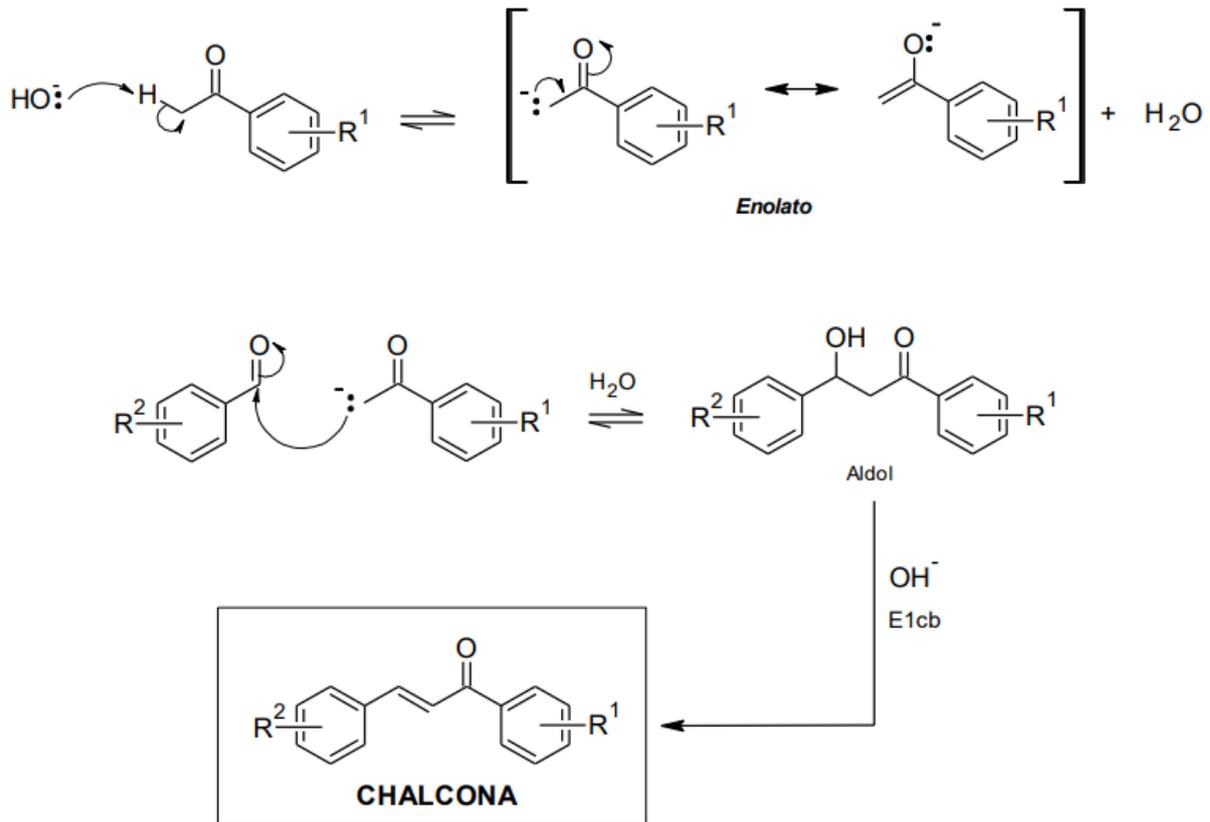
As chalconas são compostos da família dos flavonoides, caracterizando-se como uma classe distinta de moléculas com estrutura de cadeia aberta e que servem como precursoras para outros flavonoides e isoflavonoides essenciais para as plantas (Sahu *et al.*, 2012). Estas substâncias possuem um esqueleto molecular composto pela ligação de dois segmentos de anéis aromáticos através de uma ponte de três átomos de carbono, contendo um grupo cetona e uma insaturação α,β (Arruda *et al.*, 2016; Custodio *et al.*, 2017). A estrutura básica das chalconas pode existir em duas isoformas diferentes, chamadas isômeros Z e E, sendo este último termicamente mais estável (Figura 3). O isômero Z é menos estável devido aos efeitos estéricos entre o grupo carbonila e o anel B (Aksöz *et al.*, 2011; Lemes *et al.*, 2018).

Figura 3 – Estrutura básica das chalconas: isômeros Z e E

Fonte: Silva (2021), adaptado de Gomes *et al.* (2017).

As chalconas podem ser sintetizadas por vários métodos diferentes, incluindo a condensação de Claisen-Schmidt, a reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura, a metodologia de Rueping e colaboradores, ou a síntese de Mahapatra. O método mais tradicional é a reação de condensação de Claisen-Schmidt, que é catalisada por bases ou ácidos fortes e envolve a adição de quantidades equimolares de benzaldeído e acetofenona. Na catálise básica, que é o método mais comum para a síntese de chalconas, ocorre a perda de um próton no carbono alfa de derivados de acetofenonas, resultando na formação de um ânion enolato estabilizado por ressonância. Em seguida, este ânion enolato ataca nucleofílicamente derivados de benzaldeído, formando um ânion alcóxido. O íon alcóxido então remove um hidrogênio da água, produzindo um aldol. Na etapa final, ocorre a desidratação do aldol (Figura 4) (Silva, 2021).

Figura 4 – Mecanismo de formação de derivados de chalconas em meio básico



Fonte: Silva, 2021.

As chalconas são moléculas que antecedem a biossíntese de flavonoides e isoflavonoides, atuando como metabólitos naturais em pigmentos vegetais (Ouyang, 2021). Essas substâncias foram sintetizadas pela primeira vez em laboratório no final do século XIX e, desde então, várias pesquisas têm destacado suas diversas propriedades medicinais (Aksöz,

2011). Entre essas propriedades das chalconas estão a atividade citotóxica e anticâncer da buteína extraída das cascas de *Rhus verniciflua* (Jayasooriya *et al.*, 2018); anti-inflamatória da licochalcona A, extraída da *Glycyrrhiza inflata* (Mahapatra *et al.*, 2015); efeito cardioprotetor da cardamonina (Díaz-Tielas *et al.*, 2016; Ku *et al.*, 2015; You *et al.*, 2018); anti-angiogênica do xanthohumol (Nutti, 2017) e antioxidante da aspalatina (Johnson *et al.*, 2018).

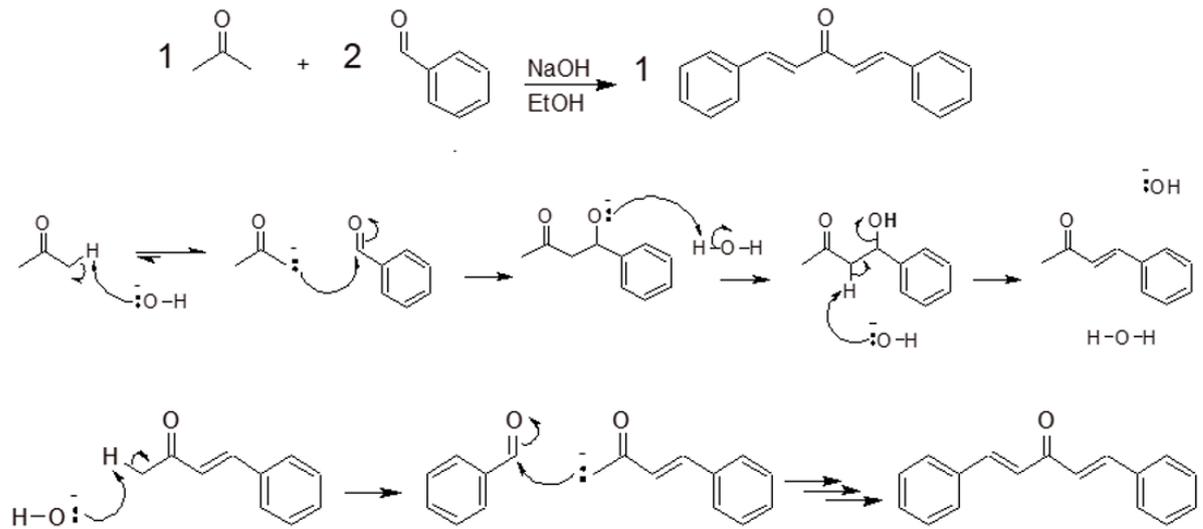
De acordo com Karthikeyan *et al.* (2014), os mecanismos de ação das chalconas estão centrados em sua atividade citotóxica, que inclui o bloqueio da angiogênese, a interrupção do ciclo celular, a inibição da formação de tubulina e a indução de morte celular programada. Em pesquisa realizada por Sheikh *et al.* (2023), derivados de chalconas heterocíclicas exerceram potencial anticâncer sobre linhagens de MCF-7, células de câncer de mama dependentes de estrogênio, A549, células de câncer de pulmão, HepG2, células de carcinoma hepatocelular e HCT-116, células de câncer colorretal. Um dos mecanismos antiproliferativos exercidos pelos derivados testados concentrou-se sobre o bloqueio da polimerização das tubulinas.

2.5. Bis-chalconas

Bis-chalconas são moléculas naturais ou sintéticas, simétricas ou assimétricas, que possuem uma região dienona associada a dois anéis aromáticos e, por isso, possuem alta capacidade de absorver energia visível (Doroteio, 2016). Além das propriedades espectrais, as bis-chalconas possuem diversas outras características de interesse farmacêutico e medicinal, a exemplo, a curcumina, representante da classe química que exibe atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, reguladoras do sistema imunológico, entre outras (Xu *et al.*, 2018).

Essas moléculas podem ser obtidas através da condensação de Claisen-Schmidt, permitindo uma ampla gama de estruturas ao modificar o aldeído e a cetona empregados. A Figura 5 demonstra esquematicamente as reações que acontecem no processo de síntese das bis-chalconas utilizando benzaldeído e acetona (Silva, 2021).

Figura 5 – Mecanismo de síntese de bis-chalconas a partir do benzaldeído e acetona



Fonte: Silva (2021).

No que concerne às suas propriedades biológicas, Abou-Zied e colaboradores (2019) pesquisou o perfil antiproliferativo e citotóxico de uma vasta gama de compostos da classe das bis-chalconas, observando inibição de crescimento das células cancerosas, em comparação ao controle positivo, às custas de elevação na proteína pró-apoptótica BAX da família das proteínas BCL-2 e nas caspases 3 e 8.

Além disso, muitas outras propriedades farmacológicas foram relatadas em outros estudos como características biológicas das bis-chalconas, como atividade bactericida e fungicida (Kumas *et al.*, 2014), anticâncer e no tratamento do diabetes pela inibição da α -amilase (Bale *et al.*, 2018).

As bis-chalconas, portanto, possuem diversas atividades biológicas observadas em pesquisas. Por isso, torna-se relevante o estudo de novas substâncias inéditas pertencentes à classe, como a L05 e a L08, para a descoberta de novas moléculas potenciais anticâncer e seus mecanismos moleculares antiproliferativos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Avaliar a atividade antiproliferativa das bis-chalconas sintéticas L05 e L08 em células de linhagens tumorais e não tumorais.

