



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAIBA  
BACHARELADO EM BIOMEDICINA  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO**

**RAISSA DO NASCIMENTO FURTADO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE BISCHALCONAS  
SINTÉTICAS INÉDITAS (L01 E L03) EM CÉLULAS TUMORAIS E NÃO  
TUMORAIS**

**PARNAÍBA-PI**

**2024**

RAISSA DO NASCIMENTO FURTADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE BISCHALCONAS  
SINTÉTICAS INÉDITAS (L01 E L03) EM LINHAGENS TUMORAIS E NÃO  
TUMORAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Campus  
Ministro Reis Veloso, como requisito obrigatório  
para obtenção do título de Bacharelado em  
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho  
Filho

PARNAÍBA-PI

2024

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
2.1 Câncer .....	12
2.1 Chalconas .....	14
2.3 Bischalconas .....	16
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivo geral .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1 Materiais .....	19
4.1.1 Obtenção das Bischalconas .....	19
4.1.2 Cultura celular .....	20
4.2 Métodos .....	22
4.2.1 Ensaio de citotoxicidade MTT .....	21
4.2.2 Ensaio de citotoxicidade MTT com SDS .....	22
4.2.3 Teste em pulso tempo-concentração .....	23
4.2.4 Ensaio de exclusão por azul de tripano.....	23
4.2.5 Teste da análise morfológica - coloração por panótico rápido .....	24
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho. Ademais, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus pais e a minha irmã, os quais me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. À minha Vó Ivonete, por toda a sua delicadeza e cuidado. À minha prima Jéssica, pelo incentivo à pesquisa e crescimento do laboratório e pelas oportunidades dadas.

Agradeço ao Prof. Dr. Delano Marinho, por ter sido meu orientador e ter desempenhado tal função com paciência e dedicação. À Profa. Dra. Ana Jérsia Araújo, pelo conhecimento repassado e pela sua disponibilidade durante as etapas do estudo. À Profa. Dra. Caridad Noda Peres pela síntese química das amostras utilizadas neste estudo e pela parceria e confiança.

Não poderia deixar de agradecer também a toda a equipe do LCC DELTA, companheiros que foram imprescindíveis na minha caminhada, obrigada por todo o apoio e amizade.

Agradeço ao CNPQ, CAPES, FAPEPI e a UFDPAR pela estrutura e apoio financeiro para realização de o primeiro trabalho científico de grande magnitude.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado. Às pessoas com quem convivi ao longo da graduação, que me incentivaram e que, portanto, tiveram impacto na minha formação acadêmica.

## RESUMO

O câncer é considerado uma doença multifatorial de caráter mutacional e proliferativa que possui um crescimento desordenado de células com alta capacidade invasiva, podendo se espalhar por tecidos e órgãos. Muitos são os esforços na busca de novos compostos efetivos no tratamento do câncer e as chalconas ultimamente tem se destacado como promissoras devido ao seu potencial anticâncer. Porém, ainda são escassos os estudos relatando sua atividade citotóxica e citostática. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antiproliferativo das bischalconas (sintéticas) L01 e L03 em linhagens tumorais e os mecanismos de ação envolvidos na sua atividade inibitória, por meio de ensaios *in vitro*. As amostras (L01 e L03) foram testadas em oito linhagens tumorais (NCI-H460, Mel501, B16-F10, MDA-MB-231, HCT-116, HL-60, KG-1a, K-562) e duas linhagens não-tumorais (L929 e MCF10a) pelo método de MTT em concentrações seriadas pelo período de 24, 48 e 72h. Através do teste de MTT, após 72 h de tratamento, foi observado que as amostras obtiveram valores de  $CI_{50}$  que variaram de 9,25 a 78,8  $\mu\text{M}$  em células tumorais e 47,6  $\mu\text{M}$  em células não tumorais. Diante dos resultados, a amostra bischalcona (L01) foi escolhida para prosseguir com os testes na linhagem tumoral de cólon humano HCT-116. Inicialmente foi realizado o tratamento de pulso do composto (L01) por 24 e 48 horas, no entanto, a amostra não apresentou perfil de tempo-dependência. Após os testes de MTT foi avaliado o perfil citotóxico da amostra através do teste azul de tripano onde comprovamos que as concentrações de 8 e 16  $\mu\text{M}$  interferiam na viabilidade das células HCT-116 após o tempo de 24h. Mediante a análise morfológica pela coloração com panótico rápido foi possível observar alterações nas concentrações de 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$  como rarefação celular, alteração na membrana citoplasmática, figuras mitóticas, vacúolos e aparecimento de algumas células com corpos apoptóticos. Posto isto, possivelmente o efeito citotóxico da L01 em células HCT-116 pode estar relacionado com indução de morte celular por apoptose, autofagia e/ou anoikis.

**Palavras-chave:** Chalconas; Bischalconas; Câncer; Atividade antiproliferativa.

## ABSTRACT

Cancer is considered to be a multifactorial disease of a mutational and proliferative nature that involves the disorganized growth of cells with a high invasive capacity, which can spread to tissues and organs. Many efforts have been made to find new compounds that are effective in the treatment of cancer and chalcones have recently stood out as promising due to their anticancer potential. However, studies reporting their cytotoxic and cytostatic activity are still scarce. In this context, this work aims to evaluate the antiproliferative effect of (synthetic) bischalcones L01 and L03 on tumor cell lines and the mechanisms of action involved in their inhibitory activity, through in vitro assays. The samples (L01 and L03) were tested on eight tumor cell lines (NCI-H460, Mel501, B16-F10, MDA-MB-231, HCT-116, HL-60, KG-1a, K-562) and two non-tumor cell lines (L929 and MCF10a) using the MTT method in serial concentrations for 24, 48 and 72 hours. Through the MTT test, after 72 h of treatment, it was observed that the samples obtained CI50 values ranging from 9.25 to 78.8  $\mu\text{M}$  in tumor cells and 47.6  $\mu\text{M}$  in non-tumor cells. In view of the results, the bischalcone sample (L01) was chosen to continue the tests on the HCT-116 human colon tumor line. Initially, pulse treatment of the compound (L01) was carried out for 24 and 48 hours, however, the sample did not show a time-dependent profile. After the MTT tests, the cytotoxic profile of the sample was evaluated using the trypan blue test, where we found that the concentrations of 8 and 16  $\mu\text{M}$  interfered with the viability of the HCT-116 cells after 24 hours. Morphological analysis using rapid panoptic staining revealed alterations at concentrations of 4, 8 and 16  $\mu\text{M}$ , such as cell rarefaction, alterations to the cytoplasmic membrane, mitotic figures, vacuoles and the appearance of some cells with apoptotic bodies. That said, the cytotoxic effect of L01 on HCT-116 cells may possibly be related to the induction of cell death by apoptosis, autophagy and/or anoikis.

**Keywords:** Chalcones; Bischalcones; Cancer; Antiproliferative activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Marcas do câncer.....	19
<b>Figura 2.</b> Propriedades das chalconas.....	20
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas.....	19
<b>Figura 4.</b> Efeito da Bischalcona L01 na viabilidade de HCT-116 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Tripán após 24 e 48 horas de tratamento.....	29
<b>Figura 5.</b> Avaliação das alterações morfológicas pela bischalcona L01 após 24 e 48 horas de tratamento.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens celulares testadas .....	20
<b>Tabela 2.</b> Efeito antiproliferativo de bischalconas em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de incubação.....	27
<b>Tabela 3.</b> Ensaio de pulso de tempo com a linhagem de células tumorais HCT-116.....	28
<b>Tabela 4.</b> Efeito da Bischalcona L01 na viabilidade de HCT-116 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Tripán após 24 e 48 horas de tratamento.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CI50	Concentração Inibitória Média
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido DNA Deoxyribonucleic acid
DOX	Doxorrubicina
IC	Intervalos de Confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
PBS	Solução salina tamponada com sais de fosfato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino

## 1 INTRODUÇÃO

O termo câncer refere-se a um conjunto de doenças de origem genética e/ou epigenética, que implica na proliferação de células anormais que crescem além de seus limites habituais (WEINBERG, 2013; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016). As células mutadas possuem mecanismos como prevenção contra supressores de crescimento, angiogênese e resistência à morte celular, características associadas a habilidade adquirida na formação de tumores malignos (HANAHAN, 2022). Atualmente, a intervenção para o tratamento de câncer ainda requer o uso da quimioterapia e radioterapia. Todavia, os pacientes em seus tratamentos demonstram ter efeitos colaterais e as consequências causadas por essa terapia continuam sendo contestadas (BANERJEE, 2017).

Os quimioterápicos atuam tanto em células de tecidos saudáveis quanto em tecidos malignos, por não possuir uma grande seletividade podem causar danos a qualidade de vida do paciente durante e após o tratamento, limitando, assim, a dose terapêutica de medicamentos anticâncer (FERREIRA *et al.*, 2015). Portanto, a busca por compostos que apresentam amplas propriedades antitumorais e baixa toxicidade ao organismo humano, demonstrando-se uma melhor alternativa para desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (ANDRICOPULO *et al.*, 2009).

As chalconas são substâncias derivadas da família dos flavonoides e isoflavonóides adquiridas a partir da biossíntese desses compostos fenólicos. São moléculas que têm se demonstrado promissoras ao adicioná-las grupos orgânicos, como substituintes do anel aromático (OUYANG *et al.*, 2021). Para realizar sua síntese, as moléculas, denominadas bischalconas simétricas, são obtidas a partir de duas partes de chalconas, assim sendo, a união delas é possível obter cadeias carbônicas de proporção e arranjos distintos, com simetria molecular (GANESA, 2017; YUSUF, 2013).

Na literatura há descrições em que essas moléculas possuem atividades biológicas importantes como potencial anticancerígeno, antibacteriano e antimalárico (BONAKDAR, 2017). Estudos que exploraram a introdução de núcleos entre os anéis aromáticos, com um grupo clorofenil no carbono carbonílico e um grupo tiazolínico no carbono  $\beta$  insaturado, em derivados da acetamido chalcona, revelaram uma atividade citotóxica promissora em várias linhagens de células tumorais distintas. (SANTOS, 2008).

Modzelewska *et al.* (2006) examinaram uma série de novas chalconas e bischalconas contendo ácido borônico em sua composição. Seus resultados demonstraram que cinco desses compostos inibem o crescimento de linhagens celulares de câncer de mama humano (MDA-MB-231 e MCF7) com valores de  $CI_{50}$  na ordem de nanomolar. Além disso, Winter *et al.* (2014) mencionaram em seu estudo que as bischalconas simétricas têm a capacidade de inibir proteínas resistentes responsáveis pela progressão do câncer de mama do tipo ABCG2. Esses compostos exibiram um excelente potencial anticâncer.

Existem diversos estudos com a classe, mas é necessário explorar novas moléculas que apresentem melhores efeitos e mecanismo de ação que supere as técnicas de evasão que as células tumorais apresentam (HASSAN *et al.*, 2014). Diante disso, o presente trabalho visa a investigação do efeito antiproliferativo de bischalconas sintéticas inéditas (L01 e L03) em linhagens tumorais e não tumorais.

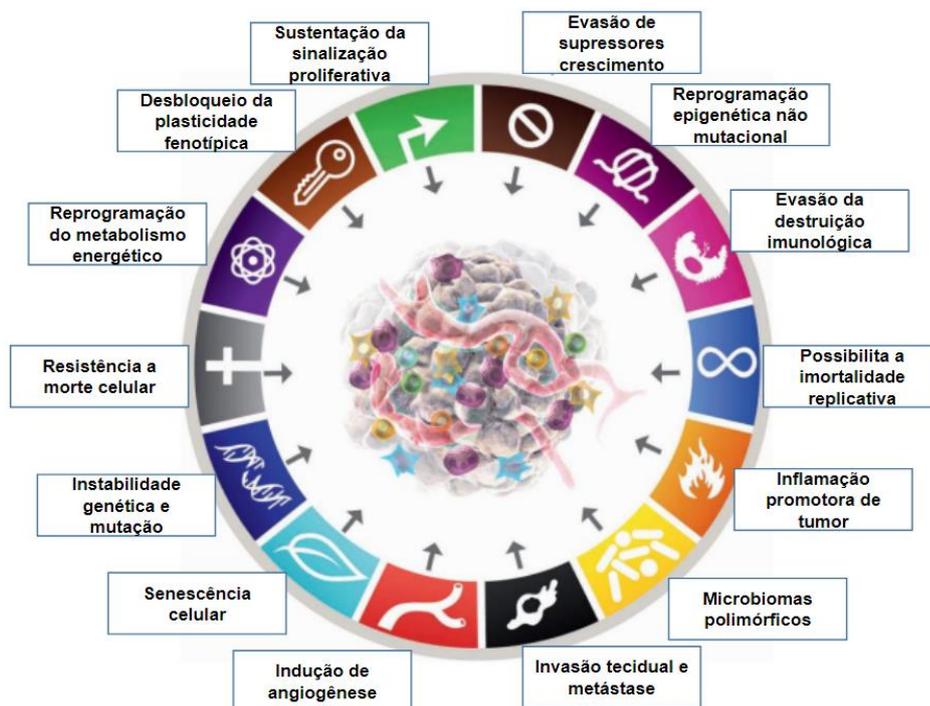
## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Câncer**

O câncer é uma doença hiperproliferativa, no qual há alterações no aparato celular, levando à desordem na multiplicação das células. É considerado um dos principais e mais complexos problemas de saúde pública mundial, corroborado por sua magnitude epidemiológica, social e econômica (INCA, 2022). No organismo normal, as células crescem e se multiplicam conforme necessário. Ao atingirem sua vida útil ou sofrerem danos, genes normalmente ajudam a controlar as células quando se dividem para produzir novas células, reparar erros no DNA ou levá-las a morte celular programada. As células cancerígenas, por sua vez, resultam de equívocos genéticos que podem ser hereditários ou causados por fatores ambientais (AMERICAN CÂNCER SOCIETY, 2022).

Estas alterações podem ser anomalias cromossômicas, ganho de função, perda de função, polimorfismos ou implicações na integridade genética. Essa instabilidade genética, que pode levar à resistência aos medicamentos utilizados ainda durante o tratamento, pode levar ao desenvolvimento das seguintes condições oncogênicas: evasão de supressores crescimento, resistência a morte celular, imortalidade replicativa, indução a angiogênese, destruição imunológica, invasão tecidual e metástase caracterizam a complexidade das doenças neoplásicas. Uma vez que apresentam estes mecanismos de evasão, as células tumorais acabam burlando o organismo celular e até mesmo o tratamento quimioterápico por não ser específico para células malignas (Figura 1) (HANAHAN, 2022).