3.2. Objetivos específicos:

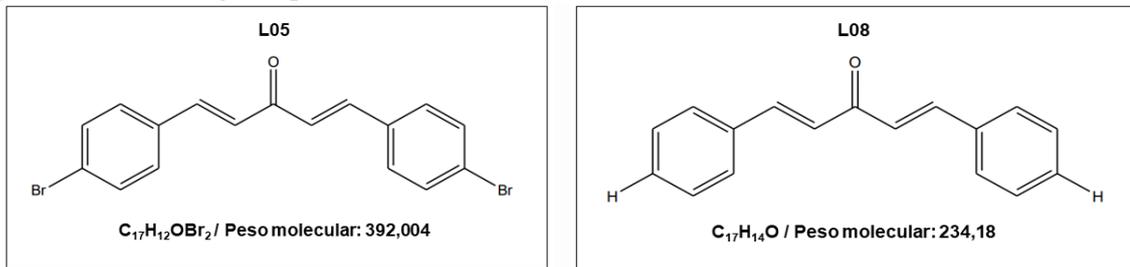
- Avaliar o potencial citotóxico das bis-chalconas L05 e L08 em diferentes linhagens de células tumorais e não tumorais;
- Avaliar a tempo-dependência das bis-chalconas L05 e L08 frente às células HCT-116;
- Investigar em pulso de tempo-concentração o perfil das bis-chalconas em células HCT-116;
- Determinar a viabilidade celular através do teste de exclusão do azul Tripán das bis-chalconas L05 e L08 na linhagem HCT-116;
- Identificar o possível mecanismo de ação antiproliferativo por meio de análise morfológica em linhagem de células de câncer colorretal de origem humana (HCT-116) tratadas com bis-chalconas L05 e L08.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção das amostras

As bis-chalconas sintéticas (L05 e L08) foram sintetizadas por Condensação aldólica catalisada por NaOH na Universidade Federal de Goiás (UFG) em colaboração com a Profa. Dra. Caridad Noda Peres e a pós-graduanda Mirian Rita Carrilho de Castro e gentilmente cedidas para a realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Figura 6 – Informações químicas das bis-chalconas L05 e L08



Fonte: Própria autoria (2024).

4.2. Cultura das células utilizadas

As células utilizadas neste experimento estão dispostas na Tabela 2, de acordo com a linhagem, tipo histológico e concentração de plaqueamento para avaliação da citotoxicidade.

Tabela 2 – Linhagens celulares utilizadas no experimento

Linhagem celular	Tipo histológico	Concentração de plaqueamento
HCT-116	Carcinoma colorretal humano	6×10^4 céls/mL
NCI-H460	Carcinoma de pulmão não pequenas células humanas	1×10^4 céls/mL
Mel-501	Melanoma humano	5×10^4 céls/mL
B16-F10	Melanoma murino	5×10^4 céls/mL
MDA-MB231	Adenocarcinoma de mama humano	8×10^4 céls/mL
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humano	3×10^5 céls/mL
KG1a	Leucemia mieloide aguda humano	3×10^5 céls/mL
K562	Leucemia mieloide crônica humano	3×10^5 céls/mL
MCF10-A	Linhagem não-cancerosa de células de mama humano	1×10^5 céls/mL

Fonte: Própria autoria (2024).

As células foram mantidas em crescimento exponencial sob condições apropriadas, com meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e 100U/mL de penicilina + 100 µg/mL estreptomicina em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂, seguindo orientações dos fornecedores das linhagens.

4.3. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

4.3.1 Teste do MTT

Princípio do método

O método 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, para o formazan, composto de cor púrpura. Essa conversão do MTT em formazan só ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, através dos metabólitos primários envolvidos do ciclo de Krebs, NADH₂, NADPH e Succinato, que são os principais envolvidos nesta reação, em que a atividade metabólica da célula é dependente do número de células, e, está diretamente relacionada com a quantidade de MTT metabolizada (Mosmann, 1983).

Procedimento experimental

As células em suspensão foram dispostas em placas de 96 poços (KASVI K12-096), em densidade celular mencionada na Tabela 2 acima, pré-determinada a partir de características intrínsecas à linhagem, como tempo de duplicação. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, deu-se início ao processo de tratamento das placas com as amostras pesquisadas (bis-chalconas L05 e L08), sendo adicionado 100 µL de L05 e L08 em cada poço de três colunas da placa (triplicata) para cada concentração, iniciando com 100 µM e decrescendo com padrão de diluição seriada de razão 2. Em relação ao controle positivo, foi utilizado o antineoplásico Doxorubicina (DOX), em concentrações seriadas decrescente iniciando em 8,6 µM. Além disso, também utilizamos 3 poços para controle negativo, adicionando 100 µL apenas do meio de cultura para igualar o volume em cada poço.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi retirado, adicionado 150 µL de solução de MTT (5 mg/mL), diluído em meio DMEM. Novamente as placas foram incubadas por mais 3h para completar o período total de experimento (24, 48 e 72h). Por fim, o sobrenadante foi

mais uma vez retirado e o formazan precipitado ressuspendido em 150 μ L por poço de Dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Elisa Spectramax 190) em comprimento de onda de 595 nm.

4.3.2 Teste em pulso de tempo-concentração

Princípio do método

O princípio do método consiste em investigar o perfil tempo-dependência e a exposição mínima necessária para a ação de um determinado composto (Almeida *et al.*, 2019).

Procedimento experimental

A linhagem utilizada foi disposta em placas de 96 poços (KASVI K12-096), seguindo mesma concentração de plaqueamento explicitada acima na Tabela 2. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, foi adicionado 100 μ L de L08 em cada poço de três colunas consecutivas da placa (triplicada) para cada concentração, iniciando com 100 μ M, decrescendo com padrão de diluição seriada de razão 2. Delimitou-se os tempos de 24 e 30h de tratamento. Após cada tempo pré-determinado, o tratamento foi retirado e os poços lavados duas vezes com PBS e, em seguida, foram adicionados 200 μ L de meio suplementado em cada poço.

Após completar 69h do início do tratamento, o sobrenadante foi retirado e adicionado 150 μ L de solução MTT (5 mg/mL), diluído em meio DMEM. Novamente as placas foram incubadas por mais 3h para completar o período total de experimento (72h). Depois disso, o formazan precipitado foi ressuspendido em 150 μ L de DMSO para cada poço. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Elisa Spectramax 190) em comprimento de onda de 595 nm.

4.3.3 Teste MTT com SDS

Princípio do método

No protocolo original do ensaio MTT, concebido e elaborado por Mossman (1983), emprega-se isopropanol acidificado para dissolver os cristais de formazan no meio de cultura. Apesar da ampla adoção do MTT em diversas pesquisas, o método ainda enfrenta algumas limitações técnicas. Desafios como a dissolução parcial dos cristais de formazan, a instabilidade da solução resultante e a formação de precipitados proteicos no meio de cultura podem comprometer a sensibilidade e precisão dos bioensaios. Investigação prévia tem explorado diversas adaptações nos ensaios de MTT, incorporando solventes variados, tais como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e dodecil sulfato de sódio (SDS), como estratégias para contornar essas limitações. O SDS não requer remoção do meio de cultura, porém necessita de um tempo médio maior para dissolução eficiente do formazan (Nga *et al.*, 2020).

Procedimento experimental

As células em suspensão foram dispostas em placas de 96 poços (KASVI K12-096), a linhagem foi plaqueada de acordo com concentração pré-determinada. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C com 5% CO₂, deu-se início ao processo de tratamento das placas com a amostra pesquisada (bis-chalcona L08), sendo adicionado 100 µL de L08 em cada poço de três colunas consecutivas da placa (triplicada) para cada concentração, iniciando com 25 µM e decrescendo com padrão de diluição seriada de razão 2. Como controle positivo, foi utilizada a DOX em concentração seriada decrescente iniciada em 8,6 µM. Após o período de incubação, foi adicionado 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço da placa. A placa foi incubada novamente por mais 4h, para completar o período total do experimento (72h). Após esse período, foram adicionados 70 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) em cada poço e retornada a placa para incubação por mais 12h (overnight). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Elisa Spectramax 190) em comprimento de onda de 595 nm.

4.3.4 Análise de dados dos experimentos com MTT

Os dados foram analisados por meio da utilização do programa GraphPad Prism versão 8.0. 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 tumorais e para linhagens tumorais (IS= CI₅₀ de células não tumorais/CI₅₀ de células tumorais) (Abd Razak *et al.*, 2019).

4.4. Avaliação da viabilidade celular por Exclusão de Azul de Tripán

Princípio do método

O azul de Tripán é um corante de carga negativa capaz de adentrar exclusivamente membranas danificadas, sendo absorvido apenas por células mortas. Por isso, as células mortas são observadas com coloração azul após aplicação do método e células viáveis continuam intactas e de aparência límpida (Adan; Kiraz; Baran, 2016).

Procedimento experimental

As células da linhagem utilizada foram dispostas em placas de 24 poços em concentração de 1×10^5 células/mL, pré-determinada em literatura. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, os poços foram tratados com a bis-chalcona L08 em concentrações definidas pelos valores de CI₅₀ do ensaio de MTT, sendo as seguintes concentrações as utilizadas neste experimento: 2, 4, 8 e 16 µM. O tempo total de tratamento foi de 24 e 48h. A DOX também foi utilizada como controle positivo na concentração de 5 µM e apenas o meio de cultura como controle negativo. Após o período total do experimento, as células foram transferidas para tubos *ependorf*, levados à centrífuga por 5 minutos a 1500 rpm e o pellet de células formado foi ressuscitado em 1 mL de PBS. Foram retirados 90 µL de suspensão de células de cada concentração, adicionados 10 µL de Azul de Tripán 0,4% e as células viáveis e não viáveis contadas em Câmara de Neubauer por meio de microscopia óptica.

Análise de dados

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 teste de Tukey para comparação com o controle negativo, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.5. Avaliação das alterações morfológicas por coloração com panótico rápido

Princípio do método

A coloração com kit panótico rápido (Laborclin®) permite a visualização das características morfológicas das células por meio da coloração diferenciada da membrana celular, do citoplasma e do núcleo, sendo possível observar, por exemplo, alterações morfológicas que caracterizam diferentes processos de morte celular (Gurr, 1971).

Procedimento experimental

As células da linhagem utilizada foram dispostas em placas de 24 poços em concentração de 1×10^5 células/mL, pré-determinada em literatura. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, os poços foram tratados com a bis-chalcona L08 em concentrações definidas pelos valores de CI₅₀ do ensaio de MTT com SDS, sendo as seguintes concentrações as utilizadas neste experimento: 2, 4, 8 e 16 μ M. O tempo total de tratamento foi de 24 e 48h. A DOX também foi utilizada como controle positivo na concentração de 5 μ M e apenas o meio de cultura como controle negativo. Após os períodos de incubação, as células foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com solução a 0,1% de xantenos e com solução de 0,1% de tiazinas (Laborclin®) para coloração de núcleo e citoplasma. Os poços foram lavados para remoção do excesso de corante e, em seguida, as células foram visualizadas em microscópio óptico e fotografadas no aumento de 200x (Olympus, Tokyo, Japan), com a finalidade de observar as características morfológicas das células em cada concentração de amostra, comparando com os controles positivo e negativo.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do efeito citotóxico pelo método do MTT

A avaliação da citotoxicidade das amostras testadas foi realizada por meio do método MTT de 72h em diferentes linhagens celulares, conforme explicitou a Tabela 2. Os valores encontrados de CI_{50} para cada linhagem encontram-se dispostos na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Efeito antiproliferativo de bis-chalconas sintéticas (L05 e L08) em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h

		CI_{50} (μM)		
		Intervalo de confiança 95%		
	Linhagens	L05	L08	Doxorrubicina
Tumorais	HCT-116	16,8 (11,8-23,4)	2,5 (1,9-3,1)	0,15 (0,06-0,27)
	NCI-H460	82,7 (71,8-97,4)	25,9 (20,7-32,7)	0,30 (0,23-0,37)
	Mel-501	10,7 (8,6-12,4)	4,7 (4,1-5,5)	0,16 (0,15-0,18)
	B16-F10	66,3 (46,87-100,0)	15,1 (12,9-17,7)	1,35 (1,13-1,61)
	MDA-MB231	>100	15,7 (11,0-23,3)	1,4 (1,24-1,72)
	HL-60	>100	73,9 (52,0-100,0)	0,46 (0,39 – 0,53)
	HG1a	>100	>100	0,73 (0,59 – 0,95)
	K562	>100	>100	2,56 (1,82 – 3,73)
Não-tumoral	MCF10-A	>100	47,2 (39,1-57,5)	0,22 (0,01-0,65)

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%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata, sendo mostrados entre parênteses. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Fonte: Própria autoria (2024).