**Figura 1:** Marcas de Câncer.



Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2022;

Segundo o IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer), a estimativa é de mais de 35 milhões de novos casos de câncer em 2050, um aumento de 77% em relação aos 20 milhões de casos estimados em 2022. Os cânceres mais incidentes no mundo, conforme o Observatório Mundial do Câncer da IARC, têm-se em destaque o câncer de pulmão com 2,5 milhões de novos casos, representando 12,4% de todos os novos casos. Por outro lado, o câncer de mama feminino encontra-se em segundo lugar (2,3 milhões de casos; 11,6%), seguido pelo câncer colorretal (1,9 milhão de casos; 9,6%) (IARC, 2024).

As formas de tratamento do câncer incluem cirurgias, radioterapia e tratamento sistêmico, abrangendo quimioterapia, terapia direcionada, terapia hormonal e imunoterapia (MILLER, 2019). Conforme Banerjee (2017), as reações adversas causadas pela toxicidade dos medicamentos ainda é uma questão desafiadora associada à quimioterapia. Uma vez que, os agentes quimioterápicos atuam em tecidos ou órgãos saudáveis, não direcionados pelo tratamento, podem prejudicar a qualidade de vida do paciente durante e após o tratamento limitando fazendo-se necessário a definição de alvos terapêuticos mais pertinente para essa população (FERREIRA *et al.*, 2015).

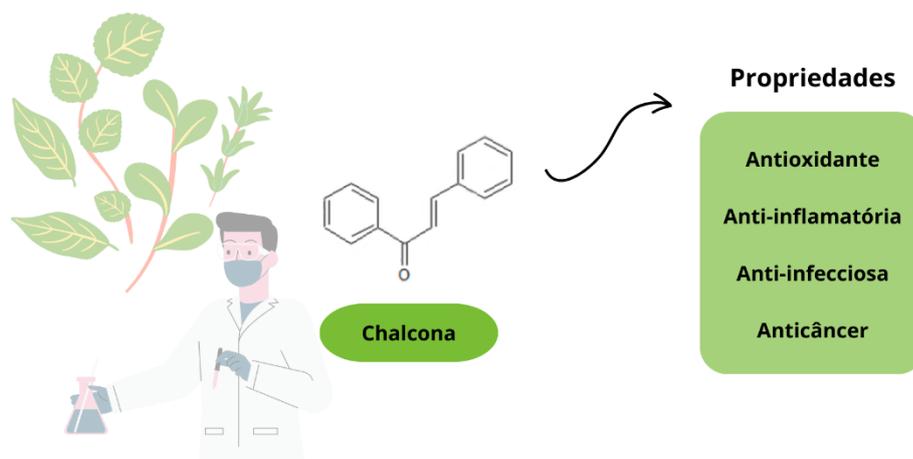
Diante disso, a pesquisa oncológica está à procura de novas e eficazes terapias que possam reduzir os efeitos colaterais causados pelos tratamentos convencionais. Exemplo de novas alternativas para terapia são os compostos naturais puros denominados de chalconas,

várias moléculas derivadas da mesma foram aprovadas para uso clínico e pesquisas em humanos (VIERA *et al.*, 2020).

## 2.2 Chalconas

As chalconas são moléculas precursoras na biossíntese dos flavonóides e isoflavonóides sendo metabólitos secundários naturais encontrados em pigmentos de plantas nas folhas, frutas e outras partes das plantas (KARTHIKEYAN *et al.*, 2015; OUYANG, 2021). As chalconas foram inicialmente sintetizadas, em laboratório no final dos anos 1800, e isoladas de recursos naturais apenas em 1910 (AKSÖZ, 2011). Após serem descritas, as Chalconas vêm apresentando propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, citotóxica imunossupressora e anticâncer (Figura 2) (ORLIKOVA, *et al.*, 2011; LEÓN-GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

**Figura 2:** Propriedades das chalconas.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A condensação aldólica, tipo Claisen-Schmidt, é um método na área da química sintética, na qual é adquirida as chalconas, através de uma acetofenona e o benzaldeído na presença de um catalisador ácido ou básico. Devido sua acessibilidade, a condensação aldólica catalisada por base é geralmente a rota mais utilizada para a síntese da chalcona (DAVEY, 1957; SAIYAD, 1937).

A relevância destes compostos decorre da sua simplicidade química, facilidade de síntese e capacidade de substituir um grande número de átomos de hidrogênio para formar grande número de derivados biologicamente ativos. Uma particularidade associada às

chalconas é que estes compostos constituem facilmente ligações carbono-carbono, carbono-enxofre, e ligações carbono-nitrogênio, que são precursoras da síntese de vários compostos heterociclos como pirimidinas, piridinas, benzodiazepínicos, pirazóis, 2-pirazolinas, imidazol e todos os outros flavonóides (CONSTANTINESCU, 2021).

Derivados sintéticos de chalcona-triazol também foram mencionados recentemente na literatura e demonstraram serem eficazes como agentes antibacterianos, anticancerígenos, antioxidantes, antituberculosos e antimaláricos (BHUKAL *et al.*, 2023). Este estudo relatou resultados relevantes sobre a atividade antibacteriana *in vitro* contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger* (PRASAD *et al.*, 2023). Em relação ao potencial anticancerígeno, observaram-se que os derivados de chalcona-1,2,3 triazol apresentam efeitos anti-osteossarcoma em linhagens celulares de câncer, câncer de fígado, câncer de pulmão e células de câncer cervical (SU *et al.*, 2022).

Segundo o estudo de Karthiyan e colaboradores (2015), as chalconas desempenham o papel de citototoxicidade mediante a variedade de mecanismos como bloqueio na formação de novos vasos sanguíneos, parada no ciclo celular, inibição da polimerização da tubulina e morte celular programada. Uma pesquisa realizada com derivados heterocíclicos de chalcona em linhagens cancerosas de MCF-7 (mama), A549 (pulmão), HepG2 (fígado) e HCT-116 (colorretal), revelou o potencial anticâncer dessa classe de moléculas particularmente contra a linhagem celular MCF-7. Os compostos também podem exercer atividade contra a proteína tubulina, um fato relevante, devido a tubulina desempenhar um papel essencial na estrutura e função do citoesqueleto e a sua inibição pode interferir no processo de divisão celular, levando à morte das células cancerosas (MAGALHÃES, 2019; SHEIKH *et al.*, 2023).

Além disso, é mencionado no estudo de SHEIKH *et al.*, (2023) que os compostos se direcionam ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o que é pertinente, pois o EGFR é um receptor de membrana celular que se encontra superexpresso em células cancerígenas e desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento celular, na sobrevivência e na propagação do câncer. Os inibidores de EGFR são uma alternativa terapêutica, uma vez que podem interferir nessas vias de sinalização e ajudar a controlar o crescimento do tumor (HUANG, 2015; TOMASELLO *et al.*, 2018).

Outro aspecto indicado pelo estudo é a atividade significativa desses compostos contra as enzimas topoisomerases (SHEIKH *et al.*, 2023), isto é, enzimas responsáveis pela resolução das dificuldades geradas durante processos que requerem o desenrolamento das fitas de DNA incluindo a replicação celular. Nesse sentido, os compostos inibidores da topoisomerase têm

sido alvos de várias pesquisas devido sua superexpressão em processos fisiológicos de proliferação celular (BUZUN *et al.*, 2020). Logo, essas moléculas possuem um amplo espectro de ação contra o câncer, interferindo em múltiplos processos essenciais para a sobrevivência e proliferação das células tumorais. Isso os torna candidatos promissores para o desenvolvimento de terapias anticâncer mais eficazes e direcionadas.