Conforme é possível observar na tabela acima, as bis-chalconas L05 e L08 apresentaram efeito citotóxico em diversas linhagens utilizadas. A L05 apresentou efeito antiproliferativo em quatro linhagens cancerosas, sendo suas maiores atividades em HCT-116 e Mel-501, com CI_{50} de 16,8 μM e 10,7 μM , respectivamente. No que se refere à L08, pode-se observar melhor efeito frente às linhagens celulares testadas, uma vez que foi ativa em um maior número de linhagens, bem como seus valores de CI_{50} obtidos foram menores. Mais uma vez, essa segunda amostra foi mais ativa nas linhagens HCT-116 e Mel-501, com valores de CI_{50} de 2,5 μM e 4,7 μM ,

respectivamente. As linhagens leucêmicas (HL-60, KG1a e K562) não apresentaram redução de sua proliferação com as concentrações das amostras utilizadas, isso porque os valores de CI_{50} obtidos foram maiores que 100 μM . Apenas a L08 apresentou uma maior atividade em HL-60, com valor de CI_{50} de 73,9 μM , porém, o limite superior do intervalo de resultados ficou maior que 100,0 μM , demonstrando uma baixa atividade das bis-chalconas frente às linhagens leucêmicas testadas.

Sobre os resultados do experimento em linhagem não-tumoral, a amostra L05 não apresentou citotoxicidade, uma vez que o valor de CI_{50} encontrado foi maior que 100 μM . A L08, porém, apresentou maior atividade antiproliferativa frente a essa linhagem de células não-tumorais de mama, obtendo CI_{50} de 47,2 μM .

A partir desses resultados de citotoxicidade em uma vasta gama de linhagens celulares, é possível observar um predomínio antiproliferativo para a bis-chalcona L08, em razão de sua atividade em mais linhagens e com valores menores de CI_{50} . Ademais, observa-se que tal bis-chalcona mais ativa gerou um maior efeito citotóxico na linhagem HCT-116 (células de carcinoma colorretal humano), com o menor resultado de CI_{50} dentre todos os tipos celulares utilizados no experimento.

Em face a esses resultados encontrados no MTT de 72h, optou-se por dar continuidade à pesquisa utilizando-se a bis-chalcona inédita L08, em função de seu maior potencial citotóxico e antiproliferativo, bem como definiu-se expandir os testes para as células de carcinoma colorretal humano (HCT-116), imbuídos pelos menores resultados de CI_{50} apresentados na Tabela 3. Foi possível, ainda, com esses dados, calcular o índice de seletividade em 72h da amostra a linhagem tumoral escolhida frente a linhagem não-tumoral MCF10-A e compará-lo com a seletividade do controle positivo, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Índice de seletividade da bis-chalcona L08 frente à linhagem de células tumorais HCT-116 e não-tumorais MCF10A, no tempo de 72h

Índice de Seletividade (IS)		
MCF10A/HCT-116		
Tempo	L08	Doxorrubicina
72h	18,9	1,5

Fonte: Própria autoria (2024).

Ao observar o índice de seletividade da L08 em comparação ao antineoplásico já utilizado no tratamento da oncologia, observa-se resultados preliminares com a bis-chalcona sendo cerca de 12 vezes mais seletivo do que a DOX para as linhagens utilizadas no cálculo.

O seguimento dos testes baseou-se no mesmo ensaio, porém para tempos de tratamento diferentes, 24 e 48h. Os resultados de CI_{50} utilizando a L08 e a linhagem tumoral HCT-116, para tempos de 24, 48 e 72h de tratamento, estão dispostos na Tabela 5. O intuito da repetição do teste em diferentes tempos de tratamento foi observar a influência do tempo para o efeito citotóxico das amostras e, por conseguinte, definir o tempo a ser trabalhado nas próximas etapas da pesquisa.

Tabela 5 - Efeito antiproliferativo de bis-chalcona sintética (L08) em linhagem de células tumorais HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, após 24, 48 e 72 horas

Tempo	CI_{50} (μM) Intervalo de confiança 95%	
	HCT-116	
	L08	Doxorrubicina
24h	14,7 (12,3-17,6)	> 8,62
48h	1,9 (1,7-2,1)	0,51 (0,31-0,82)
72h	2,5 (1,9-3,1)	0,15 (0,06-0,27)

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%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata, sendo mostrados entre parênteses. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Fonte: Própria autoria (2024).

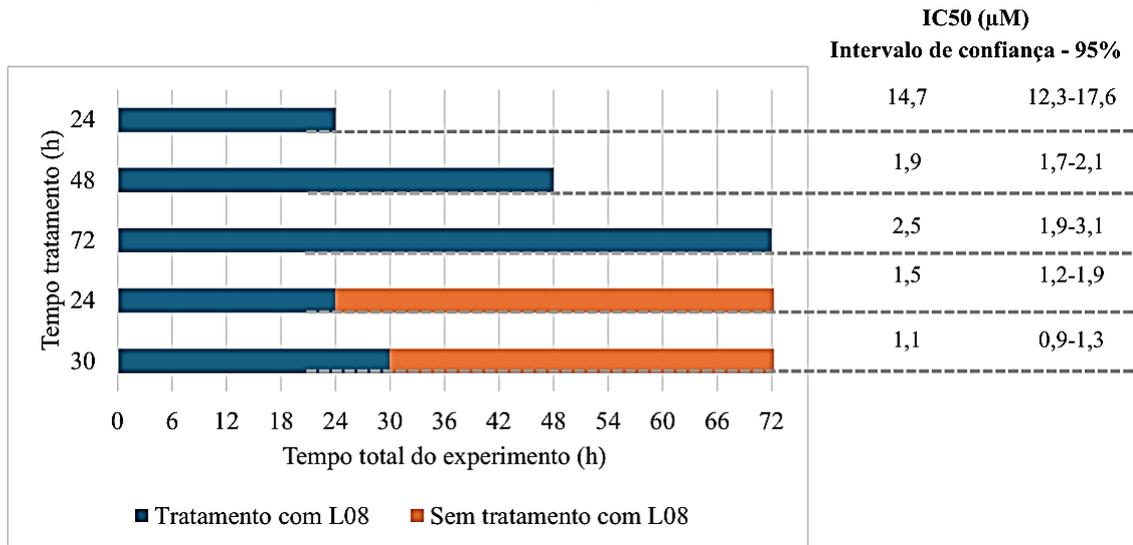
No que concerne aos valores de CI_{50} nos diferentes tempos, explicita-se que efeito antiproliferativo causado pela L08 parece apresentar seu platô de efeitos quando completadas pelo menos 48h de tratamento, visto que o valor encontrado nesse tempo de tratamento é cerca de 8 vezes menor do que a CI_{50} para o tempo de 24h. Após isso, o tratamento aparenta não manifestar um perfil tempo-dependência considerável, já que os intervalos obtidos nos testes com tempo de tratamento de 48 e 72h exibem interseccionalidade. Em razão a isso, os testes subsequentes utilizaram o tempo máximo de 48h de tratamento com a amostra.

5.2. Teste em pulso de tempo-concentração

Nesse experimento foi realizado um protocolo de exposição intermitente de células de carcinoma colorretal humano (HCT-116) à bis-chalcona L08 em concentrações partindo de 100 μM , seguido de incubação em meio sem amostra por um tempo total de 72h. Debruçando-se, portanto, sobre os resultados do teste, o tratamento com a substância promoveu citotoxicidade dependente do tempo, sendo um tratamento de pulso de 24h suficiente para reduzir drasticamente a viabilidade celular e atingir efeitos fenotípicos semelhantes ao tempo de

tratamento de 48h. Assim, observa-se que a bis-chalcona possui efeito citotóxico sobre a linhagem, mesmo com um tempo menor de tratamento. A Doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

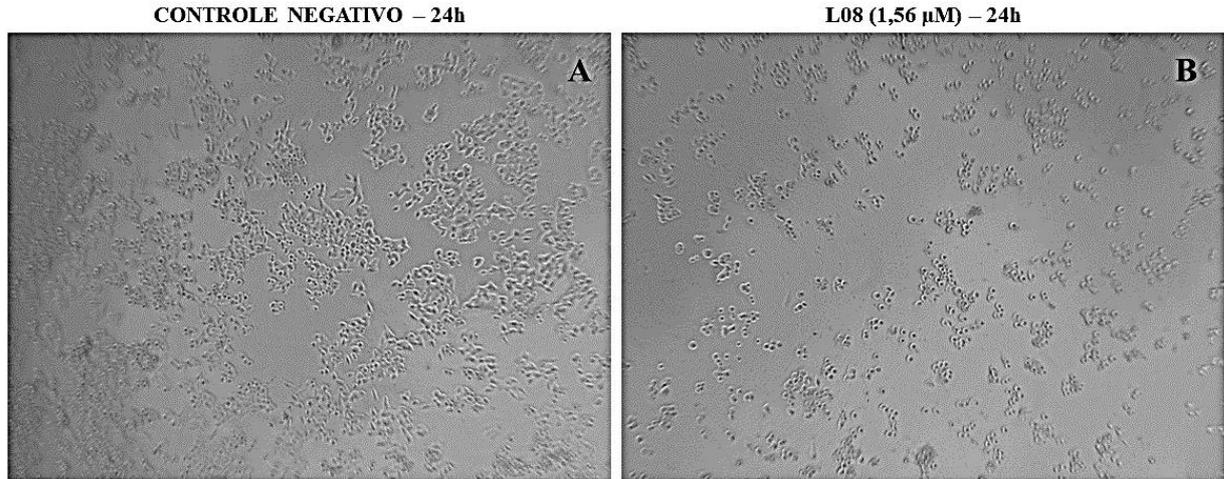
Figura 7 – Ensaio de pulso de tempo com a linhagem de células tumorais HCT-116. O gráfico de barras indica a duração do tratamento com a bis-chalcona L08 (barra azul) e o tempo de incubação em meio sem a substância (barra laranja)



Fonte: Própria autoria (2024).

Apesar dos dados acima expostos, constatou-se a partir da microscopia óptica das placas utilizadas nesse experimento, um arredondamento da morfologia celular, originalmente as células HCT-116 são caracterizadas pela sua morfologia poligonal, com citoplasma visível, núcleo bem definido e com muitos nucléolos, secundária à exposição à substância, quando em comparação ao controle negativo, porém com aparente manutenção da integridade e membrana celulares (Figura 8), o que poderia significar possível perda dos mecanismos de adesão das células. Além desse fato, em função da discrepância entre os valores de CI_{50} obtidos pelo teste do MTT de 24h e o pulso no mesmo tempo de exposição, optou-se por realizar mais uma rota experimental, por meio do teste de MTT com SDS, para avaliação da citotoxicidade e confirmação da concentração inibitória média, retirando-se o viés procedimental da etapa de retirada do meio dos poços, o que poderia estar ocasionando a aspiração de células viáveis não-aderidas, falseando, assim, os valores de CI_{50} encontrados e dificultando a compatibilidade dos resultados.

Figura 8 – Avaliação dos efeitos fenotípicos por visualização microscópica direta das células tumorais HCT-116 após 24h exposição a bis-chalcona L08



Legenda: Na Figura A é possível observar a morfologia típica de células aderidas de HCT-116, em seu formato fusiforme. Na Figura B já é possível observar uma rarefação da densidade de células e alteração objetiva da morfologia, células mais arredondadas, sem perda aparente da integridade da membrana celular. Fonte: Própria autoria (2024).

5.3. Avaliação do efeito citotóxico pelo método do MTT com SDS

Com a finalidade de confirmar a concentração inibitória média da bis-chalcona L08 em linhagem tumoral HCT-116 foi realizado o teste do MTT com SDS com tempo total de tratamento de 72h e mais 12h “*overnight*”, utilizando-se a Doxorrubicina como controle positivo. Os resultados encontrados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Efeito antiproliferativo de bis-chalcona sintética (L08) em linhagem de células tumorais HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT com SDS, após 72 horas de incubação e mais 12 horas “*overnight*”

Tempo	CI ₅₀ (µM)	
	Intervalo de confiança 95%	
	HCT-116	
	L08	Doxorrubicina
72h	4,6 (4,1-5,3)	0,20 (0,14-0,28)

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, sendo mostrados entre parênteses. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Fonte: Própria autoria (2024).

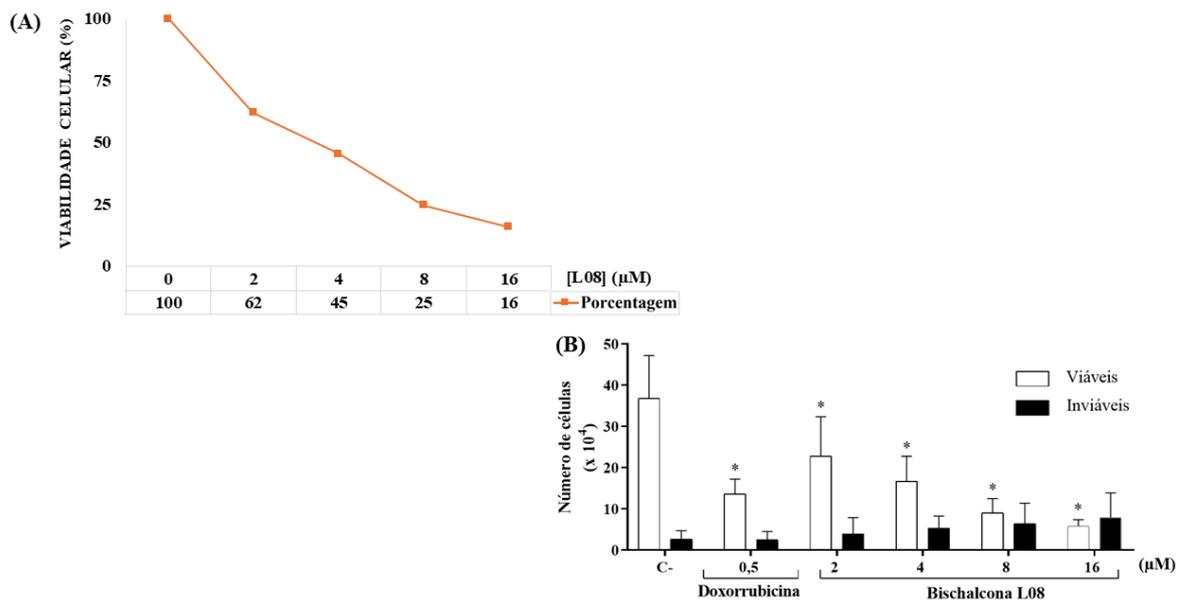
Desse modo, houve uma sutil alteração nos valores de CI₅₀ da amostra em 72h de tratamento quando compara-se os intervalos obtidos a partir dos dois diferentes métodos de avaliação de citotoxicidade, sendo 2,5 µM (1,9-3,1) para o MTT e 4,6 µM (4,1-5,3) para o MTT com SDS. Em face a isso, levando em conta o que foi observado à microscopia direta e a

possível interferência do processo manual do primeiro experimento, assumiu-se o último valor de CI_{50} para os próximos passos da pesquisa.

5.4. Quantificação da viabilidade celular utilizando o ensaio de exclusão por azul de Tripán

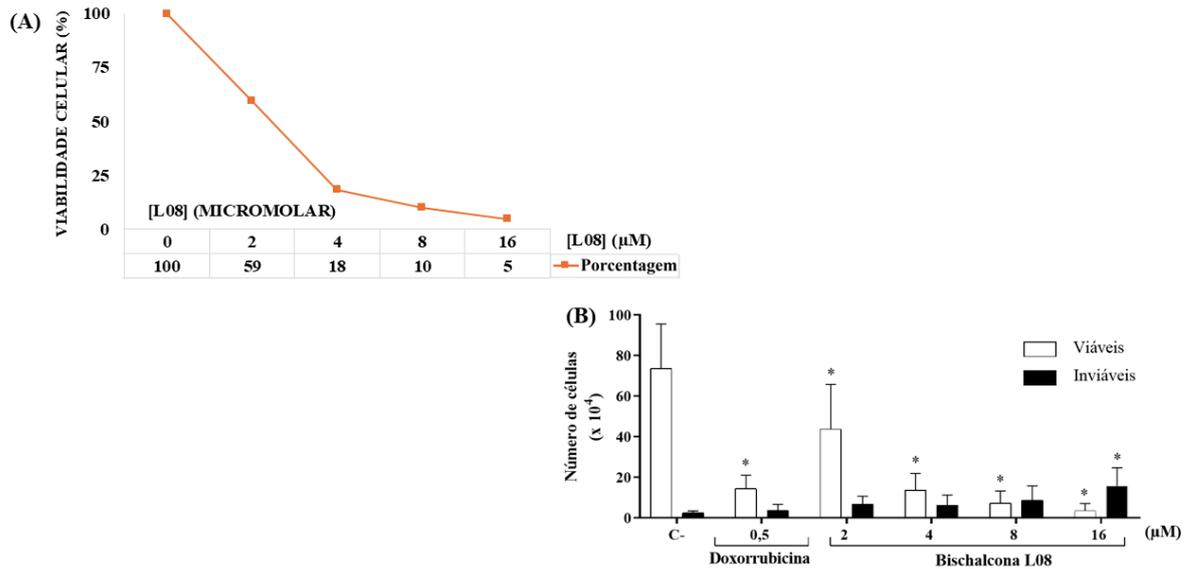
O ensaio de viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán foi utilizado para quantificar individualmente as células viáveis e não viáveis, após tempo de tratamento de 24 e 48h com a bis-chalcona L08. As concentrações de 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M e 16 μ M foram utilizadas no ensaio baseadas pelo valor de CI_{50} obtidos pelo teste do MTT com SDS após 72h de incubação em linhagem HCT-116. A DOX foi utilizada na concentração de 0,5 μ M como controle positivo. O controle negativo recebeu apenas o veículo da amostra (DMSO).

Figura 9 – Efeito da bis-chalcona L08 na viabilidade da linhagem tumoral HCT-116 determinado pelo ensaio de exclusão de azul de Tripán após 24 horas de tratamento



(A) Curva do percentual de viabilidade celular de células HCT-116 considerando a média da densidade celular do controle negativo como 100%. (B) 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 recebeu o veículo utilizado para diluição do composto (DMSO). Fonte: Própria autoria (2024).

Figura 10 – Efeito da bis-chalcona L08 na viabilidade da linhagem tumoral HCT-116 determinado pelo ensaio de exclusão de azul de Tripán após 48 horas de tratamento



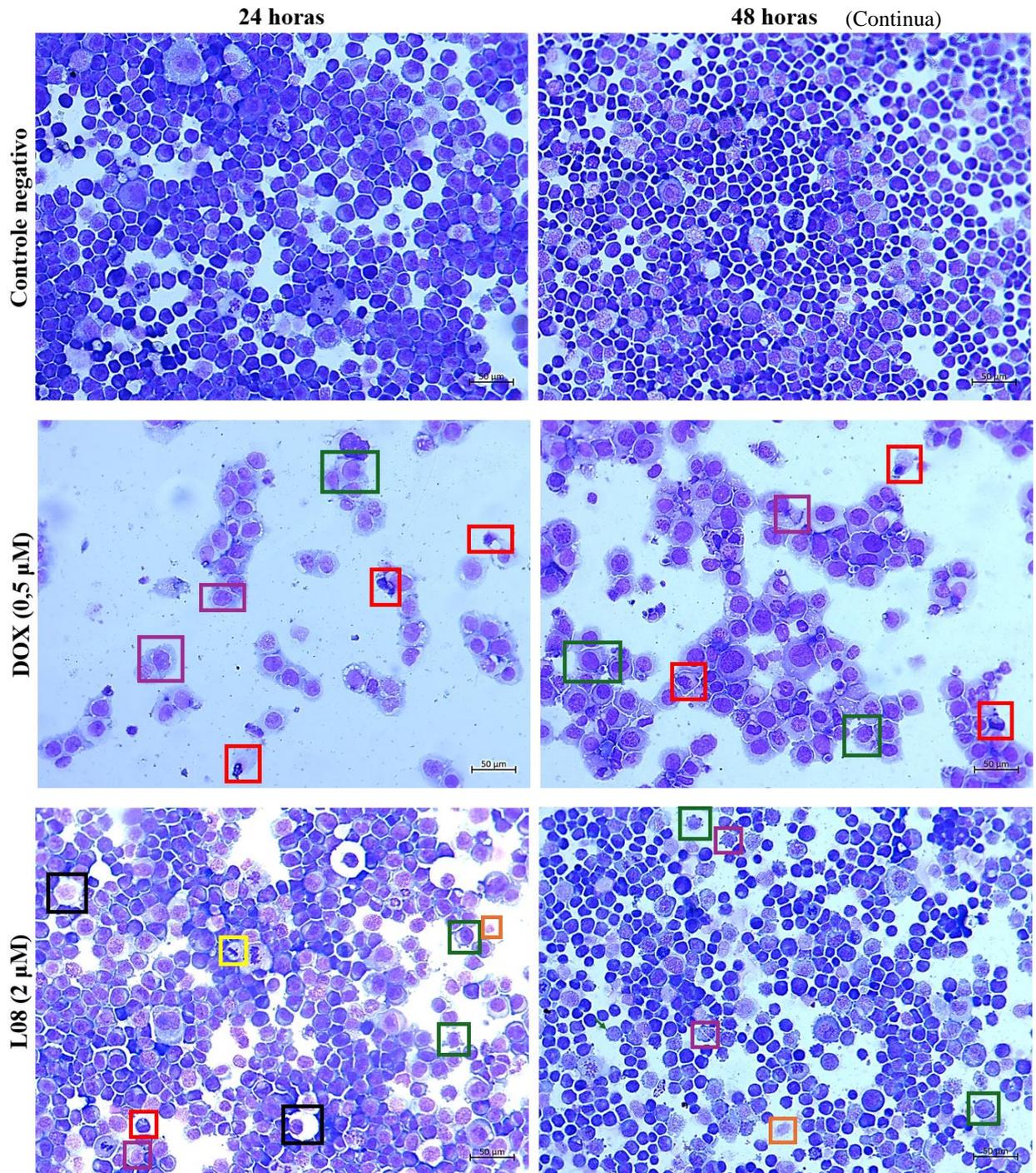
(A) Curva do percentual de viabilidade celular de células HCT-116 considerando a média da densidade celular do controle negativo como 100%. (B) Os dados correspondem à média ± E.P.M. de no mínimo dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$) comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey. O controle negativo recebeu o veículo utilizado para diluição do composto (DMSO). Fonte: Própria autoria (2024).