### 2.3 Bischalconas

Na década de 70, foram publicados os primeiros estudos acerca das bischalconas em que havia a busca por amplas propriedades das chalconas pelo pesquisador Tsukerman *et al.* (1970), visto que realizava a avaliação da atividade luminescente das “dichalconas” e “isodichalconas” e consecutiva investigação das atividades biológicas (DOROTEIO, 2016). Para alcançar a estrutura das moléculas denominadas bischalconas simétricas são utilizadas duas partes de chalconas, a partir da união delas é possível obter cadeias carbônicas de proporção e arranjos distintos, com simetria molecular (GANESA, 2017; YUSUF, 2013). Dessarte, foram descritas inúmeras condições de rota sintética por vários autores, tendo em vista que as vias de catálise ácida e básica são as mais notáveis (BERNARDES *et al.*, 2017; SIDDIQUI, 2014).

As propriedades biológicas e sua estrutura estão sujeitas a modificações devido ao posicionamento de cada porção chalcona. As bischalconas apresentam um anel aromático consistente na porção central e pode ser substituído em C1, C3 ou C1, C4 (TUTAR, 2019; GHONEIM, 2020). Conforme o estudo de Pereira *et al.* (2023), a classe dos compostos deve dispor de dois anéis arila ligados às extremidades de um dos sistemas centrais de cetonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas. Existem uma variedade de compostos que possuem a estrutura química similar as bischalconas por apresentarem o sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, entretanto, não podem ser classificados como bischalconas.

De acordo com Doroteio (2016), a síntese das bischalconas se dá por meio da seleção de um núcleo aromático que proporcione a condensação aldólica, comumente, o tereftaldeído ou o diacetilbenzeno. O procedimento de síntese mais utilizado nos estudos para a obtenção de bischalconas simétricas envolve 1 mol do núcleo escolhido para 2 mols de um aldeído ou cetona, não se distinguindo muito das chalconas, porquanto acontece através da condensação de Claisen-Schmidt.

Em seu estudo, Abou-zied e colaboradores (2019) sintetizaram e caracterizaram novos compostos híbridos de xantina/chalcona para investigar seu efeito antiproliferativo e citotóxico em linhagens de células cancerígenas de Panc-1 (pâncreas), MCF-7 (mama), HT-29 (cólon) e A-549 (epitelial). Nos resultados, sete compostos demonstraram-se mais ativos, dentre eles os derivados de xantina substituída por 1,3-dimetil e xantina substituída por 1-metil exibiram inibição potente do crescimento de células cancerígenas com  $CI_{50}$  variando de  $1,0\pm 0,1$  a  $3,5\pm 0,4$   $\mu\text{M}$  em comparação com a doxorrubicina com  $CI_{50}$  variando de  $0,90\pm 0,62$  a  $1,41\pm 0,58$   $\mu\text{M}$ .

A morte programada das células, conhecida como apoptose, desempenha um papel fundamental na formação corporal e na manutenção do equilíbrio dos tecidos. Contudo, em situações patológicas, principalmente no caso do câncer, as células perdem a habilidade de passar por esse processo de morte celular, resultando em um crescimento irregular e descontrolado (LESHCHINER *et al.*, 2013). Pande e colaboradores (2017) observaram por meio da análise do ciclo celular que os derivados de chalconas hidroxiladas apresentaram indução a apoptose em mais de 30% das células de câncer colorretal (HCT-116) com parada do ciclo celular na fase G2/M.

Os conjugados de ligantes bischalcona e lisina foram sintetizados através de reações de alquilação e testados contra câncer de fígado (MHCC-97H), câncer colorretal (HCT-116) e câncer gástrico (TMK1), cujo composto conjugado bischalcona 3a demonstrou uma supressão tumoral promissora para certos tipos de câncer gástrico (LI, ZHIFEN, *et al.*, 2023). Uma distinta série de bishalconas do tipo terpenóide com substituintes halogênicos foi mencionada no estudo de Lima *et al.* (2019) e demonstraram valores inibitórios semelhantes aos da doxorrubicina quando testados em três linhagens celulares de câncer, sistema nervoso central (SF29), mama (OVCAR-8) e cólon (HCT-116).

À vista disso, o presente trabalho tem por objetivo a avaliação do efeito antiproliferativo de bischalconas sintéticas inéditas (L01 e L03) em diversas linhagens de células tumorais e não tumorais.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar do efeito antiproliferativo de bischalconas sintéticas inéditas (L01 e L03) em linhagem de células tumorais e não tumorais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito citotóxico das bischalconas L01 e L03 contra linhagens de células tumorais e não tumorais *in vitro*, por meio do método de MTT;
- Analisar o perfil tempo-dependência da bischalcona L01 em linhagem de câncer de cólon humano (HCT-116);
- Avaliar a viabilidade celular utilizando o ensaio de exclusão por azul de tripano e identificar possíveis alterações morfológicas induzidas pela bischalcona L01;

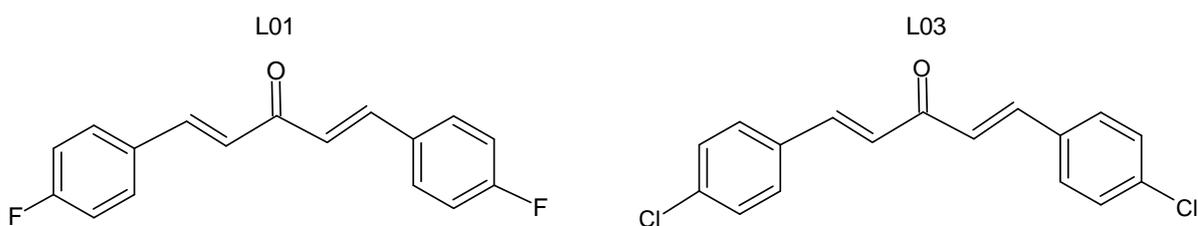
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Obtenção das Bischalconas

As bischalconas sintéticas (L01 e L03) foram sintetizadas por condensação de Claisen-Schmidt na Universidade Federal de Goiás (UFG) em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caridad Noda Peres e a pós-graduanda Mirian Rita Carrilho de Castro e gentilmente cedidas para a realização dos ensaios *in vitro*.

**Figura 3.** Estrutura química



Fonte: Autoria própria, 2024.

#### 4.1.2 Cultura celular

As linhagens celulares foram cultivadas em frasco de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> com volume de 50 mL ou de 75 cm<sup>2</sup> com volume de 250 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical e mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A manutenção foi realizada sempre que as células alcançavam aproximadamente 80 a 90 % de confluência. O crescimento das linhagens foi acompanhado diariamente por microscópio invertido.

As linhagens de células tumorais e não tumorais que foram utilizadas neste projeto para avaliar a citotoxicidade dos compostos estão dispostas na Tabela 1 a seguir.

**Tabela 1.** Linhagens celulares testadas.

	<b>Linhagem</b>	<b>Tipo histológico</b>	<b>Origem</b>	<b>Concentração de plaqueamento</b>
<b>Tumorais</b>	<b>NCI-H460</b>	Carcinoma de pulmão de células não pequenas	Humano	1x10 <sup>4</sup>
	<b>Mel501</b>	Melanoma	Humano	5x10 <sup>4</sup>
	<b>B16-F10</b>	Melanoma	Murino	5x10 <sup>4</sup>
	<b>MDA-MB-231</b>	Adenocarcinoma de mama	Humano	1x10 <sup>5</sup>
	<b>HCT-116</b>	Câncer de cólon	Murino	1x10 <sup>5</sup>
	<b>HL-60</b>	Leucemia promielocítica aguda	Humano	6x10 <sup>4</sup>
	<b>KG-1a</b>	Leucemia mielóide aguda	Humano	8x10 <sup>4</sup>
	<b>K562</b>	Leucemia mielóide crônica	Humano	3x10 <sup>5</sup>
	<b>Não tumorais</b>	<b>MCF10a</b>	Linhagem não-cancerosa de mama	Humano
<b>L929</b>		Linhagem de fibroblastos	Humano	3x10 <sup>5</sup>

Fonte: Autoria própria, 2024.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Ensaio de citotoxicidade MTT

#### *Princípio do método*

O teste do MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para avaliar a atividade metabólica celular. Seu método se baseia na redução do MTT, um sal amarelo solúvel em água, pelo efeito da atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH, formando cristais insolúveis de formazan, de coloração azul ou roxa. A coloração púrpura é, portanto, um quantificador indireto da viabilidade das células (NILES, 2013; MOSMANN, 1983).