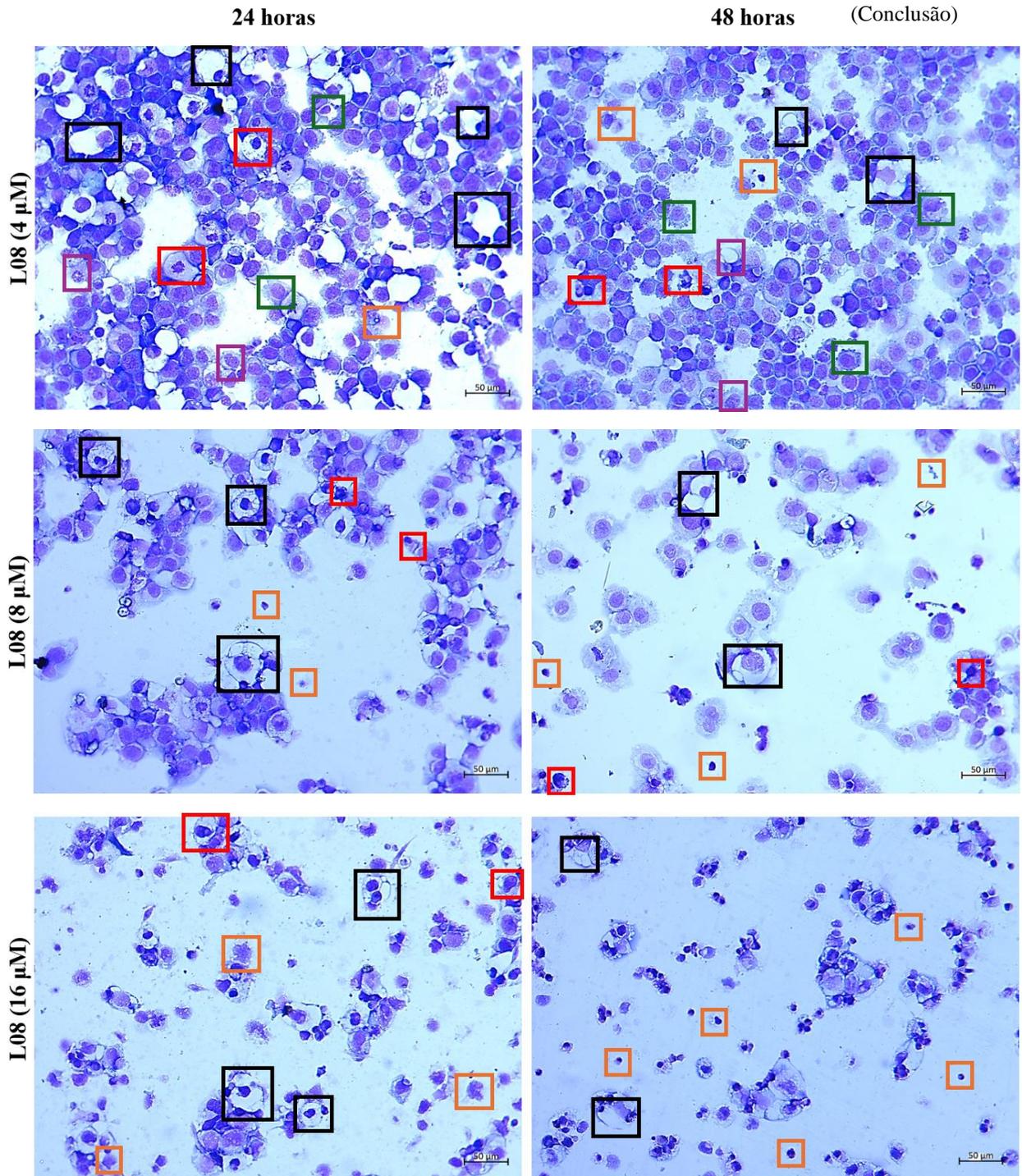
Por meio desse experimento, então, foi possível observar que a L08 foi capaz de reduzir de forma significativa, estatisticamente, o número de células viáveis desde a menor concentração utilizada para ambos os tempos de tratamento (* $p < 0,05$), não interferindo de forma considerável no número de células não viáveis, exceto, unicamente, na concentração de 16 μM em 48h, cerca de 4 vezes a CI_{50} .

5.5. Avaliação das alterações morfológicas por coloração com panótico rápido

Com o intuito de analisar os mecanismos de morte celular envolvidos no efeito citotóxico da bis-chalcona L08, o teste de observação morfológica das células tumorais da linhagem HCT-116, após tempo de exposição de 24h e 48h à amostra, foi realizado por meio do kit panótico rápido, utilizando microscopia óptica (Figura 11).

Figura 11 - Avaliação de possíveis alterações na morfologia celular em células HCT-116 após 24h e 48h de tratamento com bis-chalcona L08, por meio do panótico rápido





Legenda: quadro **verde**: prolongamento da membrana plasmática (“blebs”); quadro **roxo**: alteração de membrana plasmática; quadro **preto**: aumento dos vacúolos citoplasmáticos; quadro **amarelo**: figuras mitóticas; quadro **vermelho**: condensação da cromatina/fragmentação nuclear; quadro **laranja**: restos celulares. Fonte: Própria autoria (2024).

Em relação ao experimento de 24h, observa-se o desde a menor concentração utilizada (2 μM) o surgimento de alterações sugestivas de início de um processo de morte celular, como prolongamento da membrana plasmática (“blebs” ou corpos apoptóticos), aparecimento de vacúolos no citoplasma, condensação da cromatina (picnose) e fragmentação nuclear, assim

como surgimento de restos celulares. Ademais, é importante salientar sobre a diferença na frequência dessas alterações e instauração da morte celular com a elevação na concentração da bis-chalcona, sendo grandezas diretamente proporcionais, como podemos observar principalmente nos tratamentos de 8 μM e 16 μM , que já apresenta maior rarefação celular e presença de restos secundários ao processo de morte consumado. Por sua vez, após as 48h de tratamento com a amostra, não mostra significativa diferença morfológica do processo de morte iniciado já ao tratamento de 24h, observando-se, também, corpos apoptóticos, mudança na membrana plasmática, condensação e fragmentação nuclear. A diferença visualizável entre os tempos de 24h e 48h é justamente a maior rarefação neste último, principalmente nas concentrações de L08 de 8 μM e 16 μM . As mudanças na morfologia celular, presença de “*blebs*”, picnose e a objetiva visualização de rarefação celular em progressão com o aumento da concentração de amostra, podem indicar a indução da morte celular por apoptose ou autofagia.

As células tratadas com a DOX a 0,5 μM , utilizada como controle positivo do experimento, apresentaram alterações características de indução de morte celular, como formação dos prolongamentos da membrana plasmática (corpos apoptóticos), aparecimento de vacúolos citoplasmáticos e rarefação celular, mais uma vez, indicativos de morte celular programada.

As bis-chalconas apresentaram efeitos antiproliferativos significativos, sobretudo a L08, uma vez que os resultados dos experimentos, acima descritos, explicitam que as substâncias possuem efeito citotóxico tempo-dependente frente a HCT-116 e promove a morte celular por apoptose e/ou autofagia. Esses resultados, portanto, coincidem com os referenciais na literatura e serão discutidos na seção seguinte.

6. DISCUSSÃO

As bis-chalconas são precursoras dos flavonoides, abundantes em diversas plantas, portanto, ocorrem naturalmente ou podem ser sintetizadas a partir de chalconas (Pereira *et al.*, 2023). Essas moléculas são relativamente menos exploradas na literatura do que as chalconas, contudo, existem estudos embrionários que demonstram uma série de atividades biológicas promissoras, como anti-inflamatória (Mahapatra; Bharti; Asat, 2017), antioxidante (Bandgar *et al.*, 2010), anticancerígena (Mahapatra; Bharti; Asati, 2015) e antidiabética (Rocha *et al.*, 2020).

Yang e colaboradores (2020), observaram efeitos citotóxicos de análogos de bis-chalconas sintéticas frente a linhagem de células de câncer de pulmão (A549), após 48h de tratamento *in vitro* com as amostras pesquisadas. Nesse estudo, foram determinados valores de CI_{50} que variaram de $5.5 \mu M \pm 0.7$ até $52.3 \mu M \pm 1.1$ para as moléculas que apresentaram algum efeito citotóxico. Ainda segundo os autores, as bis-chalconas testadas afetavam diversas vias moleculares das células, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), fatores de crescimento endotelial vascular e a via PI3/AKT, além de induzir apoptose, reduzir viabilidade e proliferação das células (Liu *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

Li e colaboradores (2023) sintetizaram oito conjugados de bis-chalconas com ligante de lisina por reação de alquilação e pesquisaram a atividade antiproliferativa dessas substâncias contra linhagens de câncer de fígado (MHCC-97H), colorretal (HCT-116) e câncer gástrico (TMK1). Entre os resultados obtidos, as bis-chalconas sintetizadas apresentaram maiores citotoxicidade às células de câncer gástrico, CI_{50} de $22,29 \mu M$ para a linhagem TMK1, próximo ao 5-Fluorouracil (5-FU), que foi utilizado como controle positivo e apresentou CI_{50} de $15,7 \mu M$, e CI_{50} de $22,14 \mu M$ para a linhagem AGS, configurando as bis-chalconas como promissores agentes inibitórios tumorais para algumas linhagens de câncer.

No presente estudo, as duas bis-chalconas sintéticas inéditas L05 e L08 apresentaram efeitos citotóxicos frente a diversas linhagens celulares, explicitadas na Tabela 3. A L05 apresentou efeitos mais promissores em linhagens de melanoma humano (Mel-501), com CI_{50} de $10,7 \mu M$ em 72h, e em células de carcinoma colorretal (HCT-116), com CI_{50} de $16,8 \mu M$ em 72h, sem efeitos tóxicos sobre a célula não-tumoral utilizada. Em relação à L08, os resultados citotóxicos foram mais robustos em 72h, visto que esta chalcona apresentou menores valores de CI_{50} , com destaque também para maior toxicidade sobre as mesmas linhagens celulares destacadas para a L05, sendo CI_{50} de $4,7 \mu M$ para a Mel-501 e de $2,5 \mu M$ para a HCT-116.