#### *Procedimento experimental*

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços em diferentes concentrações e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período, foi adicionado 100 µL das amostras (bischalconas L01 e L03) diluídas em meio suplementado, em concentrações seriadas que variaram de 0,07 a 10 µM. Após o período de incubação de 69h, o meio de cultura foi removido e 150 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada em todos os poços e a placa foi incubada por mais 3 horas. Por fim, o sobrenadante foi retirado e 150 µL de DMSO foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. Após completa solubilização, realizou-se a leitura em espectrofotômetro de placas, em comprimento de onda de 595 nm.

#### 4.2.2 Ensaio de citotoxicidade MTT com SDS

##### *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) para o formazan, salvo especificação utilizou-se SDS a 10% para solubilização dos cristais de formazan, uma vez que a utilização do MTT ainda demonstra limitações devido a não dissolução total dos cristais de formazan apresentando assim a formação de precipitados no meio de cultura. Portanto, o dodecil sulfato de sódio (SDS) é um solvente que tem sido utilizado para aprimorar o método, de modo que o mesmo não necessita ser removido do meio de cultura, no entanto exige um prazo maior para a dissolução do formazan (NGA *et al.*, 2020).

##### *Procedimento experimental*

As células foram dispostas em placas de 96 poços (KASVI K12-096). Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, foi adicionado 100 µL da amostra (bischalcona L01) diluídas em meio suplementado, em concentrações seriadas decrescentes 0,07 a 10 µM. Como controle positivo, será utilizada a Doxorrubicina (DOX) em concentrações seriadas decrescentes iniciadas em 8,6 µM. Após o tempo de tratamento, foi adicionado 20 µL de reagente MTT a todos os poços e as placas foram incubadas por 4 horas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, adicionou-se 70 µL de reagente SDS 10% em cada poço. A placa foi mantida na estufa por 12 horas (*overnight*). A absorbância de cada poço a 570 nm e 595 nm foi medida e os espectros de absorção dos poços foram registrados utilizando um espectrofotômetro.

#### 4.2.3 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. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>, foi acrescentado 100 µL da amostra (L01) teste diluída em meio suplementado, em concentrações de 0,07 a 10 µM. Delimitou-se a partir da CI<sub>50</sub> os tempos de 24 e 48 horas de tratamento. Após cada tempo pré-determinado, retirou-se o tratamento e os poços foram lavados duas vezes com PBS e, em seguida, 200 µL de meio suplementado foram adicionados.

Após 69 horas, o sobrenadante foi retirado e adicionado em cada poço 150 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio DMEM, e as placas foram reincubadas por 3 horas. Após isso, o sobrenadante será retirado. O formazan foi ressuspensão em 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em cada poço. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 595 nm.

#### 4.2.4 Ensaio Azul de tripano

##### *Princípio do método*

O ensaio de exclusão do azul de tripano é um ensaio amplamente utilizado para determinar o número de células viáveis presentes numa suspensão de células. É um método em que se avalia a citotoxicidade por meio da integridade da membrana celular, em que as células viáveis terão o citoplasma limpo enquanto que as células não viáveis terão o citoplasma azul, devido à perda da seletividade da membrana. A contagem de células vivas e mortas é realizada por meio da câmara de Neubauer e o cálculo da viabilidade de células é feita pela razão entre o número de células viáveis e o número total de células por mL de alíquota (ADAN, 2016).

## *Procedimento Experimental*

As células HCT-116 foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com a bischalcona L01 nas concentrações definidas a partir da  $CI_{50}$  2, 4, 8 e 16  $\mu$ M por 24 e 48 horas. As concentrações e o período de incubação foram determinados a partir dos resultados obtidos pelos ensaios de MTT. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,1  $\mu$ M. Após o período de incubação as células foram transferidas para tubos eppendorf, que em seguida foram centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspensão em 1 mL de PBS. Em uma alíquota de 90  $\mu$ L de suspensão de células, foram adicionados 10  $\mu$ L de azul de tripano 0,4%. As células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

### 4.2.4 Teste da análise morfológica - coloração por 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, 2012).

#### *Procedimento experimental*

As células HCT-116 foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços e, após 24 horas, foram tratadas com diferentes concentrações de L01 (2, 4, 8 e 16  $\mu$ M), sendo incubadas por 24 e 48 horas em incubadora com 5% de  $CO_2$  a 37 °C. A doxorubicina (0,5  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo. Após os períodos de incubação, as células foram submetidas ao citospin em 1500 rpm por 5 min sendo dispostas em lâminas em seguida 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. As lâminas foram lavadas para remover o excesso de corante e, em seguida, as células foram visualizadas em microscópio óptico e fotografadas no aumento de 200x.

#### 4.2.5 Análises de dados

Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism versão 8.0 e os valores das absorvâncias foram utilizados para o cálculo da média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular a partir de experimentos em triplicata.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do efeito citotóxico utilizando o ensaio do MTT

O efeito antiproliferativo dos compostos consistiu na realização do método do MTT em oito linhagens de células tumorais (câncer de pulmão de células não pequenas NCI-H460, melanoma Mel501, melanoma murino B16-F10, adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, câncer colorretal HCT-116, leucemia promielocítica aguda HL-60, leucemia mieloide aguda KG-1a, leucemia mieloide crônica K-562) e duas linhagens não-tumorais (fibroblastos – L929, glândula mamária MCF10a) após 72 horas de incubação. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo no estudo. A tabela 2 apresenta os valores de  $CI_{50}$  obtidos no ensaio.

As bischalconas apresentaram efeito citotóxico em cinco linhagens testadas, com valores de  $CI_{50}$  variando de 78,8 a 9,25  $\mu\text{M}$ . A bischalcona L01 apresentou o melhor efeito citotóxico, com valores de  $CI_{50}$  menores que 100  $\mu\text{M}$  nas cinco linhagens de células tumorais testadas, sendo mais ativo nas linhagens tumorais Mel501 e HCT-116, com  $CI_{50}$  de 19,6  $\mu\text{M}$  e 9,25  $\mu\text{M}$ , respectivamente, e menos ativo na linhagem B16-F10 ( $CI_{50} = 71,8 \mu\text{M}$ .) As bischalconas L01 e L03 obtiveram valores de  $CI_{50}$  maiores que 100  $\mu\text{M}$  (acima da maior concentração testada) nas linhagens leucêmicas (HL-60, KG-1a e K-562) testadas.

A amostra L01 se mostrou mais sensível para as linhagens tumorais de câncer de cólon (HCT-116) e melanoma humano (MEL501), já a amostra L03 mostra uma seletividade apresentando valores de  $CI_{50}$  maiores que 100  $\mu\text{M}$  em linhagens não tumorais de fibroblastos (L929), mama (MCF10a) e linhagens tumorais de melanoma murino (B16-F10).

**Tabela 2.** Efeito antiproliferativo de bischalconas em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de incubação.

		<b>CI<sub>50</sub> (µM)</b>		
		<b>Intervalo de confiança 95%</b>		
	<b>LINHAGENS</b>	<b>L01</b>	<b>L03</b>	<b>Doxorrubicina</b>
<b>Tumorais</b>	<b>NCI-H460</b>	45,5 (42,1-48,7)	67,9 (56,1-78,2)	0,13 (0,12- 0,15)
	<b>Mel501</b>	19,6 (15,39-22,2)	31,6 (25,07- 43,5)	0,15 (0,12-0,17)
	<b>B16-F10</b>	71,8 (58,1- 91,4)	>100	0,01 (0,00-0,02)
	<b>MDA-MB-231</b>	69,2 (52,9-92,9)	78,8 (61,03-101)	1,4 (1,24-1,72)
	<b>HCT-116</b>	9,25 (7,18-12,17)	13,8 (11,94 - 16)	0,39 (0,18-0,67)
	<b>HL-60</b>	>100	>100	0,46 (0,39 – 0,53)
	<b>KG-1a</b>	>100	>100	0,73 (0,59 – 0,95)
	<b>K562</b>	>100	>100	2,56 (1,82 – 3,73)
	<b>Não tumorais</b>	<b>MCF10a</b>	>100	>100
<b>L929</b>		47,6 (32,23-62,5)	>100	0,29 (0,20-0,39)

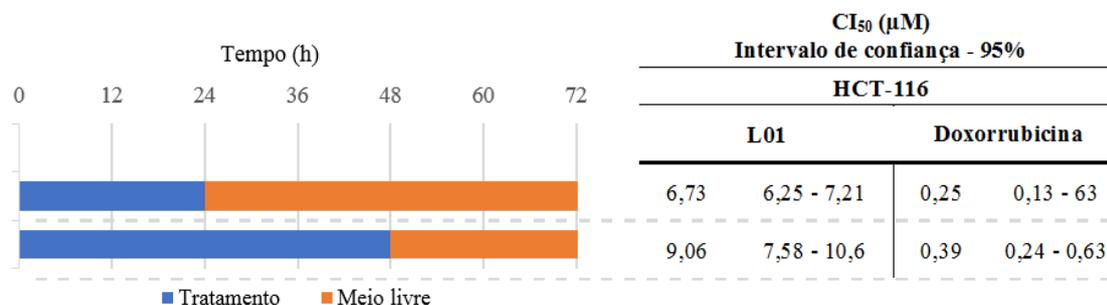
Fonte: Autoria Própria, 2024

A partir dos resultados do ensaio de citotoxicidade de 72 horas pelo método do MTT, as bischalconas apresentaram efeitos citotóxicos na linhagem tumoral HCT-116, com valores de CI<sub>50</sub> de 9,25 µM para a L01 e 13,8 µM para a L03. Assim, foi escolhida a amostra (L01) para a realização do ensaio de citotoxicidade em 24 e 48 horas. Quanto à linhagem selecionada para dar seguimento ao estudo, optou-se pela linhagem HCT-116 (células tumorais de carcinoma colorretal), pois, apresentou-se como a linhagem mais sensível ao tratamento de 72 h de incubação.

Os resultados da Tabela 3 demonstram que a moléculas não apresentou perfil de tempo dependência. Os valores de CI<sub>50</sub> variaram entre 9,06 a 6,73 µM quando observamos os índices encontrados do tratamento com as moléculas.

## 5.2 Teste em pulso de tempo - concentração

**Tabela 3.** Ensaio de pulso de tempo com a linhagem de células tumorais HCT-116. O gráfico de barras indica a duração do tratamento com (L01) – bischalcona (barra azul) e o tempo de incubação em meio sem drogas (barra laranja).



Fonte: Autoria Própria, 2024.

Com a pretensão de definir o tempo a ser trabalhado e padronizar um método para o estudo de viabilidade celular realizou-se o ensaio de citotoxicidade do MTT com SDS.

## 5.3 Avaliação do efeito citotóxico utilizando o ensaio do MTT com SDS

Durante a realização do ensaio de citotoxicidade com MTT foi observado uma interferência na análise de dados, visto que é necessário remover o meio de cultura para adicionar o DMSO para solubilização dos cristais de formazan o que pode ter levado a diferença nos valores de CI<sub>50</sub>. Ao adicionar somente o SDS após o tempo de tratamento foi obtido um valor de CI<sub>50</sub> de 22 µM para L01 na linhagem de HCT-116 enquanto o valor anterior foi 9,25 µM.

**Tabela 4.** Efeito antiproliferativo da bischalcona L01 em HCT-116 avaliado pelo ensaio do MTT com SDS, após 72h de incubação e mais 12 horas overnight.

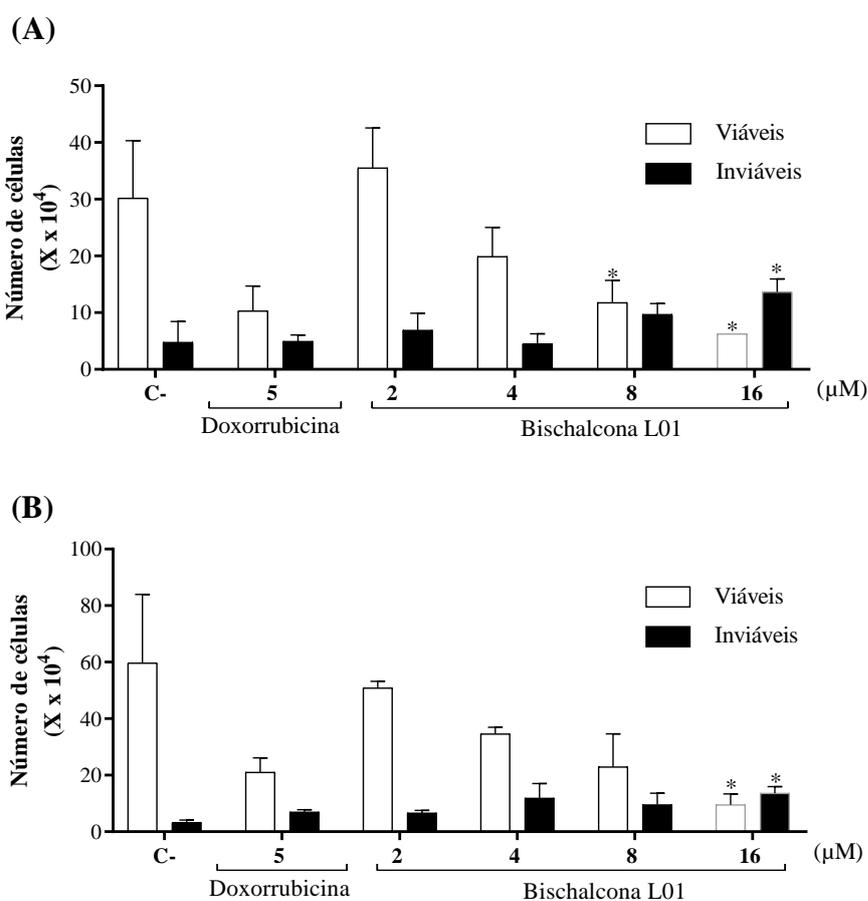
CI <sub>50</sub> (µM)		
Intervalo de confiança 95%		
LINHAGEM	L01	Doxorrubicina
HCT-116	22,2 (17 - 29,8)	0,10 (0,05 - 0,17)

Fonte: Autoria Própria, 2024.