Esses resultados encontrados na avaliação da citotoxicidade em 72h corroboram os resultados apresentados por Modzelewska (2006), no qual foi realizado uma série de testes com

onze bis-chalconas sintéticas, os quais exibiram potencial inibitório sobre diversas linhagens celulares, inclusive uma delas apresentando valor de CI_{50} frente à linhagem HCT-116 de 2,8 μM em 72h, semelhante ao encontrado nesta pesquisa. Além disso, Anjos e colaboradores (2021), pesquisaram a atividade antiproliferativa de sete chalconas sintéticas por meio do teste do MTT em 72h utilizando linhagem de adenocarcinoma gástrico (AGP1), observando, mais uma vez, atividade citotóxica em cinco substâncias, com CI_{50} variando de 2,08 μM a 4,99 μM .

A diferença na atividade citotóxica das duas chalconas inéditas L05 e L08 pode estar relacionada aos substituintes da posição *para*- do anel aromático. A presença do substituinte halogenado na L05 pode elevar o efeito indutivo, ou seja, retirar densidade eletrônica do anel aromático, tornando-o mais deficiente em elétrons, o que faz com que a energia livre de ativação para qual quer reação de substituição eletrofílica aromática seja maior do que para o benzeno e, conseqüentemente, os grupos halo são desativadores (Solomons, 2023). Contudo, a atividade das chalconas não depende apenas de sua estrutura; elas podem ter múltiplos alvos e diferentes mecanismos de ação, variando conforme a especificidade do tumor (Anjos, 2021). Em função dessa diferença de atividade entre as chalconas e considerando os melhores resultados obtidos frente à linhagem HCT-116, os passos subsequentes foram realizados com a L08 e as células de câncer colorretal, mais sensível à amostra.

É notório que as bis-chalconas possuem algum mecanismo citotóxico às células tumorais testadas neste trabalho, levando em conta os resultados de CI_{50} obtidos no MTT com e sem o SDS. No entanto, outro dado secundário a esses resultados que é importante ressaltar é o índice de seletividade da L08 em relação à MCF-10A e à HCT-116, sendo cerca de 19 vezes mais seletiva às células de câncer do que as não tumorais em 72h. Ademais, o controle positivo utilizado, Doxorrubicina, é cerca de 12 vezes menos seletivo do que a bis-chalcona, tornando a amostra promissora na especificidade da ação antitumoral. Segundo Souza e colaboradores (2021), o índice de seletividade de chalconas derivadas de eugenol frente a linhagens tumorais (HepG2) e não tumorais (MRC-5) foi de cerca de 11. Outro estudo realizado por Jardim e colaboradores (2014), demonstrou índices de seletividade de diversas chalconas variando de 3 até 79 para linhagem não tumoral (PBMC) em relação a tumoral HL-60. Apesar dos dados na literatura não coincidirem totalmente com a metodologia utilizada por este estudo, observa-se resultados promissores para moléculas semelhantes e pertencentes à mesma classe bioquímica.

Com o intuito de reconhecer possível relação de tempo-dependência da utilização da bis-chalcona em HCT-116, é necessário analisar os dados obtidos em experimentos de 24, 48 e 72h de tratamento com a amostra. Os resultados de CI_{50} em 24 e 48h mostraram que a molécula atua de maneira tempo-dependente, atingindo efeito máximo em 48h, sendo as CI_{50} de 14,7 μM

e 1,9 μM nos tempos de 24 e 48h, respectivamente. A diferença entre os valores foi de cerca de 7,5 vezes maior para o tempo de tratamento de 24h, mostrando, assim, tempo-dependência do efeito para a linhagem. Em dissonância, não houve diferença significativa entre as CI_{50} de 48h (1,9 μM) e 72h (2,5 μM), uma vez que os intervalos de confiança coincidem. De maneira contrária, os resultados do ensaio de pulso-concentração não mostraram diferença significativa entre os valores de CI_{50} para 24h e 30h. Esse fato pode ter embasamento na questão das etapas do método, em função de possível viés experimental, em função da retirada de células com adesão reduzida, o que pode diminuir o valor encontrado de CI_{50} e falsear os resultados. Corroborando a tempo-dependência da ação das chalconas, a literatura, por meio de Anjos e colaboradores (2021), mostra redução importante de viabilidade celular de forma tempo-dependente para todas as chalconas testadas na pesquisa, dentre elas, a substância mais citotóxica apresentou CI_{50} de 7,64 μM em 24h, 3,86 μM em 48h e 2,08 μM em 72h para a linhagem tumoral AGP01 (adenocarcinoma gástrico). Outro estudo desenvolvido por Carvalho (2021), avaliou o efeito citotóxico de uma chalcona e seu perfil tempo-dependente, encontrando valores de CI_{50} de 9,81, 5,67 e 3,56 μM em 24, 48 e 72h de incubação, respectivamente, para linhagem celular HCT-116, exibindo, decerto, uma relação direta entre o tempo de exposição e os efeitos, corroborando os resultados do MTT deste estudo.

O ensaio de exclusão com Azul de Tripán ratificou os resultados encontrados nos testes anteriores de citotoxicidade. O corante em questão possui carga negativa e, por isso, consegue adentrar apenas células com membrana celular rompida, ou seja, células não viáveis (Strober, 2015). Os resultados encontrados apontam que a bis-chalcona L08 age, primeiramente, de maneira tempo-dependente, à medida que a viabilidade celular diminui, com significância estatística, ao aumentar o tempo de tratamento. Observou-se que, em 24h de tratamento, as viabilidades celulares na menor e na maior concentração de L08 foi de 62% e 16%, respectivamente, em relação ao controle negativo. Já em 48h de tratamento, as viabilidades celulares na menor e na maior concentração de L08 foi de 59% e 5%, respectivamente, em relação ao controle negativo. Rego (2021) pesquisou os mecanismos envolvidos na citotoxicidade de uma substância da classe das chalconas, sintética e inédita, em células de câncer colorretal (HCT-116), encontrando a mesma relação tempo-dependência de seus efeitos. Mousinho (2010), estudou o potencial anticâncer de um derivado de chalcona *in vitro* e *in vivo* e, por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán, confirmaram uma diminuição da viabilidade celular, principalmente após 24h de incubação, na maior concentração testada, mostrando o perfil tempo-concentração-dependência da classe pesquisada. Os dados na literatura, portanto,

indicam que os resultados encontrados no presente estudo são semelhantes aos vistos na mesma classe de moléculas.

A morte celular programada constitui-se como um importante mecanismo de controle da homeostasia e podem ser induzidos a partir de resposta a estímulos intra e extracelulares. Os processos de morte podem ocorrer de diversas formas, com características morfológicas distintas, entre eles estão a autofagia e a apoptose (Grivicich; Regner; Rocha, 2007). A apoptose é desencadeada após exposição da célula a determinados estímulos fisiológicos, patogênicos ou citotóxicos (Silva, 2022). Segundo Araújo e colaboradores (2019), a mutação no gene que codifica a proteína p53 ocasiona incapacidade de regulação do ciclo celular, de correção dos erros no DNA e gera proliferação incessante de clones malignos. Algumas mudanças morfológicas são observadas microscopicamente em células que iniciaram o processo de apoptose, como condensação e fragmentação do DNA, prolongamentos e alterações na membrana plasmática (formação dos “*blebs*” e corpos apoptóticos) e redução do volume celular (Tognon; Nunes; Castro, 2013). A autofagia pode ser desencadeada pela falta de nutrientes, hipóxia e danos ao DNA. Durante esse processo, conteúdos citoplasmáticos são envolvidos por vesículas chamadas fagóforos, que se originam da membrana do retículo endoplasmático ou da membrana externa mitocondrial. Esses fagóforos se unem para formar estruturas de dupla membrana chamadas autofagossomas. Quando os autofagossomas se combinam com os lisossomos, formam autolisossomas, responsáveis por decompor e reciclar os conteúdos englobados (Costa, 2018).

A análise morfológica dos efeitos desencadeados pela bis-chalcona L08 em células de câncer colorretal humano, via observação direta por microscopia óptica e utilizando-se a coloração do kit panótico rápido, demonstra que a substância em análise produz um efeito citotóxico sobre a linhagem, uma vez que se pode observar alterações morfológicas desde a menor concentração (2 μ M) no menor tempo de tratamento, intensificando-se com o aumento da concentração e do tempo de incubação. No geral, é possível notar características inegáveis de morte celular, como surgimento de “*blebs*”, alterações na membrana plasmática, condensação nuclear, surgimento de vacúolos citoplasmáticos e rarefação celular importante com o aumento das concentrações de L08, conforme foi explicitado na Figura 11 por meio das setas indicativas. Carvalho (2021), conseguiu identificar, através do mesmo teste de análise morfológica do presente estudo, que a chalcona utilizada frente a HCT-116 também induzia alterações morfológicas características de apoptose, como fragmentação e condensação nuclear, surgimento de corpos apoptóticos e encolhimento celular, semelhante ao controle positivo. Outros estudos têm mostrado que as diversas chalconas testadas na literatura, apresentam efeito

citotóxico potente, induzindo a morte celular por apoptose (Zhao *et al.*, 2017; Mielcke *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Alterações em algumas células, como presença de grandes vacúolos citoplasmáticos, principalmente em maiores concentrações de tratamento, também podem significar a instauração do processo autofágico de morte. Maués (2013), estudou quatro flavonoides, sendo duas flavanas e duas chalconas, concluindo que as substâncias promoveram citotoxicidade e induziram células de glioblastoma C6 murino a iniciarem apoptose e autofagia em combinação. Apesar da análise morfológica realizada neste estudo não ser suficiente para elucidar o processo exato de morte desencadeado pela bis-chalcona testada, algumas características analisadas acima e corroboradas pelos dados encontrados na literatura, indicam, possivelmente, a instauração de algum mecanismo de morte programada, secundários à ação da amostra.

Diante disso, a partir dos estudos iniciais e dos resultados encontrados neste trabalho, pode-se inferir que a bis-chalcona L08 possui efeitos antiproliferativos importantes frente às células de câncer, principalmente em relação à linhagem de carcinoma colorretal humano, com índice de seletividade promissor quando comparado à célula não-tumoral testada nos experimentos de citotoxicidade. Por fim, mais estudos devem ser realizados com a finalidade de elucidar os mecanismos responsáveis pela instauração dos processos de morte celular observados por meio da análise morfológica, além de ratificar a tempo-dependência da amostra em investigação.