#### 5.4 Quantificação da viabilidade celular utilizando o ensaio de exclusão por azul de tripano

O ensaio de viabilidade celular por exclusão do azul de tripano foi realizado para quantificar individualmente células viáveis e não viáveis, após 24 e 48 horas de incubação com a bischalcona L01. Como observado (Figuras 4A e 4B) no período de 24 horas, as concentrações escolhidas interferiram na viabilidade das células HCT-116 quando comparadas ao controle negativo. Por meio do ensaio de viabilidade celular por exclusão de azul de tripano foi possível observar que a L01 foi capaz de reduzir o número de células viáveis nas concentrações de 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$  (\* $p < 0,05$ ). Sendo mais significativa nas concentrações de 8 e 16  $\mu\text{M}$  no tempo de 24h e em 48h a concentração de 16  $\mu\text{M}$  foi mais relevante interferindo no número de células não viáveis. A concentração de 2  $\mu\text{M}$  não reduziu o número de células viáveis.

**Figura 4.** Efeito da bischalcona L01 na viabilidade de HCT-116 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de tripano após 24 e 48 horas de tratamento.



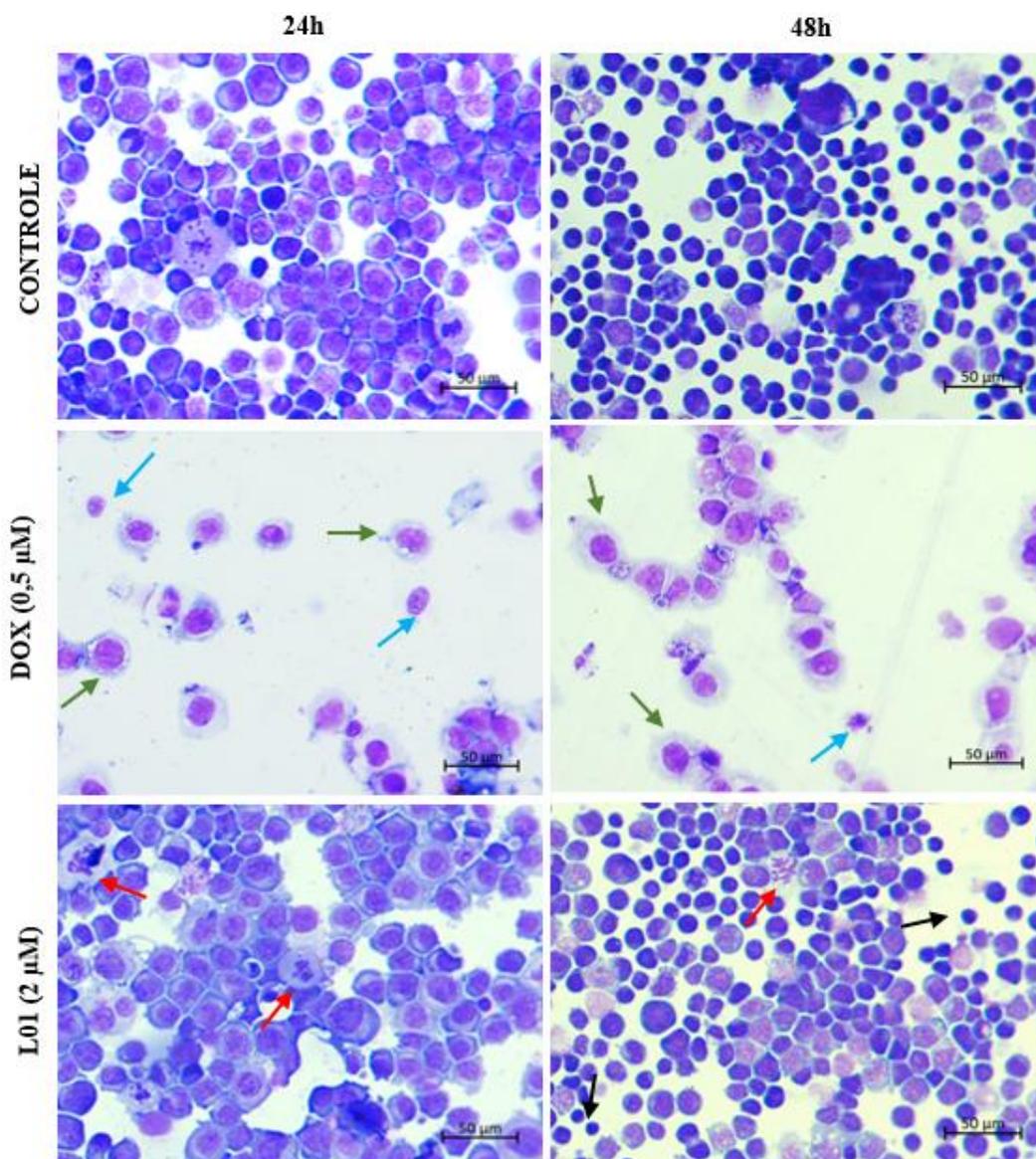
Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo dois experimentos independentes. (\* $p < 0,05$ ) comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

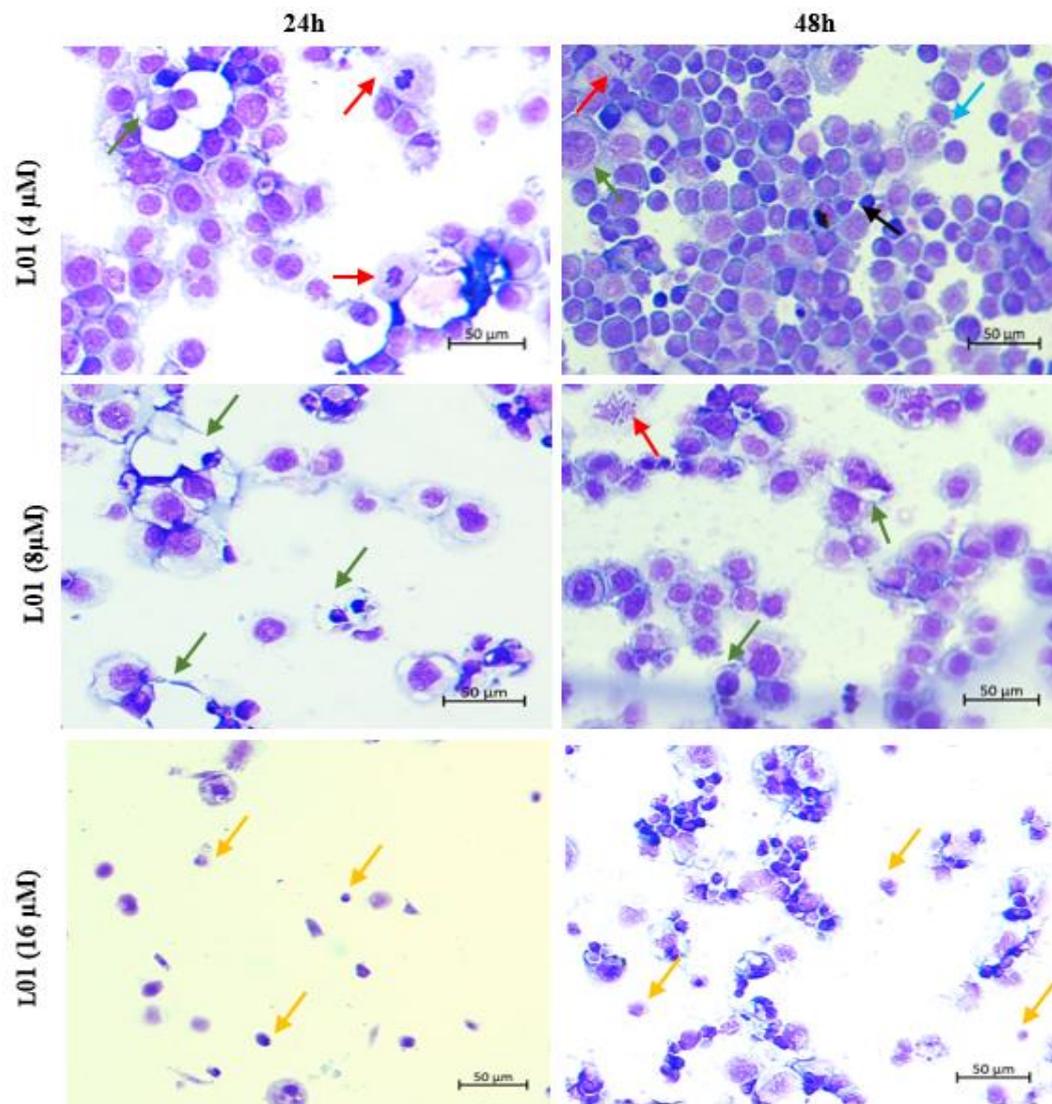
### 5.5 Teste da análise morfológica – coloração por panótico rápido