7. CONCLUSÃO

Os resultados explicitados neste estudo mostram efeito citotóxico das bis-chalconas sintéticas e inéditas L05 e L08, com destaque de atividade para a segunda amostra, uma vez que apresentou menores valores de concentração inibitória média (CI₅₀) frente a um maior número de linhagens tumorais. Além disso, verificou-se, por meio do ensaio de pulso e de exclusão com Azul de Tripán, que a substância L08 age por meio de uma tempo-dependência em HCT-116, diminuindo a viabilidade celular, com significância estatística, desde a menor concentração testada. Ademais, por meio da análise morfológica, foi possível observar que a bis-chalcona L08 promove o início do processo de morte celular, sendo necessários outros experimentos *in vitro* e *in vivo* para elucidação do mecanismo exato do tipo de morte e consequente ação antiproliferativa da amostra em questão na linhagem estudada e em outras linhagens celulares.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ZIED, H. A. et al. EGFR inhibitors and apoptotic inducers: Design, synthesis, anticancer activity and docking studies of novel xanthine derivatives carrying chalcone moiety as hybrid molecules. **Bioorganic Chemistry**, v. 89, p. 102, ago. 2019.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213–1221, 11 nov. 2016.
- AKSÖZ, B.; ERTAN, R. Chemical and Structural Properties of Chalcones I. **FABAD J. Pharm. Sci**, v. 36, p. 223–242, 2011.
- 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, 1 out. 2019.
- ALVES, I. O. **Reações Adversas ao Medicamento 5-Fluorouracil em Pacientes que Utilizam Protocolo FOLFOX no Serviço de Oncologia de um Hospital de Porto Alegre/RS – Um Estudo Piloto**. 2014. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/158053>. Acesso em: 20 out. 2023.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Basics: What is cancer?** 2015. Disponível em: 2015. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. Acesso em: 16 dez. 2023.
- ANJOS, M. L. dos .; REIS, H. S. dos .; BITENCOURT , H. R. .; GALUCIO, N. C. da R. .; KHAYAT, A. S. .; FILHO, A. P. S. .; MONTEIRO, M. C. . Synthesis and biological evaluation of chalcones and derivatives in vitro against AGP01 cell. **Research, Society and Development**. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23600>. Acesso em: 20 nov. 2024.
- ARAÚJO, G. L. S.; PARRELA, A. F. B.; BORGES, J. M. S.; TRINDADE, J V F.; SOUZA, L T JÚNIOR, M F. Apoptose como perspectiva de cura do câncer: **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**, 2019, Vol 28, p32, Set, 2019.
- TAJUDEEN BALE, A. et al. Chalcones and bis-chalcones: As potential α -amylase inhibitors; synthesis, in vitro screening, and molecular modelling studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 79, p. 179–189, set. 2018.
- BANDGAR, B. P. et al. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1364–1370, fev. 2010.
- BANERJEE, A. et al. Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1224–1232, 1 ago. 2017.
- BLANCO, Marcos Luego; CONDINO NETO, Antonio. O fator nuclear Kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas antiinflamatórias. **Revista de Ciências Médicas**, [S. l.],

v. 12, n. 4, 2003. Disponível em: <https://seer.sis.puc-campinas.edu.br/cienciasmedicas/article/view/1250>. Acesso em: 20 nov. 2024.

BONASSA, E. M. A.; GATO, M. I. R. **Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012. p. 1-16.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **POLÍTICA E PROGRAMA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. 2016. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. 2006. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 20 mar. 2023.

BRASIL. **PORTARIAS Nº 956, 957 e 958 DE 26 DE SETEMBRO DE 2014 — Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde - CONITEC**. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/publicacao_dou_cp20a22_2014.pdf/view>. Acesso em: 20 nov. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>. Acesso em: 20 out. 2023

BRONDANI, P. B. **Substituição Eletrofílica em Aromáticos**. 2006. Disponível em: <https://patyqmc.paginas.ufsc.br/files/2019/07/Substituic%CC%A7a%CC%83o-Eletrofi%CC%81lica-em-Aroma%CC%81ticos.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2024.

BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. [12^a ed.]. Rio De Janeiro Mcgraw-Hill, 2012.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37–39, 1 set. 2003. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300022&lng=en&nrm=iso. Acessado em: 12 de julho de 2024.

CAMARGOS, R. B.; PERINA, F. J.; CARVALHO, D. D. C.; ALVES, E.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; OLIVEIRA, D. F. Chalcones to control *Alternaria alternata* in murcott tangor fruits. **Bioscience Journal**, Uberlândia, MG, v. 32, n. 6, p. 1512–1521, 2016. DOI: 10.14393/BJ-v32n6a2016-33267. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/33267>. Acesso em: 20 nov. 2024.

CARVALHO, M. C. S. **Estudo do efeito citotóxico de chalc6a na linhagem celular de carcinoma de colorretal humano HCT-116**. 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal

do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/61606>. Acesso em: 28 jun. 2024.

CHABNER, B. A. **Terapias dirigidas para alvos: inibidores de tirosinocinase, anticorpos monoclonais e citocinas**. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (org.). *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 12th. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2012. p. 1731-1754.

CHEN, T. et al. The curcumin analogue WZ35 affects glycolysis inhibition of gastric cancer cells through ROS-YAP-JNK pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 137, p. 131, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020>.

CONNOR, T. H.; MCDIARMID, M. A. Preventing Occupational Exposures to Antineoplastic Drugs in Health Care Settings. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 56, n. 6, p. 354–365, 2006. DOI: 10.3322/canjclin.56.6.354. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17135692/>. Acesso em: 28 jun. 2024.

CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N. Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 113, 20 out. 2021. DOI: 10.3390/ijms222111306. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34768736/>. Acesso em: 08 jun. 2024.

COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. 8. ed. Sunderland (UK): Sinauer Associates, 2018.

COSTA, Douglas de Sousa. **Papel da autofagia na modulação da imunopatogênese da malária placentária**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, University of São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/D.42.2018.tde-12112021-173323. Acesso em: 2024-11-20.

CUSTODIO, J. et al. The Influence of Methoxy and Ethoxy Groups on Supramolecular Arrangement of Two Methoxy-chalcones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170067>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/dvtz546gqWxqYV7qkHbktDr/>. Acessado em: 20 de novembro de 2024.

DAS, C. K.; MANDAL, M.; KÖGEL, D. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. **Cancer metastasis reviews**, v. 37, n. 4, p. 749–766, 2018. DOI: 10.1007/s10555-018-9727-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29536228/>. Acessado em: 05 de setembro de 2024.

DAS, M.; MANNA, K.. Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium: A Molecular Insight. **Journal of toxicology**, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7651047>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26880913/>. Acessado em: 06 de setembro de 2024.

DÍAZ-TIELAS, C. et al. BIOLOGICAL ACTIVITIES AND NOVEL APPLICATIONS OF CHALCONES. **Planta Daninha**, v. 34, n. 3, p. 607–616, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582016340300022>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pd/a/GGBWtzRDvBzM8KYYvyPSdhH/>. Acessado em: 09 de setembro de 2024.

DIMMOCK, J. R. et al. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1125–1149, 1 dez. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10519918/>. Acessado em: 20 de novembro de 2024.

DOROTEIO, Najla Leão. Síntese de análogos de bis-chalconas simétricos e não simétricos. 2016. xi, 76 f., il. Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

DOROTEIO, N.; SILVA, W. A. **Síntese de Análogos de Bis-chalconas Simétricos e Não Simétricos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade de Brasília, Brasília. Disponível em: http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/23081/1/2016_NajlaLe%C3%A3oDoroteio.pdf. Acesso em: 20 nov. 2024.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 5 abr. 2021. DOI 10.1002/ijc.33588. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33818764/>. Acessado em: 06 de outubro de 2024.

GOMES, M. et al. Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1210, 25 jul. 2017. DOI: 10.3390/molecules22081210. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28757583/>. Acessado em: 25 de agosto de 2024.

GRIVICICH, I. .; REGNER, A. .; ROCHA, A. B. da . Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n3.1801. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1801>. Acessado em: 12 julho. 2024.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, set. 2015. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.07.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26579471/>. Acessado em: 14 de julho de 2024.

GURR, E. **Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry**. Academic Press. London & New York, 1971.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022204/>. Acessado em: 16 de setembro de 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) (Brasil). Ministério da Saúde. **Estimativa | 2023: incidência de câncer no Brasil**. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 27 agosto 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **QUIMIOTERAPIA: orientações aos pacientes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2013. 16 p. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/quimioterapia-2010.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Deteção precoce do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/deteccao-precoce-do-cancer>. Acesso em: 28 jun. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/ambiente-trabalho-e-cancer-aspectos-epidemiologicos-toxicologicos-e-regulatorios>. Acessado em: 20 de novembro de 2024.

JAMES, S. et al. Cardamonin inhibits colonic neoplasia through modulation of MicroRNA expression. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 24 out. 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-14253-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29066742/>. Acessado em: 15 de outubro de 2024.

JARDIM, G. A. M. et al. Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. **MedChemComm**, v. 6, n. 1, p. 120–130, 1 jan. 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/md/c4md00371c#!divCitation>. Acesso em: 24 de julho de 2024.

JAYASOORIYA, R. G. P. T. et al. Molecular chemotherapeutic potential of butein: A concise review. **Food Chem Toxicol.** v. 112, p. 1–10, 1 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.fct.2017.12.028. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29258953/>. Acessado em: 08 de agosto de 2024.

JOHNSON, R. et al. Aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*): a bioactive C-glucosyl dihydrochalcone with potential to target the metabolic syndrome. **Planta medica**, 2018. DOI: 10.1055/s-0044-100622. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29388183/>. Acessado em: 17 de julho de 2024.

KARTHIKEYAN, C. et al. Advances in Chalcones with Anticancer Activities. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 10, n. 1, p. 97–115, 16 dez. 2014. DOI: 10.2174/1574892809666140819153902. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138130/>. Acessado em: 21 de setembro de 2024.

KOSOKO, A. M.; OLURINDE, O. J.; AKINLOYE, O. A. Doxorubicin induced neuro- and cardiotoxicities in experimental rats: Protection against oxidative damage by Theobroma cacao Stem bark. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 303–317, jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.01.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S240558081630303X>. Acessado em: 24 de setembro de 2024.

KU, S.-K. et al. Antithrombotic activities of aspalathin and nothofagin via inhibiting platelet aggregation and FIIa/FXa. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 6, p. 1080–1089, 18

out. 2014. DOI: 10.1007/s12272-014-0501-7. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25325928/>. Acessado em 13 de julho de 2024.

LEMES, Susy Ricardo, et al. Optical properties and antiangiogenic activity of a chalcone derivate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 204: 685-695.

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, 1 nov. 2018. DOI: 10.1016/j.saa.2018.06.099. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29982160/>. Acessado em: 27 de setembro de 2024.

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, 15 de Setembro de 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135785>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022286023008815>. Acesso em: 09 jul. 2024.

LIU, J.-B. et al. Aurora-A/NF- κ B Signaling Is Associated With Radio-resistance in Human Lung Adenocarcinoma. ***Anticancer research***, v. 39, n. 11, p. 5991–5998, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.21873/anticancer.13804>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31704824/>. Acessado em: 16 de outubro de 2024.

MACHADO, H. et al. **Flavonóides e seu potencial terapêutico**. 2008. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/boletimcbr/article/download/17024/8541>. Acesso em: 09 jul. 2024.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone Derivatives: Anti-inflammatory Potential and Molecular Targets Perspectives. ***Current Topics in Medicinal Chemistry***, v. 17, n. 28, p. 3146–3169, 20 nov. 2017. DOI: 10.2174/1568026617666170914160446. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28914193/>. Acessado em: 14 de setembro de 2024.

MAHAPATRA, D. K. et al. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, v. 98, p. 69–114, 15 jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523415300350>. Acessado em: 01 de novembro de 2024.

MARAVALHO, I. V. S. **Síntese de chalconas e seus derivados heterocíclicos com potencial fotofísico**. 2019. 45 f., il. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química)—Universidade de Brasília, Brasília, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.26512/2019.TCC.22455>. Disponível em: https://bdm.unb.br/bitstream/10483/22455/1/2019_IzabelaVitoriaMaravalho_tcc.pdf. Acessado em: 19 de junho de 2024.

MAUÉS, L. A. L. **Atividade antiproliferativa e antineoplásica de flavonóides da espécie *Brosimum acutifolium* em modelo de glioblastoma in vitro**. 2013. 85 f. Tese (Doutorado) –

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2013. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. Disponível em: https://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/5367/1/Tese_AtividadeAntiproliferativaAntineoplasmica.pdf. Acessado em: 11 de setembro de 2024.

MIELCKE, T. R. et al. Mechanisms underlying the antiproliferative effects of a series of quinoxaline-derived chalcones. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 20 nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16199-3>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16199-3>. Acessado em: 06 de junho de 2024.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 5, 23 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21731>. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21731>. Acessado em: 20 de novembro de 2024.

MOBINIKHALEDI, A; KALHOR, M.; SALEHIFAR, M.; NIKOKAR, I. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of some novel N,N'-disubstituted thiourea, 2-amino thiazole, and imidazole-2-thione derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 6, p. 2947–2954, 27 nov. 2013. DOI: 10.1007/s00044-013-0883-y. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/261295401_Synthesis_characterization_and_antibacterial_activities_of_some_novel_NN'-disubstituted_thiourea_2-Amino_thiazole_and_imidazole-2-thione_derivatives. Acessado em: 12 de maio de 2024.

MODZELEWSKA, A. et al. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 3491–3495, maio 2006. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.01.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16434201/>. Acessado em: 10 de julho de 2024.

MOUSINHO, K. C. **Estudo do potencial anticâncer de um derivado de Chalcona, 1-(4-Nitrofenil)-3-Fenilprop-2-En-1-Ona, in vitro e in vivo**. 2010. 170 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/5787>. Acessado em: 14 de outubro de 2024.

NAKAO, I. A. **SÍNTESE DE CHALCONAS E ISOXAZÓIS DERIVADOS DO EUGENOL E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTIVIRAL E CITOTÓXICO**. 2021. 105 f. TCC (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021. Disponível em: https://monografias.ufop.br/bitstream/35400000/3358/6/MONOGRAFIA_S%C3%ADnteseChalconasIsoxazois.pdf. Acesso em: 25 de outubro de 2024.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, 12 de março de 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>. Acessado em: 20 de novembro de 2024.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 8 fev.

2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/np200906s>. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np200906s>. Acessado em: 20 de novembro de 2024.

NGA, N. T. H. et al. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. **Analytical Biochemistry**, v. 610, p. 113937, 1 dez. 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113937>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269720304693>. Acessado em: 20 de novembro de 2024.

NUTI, E. et al. Synthesis and antiangiogenic activity study of new hop chalcone

Xanthohumol analogues. **European journal of medicinal chemistry**, v. 138, p. 890–899,

2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.024. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28750311/>. Acessado em: 20 de novembro de 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS) (Região das Américas).

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Carga global de câncer aumenta em meio à**

crecente necessidade de serviços. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/1-2-2024-carga-global-cancer-aumenta-em-meio-crecente-necessidade-servicos>. Acesso em: 12 jul. 2024.

OUYANG, Y. et al. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 894, 16 jun. 2021. DOI: 10.3390/biom11060894. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34208562/>. Acessado em: 11 de outubro de 2024.

PEREIRA, R., SILVA, A. M. S., RIBEIRO, D., SILVA, V. L. M., & FERNANDES, E.

(2023). Bis-chalcones: A review of synthetic methodologies and anti-inflammatory

effects. **European journal of medicinal chemistry**, 252, 115280. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115280>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523423002465>. Acessado em: 25 de julho de 2024.

QIN, L. et al. A novel tumour suppressor lncRNA F630028O10Rik inhibits lung cancer

angiogenesis by regulating miR-223-3p. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.

24, n. 6, p. 3549–3559, 1 mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.15044>. Disponível

em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32052546/>. Acessado em: 13 de junho de 2024.

REGO, N. T. D. S. **MECANISMOS ENVOLVIDOS NA CITOTOXICIDADE DE UMA NOVA CHALCONA SULFONAMIDA SINTÉTICA, CSS99 EM CÉLULAS DE**

CÂNCER COLORRETAL (HCT-116). 2021. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência

Biomédicas, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Parnaíba, 2021. Disponível em:

https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/BRCRIS_a499de94a9da1f2095c9086c4582a8f2.

Acessado em: 07 de junho de 2024.

ROCHA, S. et al. Systematic review on anti-diabetic properties of chalcones. **Current**

Medicinal Chemistry, v. 25, 1 out. 2018. DOI:

<https://doi.org/10.2174/0929867325666181001112226>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30277140/>. Acessado em: 14 de agosto de 2024.

RODRIGUES, M. D. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DE NOVOS DERIVADOS 4-TIAZOLIDINONAS**. 2013. 65 f. Tese (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/13321>. Acessado em: 16 de outubro de 2024.

SAHU, N. K. et al. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 209–225, 1 jan. 2012. DOI: 10.2174/092986712803414132. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22320299/>. Acessado em: 24 de abril de 2024.

SCHULZE, M. M. **Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos**. 2007. Disponível em: <https://www.sboc.org.br/sboc-site/revista-sboc/pdfs/12/artigo3.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2024.

SHEIKH, K. A. et al. Advances in Chalcone Derivatives: Unravelling Their Anticancer Potential Through Structure-Activity Studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1299, p. 137154–137154, 2024. DOI: 10.1016/j.molstruc.2023.137154. Disponível em: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2024JMoSt129937154S/abstract>. Acessado em: 09 de julho de 2024.

SHI, M. et al. Anti-Inflammatory Pyranochalcone Derivative Attenuates LPS-Induced Acute Kidney Injury via Inhibiting TLR4/NF- κ B Pathway. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1683, 10 out. 2017. DOI: 10.3390/molecules22101683. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28994737/>. Acessado em: 15 de outubro de 2024.

SILVA, M. H. da. **Síntese de chalconas e bis-chalconas: estudo de moduladores de proteases que atuam na manutenção da hemostasia**. 2021. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/48812>. Acessado em: 29 de Julho de 2024.

SILVA, P. B. N. **Investigação do potencial anticâncer de novos compostos tiossemicarbazídicos**. 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/47657>. Acesso em: 08 de setembro de 2024.

SINGH, A. et al. Piperazine-linked 4-aminoquinoline-chalcone/ferrocenyl-chalcone conjugates: Synthesis and antiplasmodial evaluation. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, n. 4, p. 590–595, 26 abr. 2017. DOI: 10.1111/cbdd.12982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28332319/>. Acesso em: 12 de junho de 2024.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Química Orgânica 1**. 12 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2023.

SONG, Y. et al. Folic acid (FA)-conjugated mesoporous silica nanoparticles combined with MRP-1 siRNA improves the suppressive effects of myricetin on non-small cell lung cancer (NSCLC). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 125, p. 109561, maio 2020. DOI:

10.1016/j.biopha.2019.109561. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32106385/>. Acesso em: 19 de novembro de 2024.

UNIFAL - MG. **SÍNTESE E USO DE CHALCONAS DERIVADAS DO EUGENOL E DIIDROEUGENOL PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER.**, 9 set. 2021. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/i9unifal/wp-content/uploads/sites/87/2024/11/20210909_sintese_cancer.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2024

SOUZA, W. F. DE et al. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 30–33, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000100013>. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000100013. Acesso em: 18 de novembro de 2024.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. **Biodiversidade no Brasil.** In: Simões, C. M. O. et al. (ed.). *Farmacognosia: Da planta ao medicamento.* Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 486.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3.B.1–A3.B.3, 2 nov. 2015. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs111. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6716531/>. Acesso em: 16 de agosto de 2024.

SULLIVAN, B. A.; NOUJAIM, M.; ROPER, J. Cause, Epidemiology, and Histology of Polyps and Pathways to Colorectal Cancer. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, fev. 2022. DOI: 10.1016/j.giec.2021.12.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35361330/>. Acesso em: 16 de agosto de 2024.

TOGNON, R.; NUNES, N. DE S.; CASTRO, F. A. DE. Desregulação da apoptose em neoplasias mieloproliferativas crônicas. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 4, p. 540–544, dez. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082013000400025>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/PCZMM9sNFKGzMjqKbn8LNFk/>. Acesso em: 17 de agosto de 2024.

TSUKERMAN, S. V. *et al.* The infrared spectra of azachalkones. **J Appl Spectrosc**, 1536–1538 (1969). DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00608316>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00608316#citeas>. Acesso em: 11 de agosto de 2024.

WANG, Z. et al. Os Efeitos da Doxorubicina na Biossíntese e no Metabolismo do Heme em Cardiomiócitos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 2, p. 315–322, fev. 2021. DOI: 10.36660/abc.20190437. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7909973/>. Acesso em: 20 de novembro de 2024.

WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer.** New York: Garland Science, 2014.

WEINDORF, N.; SCHULTZ-EHRENBURG, U. Controlled study of increasing venous tone in primary varicose veins by oral administration of *Ruscus aculeatus* and trimethylhesperidin-chalcone. **Zeitschrift fur Hautkrankheiten**, v. 62, n. 1, p. 28–38, jan. 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3554800/>. Acesso em: 10 de junho de 2024.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (ed.) **World cancer report: cancer research for cancer prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: 19 set. 2022

YADAV, P. et al. Synthesis, crystal structure and antimicrobial potential of some fluorinated chalcone-1,2,3-triazole conjugates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 263–274, 1 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.05.055. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29890388/>. Acesso em: 20 de novembro de 2024.

YANG, J.; MU, W.-W.; LIU, G.-Y. Synthesis and evaluation of the anticancer activity of bischalcone analogs in human lung carcinoma (A549) cell line. **European journal of pharmacology**, v. 888, p. 173396, maio 2020. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173396. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32798508/>. Acesso em: 12 de novembro de 2024.

YOU, W. et al. Cardamonin protects against adverse cardiac remodeling through mTORC1 inhibition in mice with myocardial infarction. **Die Pharmazie**, v. 73, n. 9, p. 508–512, jan. 2018. DOI: 10.1691/ph.2018.8600. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30223933/>. Acesso em: 09 de setembro de 2024.

YU, Y-R.; HO, P-C. Sculpting tumor microenvironment with immune system: from immunometabolism to immunoediting. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 197, n. 2, p. 153–160, 1 abr. 2019. DOI: 10.1111/cei.13293. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30873592/>. Acesso em: 16 de setembro de 2024.

ZHANG, M. et al. New cytotoxic withanolides from *Physalis minima*. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104728, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104728>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X20303105>. Acesso em: 19 de novembro de 2024.

ZHANG, S. et al. A novel chalcone derivative S17 induces apoptosis through ROS dependent DR5 up-regulation in gastric cancer cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 29 ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10400-3>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-10400-3>. Acesso em: 12 de setembro de 2024.

ZHAO, X. et al. Novel indolyl-chalcone derivatives inhibit A549 lung cancer cell growth through activating Nrf-2/HO-1 and inducing apoptosis in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 20 jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04411-3>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-04411-3>. Acesso em: 11 de agosto de 2024.

ZHOU, D. et al. Antiviral properties and interaction of novel chalcone derivatives containing a purine and benzenesulfonamide moiety. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 28, n. 11, p. 2091–2097, Autumn 2018. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.04.042. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29724588/>. Acesso em: 10 de julho de 2024.

ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 28 jun. 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020>. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.7b00020>. Acesso em: 22 de agosto de 2024.