Com o objetivo de verificar o mecanismo de morte envolvido no efeito citotóxico da bischalcona L01, foi realizada a análise morfológica das células HCT-116 tratadas com L01 por coloração com o kit panótico rápido, utilizando microscopia óptica (Figura 7). Após 24 horas de incubação, a menor concentração de 2  $\mu\text{M}$  não apresenta alterações significativas quando se comparado com o controle negativo. Entretanto, nas células tratadas com as concentrações de 4 e 8  $\mu\text{M}$ , podemos observar corpos apoptóticos na membrana de algumas células, com formação de *blebs*, figuras mitóticas, alterações na membrana citoplasmática e frequente aparecimento de vacúolos. Foi possível observar também, o aparecimento de restos celulares nas células tratadas com L01 na concentração de 16  $\mu\text{M}$ .

Após incubação de 48 horas, as lâminas apresentavam encolhimento celular, rarefação celular, alteração na membrana citoplasmática, restos celulares e aparecimento de algumas células com corpos apoptóticos nas concentrações de 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ , além de alteração na membrana citoplasmática e restos celulares mais frequente na maior concentração testada (16  $\mu\text{M}$ ). Em células tratadas com doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ), utilizada como controle positivo, foi observada rarefação celular, alterações de membrana citoplasmática com formação de *blebs* e aumento do tamanho celular após 24 e 48 horas de incubação, características estas compatíveis com morte celular por apoptose. Com isso, possivelmente o efeito citotóxico da L01 em células HCT-116 pode estar relacionado com indução de morte celular por apoptose e/ou autofagia.

**Figura 5.** Avaliação das alterações morfológicas pela bischalcona L01 após 24 e 48 horas de tratamento.





Legenda: setas azuis – corpos apoptóticos, formação de “*blebs*”; setas verdes – alterações na membrana citoplasmática e vacúolos; setas vermelhas – figuras mitóticas; setas amarelas – condensação da cromatina; setas pretas – encolhimento celular. Fonte: Autoria Própria, 2024

## 6 DISCUSSÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública em razão da alta morbidade e baixa seletividade dos métodos de tratamento atuais. Isso ocorre perante as características específicas das células cancerígenas, como alto potencial de crescimento celular, indução de angiogênese, resistência a sinais de apoptose e diversos medicamentos. Por consequência, o câncer tornou-se um importante desafio para a comunidade científica na busca por novos e melhores medicamentos que tenham como alvo os tecidos e células cancerígenas e causem menos danos ao organismo (VIEIRA, *et al.*, 2020)

Portanto, é de grande interesse dos pesquisadores a busca por moléculas que possam ter um papel antitumoral mais apropriado. Por sua vez, moléculas de ocorrência natural tornaram-se as principais fontes de novos medicamentos devido à sua diversidade farmacológica (NEWMAN; CRAGG, 2020). Entre elas estão as chalconas, que possuem diversas atividades biológicas, incluindo efeitos antitumorais que podem ser potencializados pela conjugação molecular com uma série de compostos e agentes terapêuticos (BONAKDAR, *et al.*, 2017).

Considerando o significativo potencial biológico de chalconas e seus derivados, suas funções metabólicas e estrutura estão sujeitas a modificações através da adição de anéis aromáticos devido o posicionamento de cada porção chalcona com o intuito de obter novas moléculas com potencial terapêutico otimizado. Algumas atividades biológicas de têm sido descritas, tais como a do receptor de crescimento (MAGHRABY, *et al.*, 2023), inibição da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR (SU, *et al.*, 2022), anticâncer (YANG, 2020), antioxidante (BHALE, *et al.*, 2021).

Yang e colaboradores (2020), relataram atividade citotóxica e antiproliferativa de análogos de bischalconas em linhagem de células de câncer de pulmão (A549). Conforme SU *et al.* (2022), compostos derivados de chalcona triazólicas proporcionaram um potencial inibitório significativo em linhagens celulares humanas de osteossarcoma (MG-63), câncer de fígado (HepG2), câncer de pulmão (A549) e câncer cervical (HeLa). Outrossim, apresentou taxas não tóxicas para células normais de epitélio pulmonar (BEAS-2B) e mama (MCF-10A). Insuasty e seus colaboradores (2021) revelaram em sua pesquisa que as bischalconas simétricas e assimétricas à base de quinolina demonstraram um nível elevado de citotoxicidade contra as linhagens de câncer de colón HCT-116 ( $CI_{50} = 0,16$ ) e HT29 ( $CI_{50} = 0,42 \mu M$ ).

Li e colaboradores (2023) avaliaram o efeito antiproliferativo de oito conjugados de bischalconas com ligante de lisina I em linhagens de câncer de fígado (MHCC-97H), câncer colorretal (HCT116), câncer gástrico (TMK1) e adenocarcinoma gástrico (AGS), em que seus resultados apresentaram seis compostos com atividade contra a linhagem de câncer gástrico (TMK1), em específico um composto que relevou a  $CI_{50} = 22,29 \mu M$ , próximo ao medicamento de referência 5-fluorouracil (5-FU) e AGS ( $CI_{50} = 22,14 \mu M$ ). Assim, neste estudo, o painel de linhagens celulares teve ampliação para as amostras com potencial efeito antiproliferativo das bischalconas (L01 e L03), sendo testadas frente a oito linhagens de células tumorais e duas não tumorais, com distintas origens histológicas, utilizando método do MTT.

No presente estudo, duas novas bischalconas sintéticas com estrutura química similar foram testadas inicialmente contra oito linhagens de células tumorais. Possivelmente, mudanças na estrutura química das bischalconas, como o grupo *meta-halogenado* (F e Cl), podem estar relacionados com a diferença de atividade desses compostos, uma vez que foram capazes de modificar a potência do efeito citotóxico destas moléculas e variação do valor de  $CI_{50}$ . O posicionamento meta do anel benzênico das bischalconas L01 e L03 pode estar relacionado com a redução da atividade das moléculas em algumas linhagens. Também, o grupo *meta-halogenado* Cl pode estar associado com menor efeito da L03 frente às linhagens B16F10, MDA-MB-23, MEL501 e NCIH460, no entanto, apresentou uma seletividade contra a linhagem HCT-116.

Considerando a natureza agressiva do câncer colorretal, resultando em uma alta incidência de morte de indivíduos que possuem esse tipo de tumor (WHO, 2023), a procura por novos compostos com efeitos seletivos sobre essas células e seus mecanismos de ação associados ao potencial antiproliferativo é crucial. Neste sentido, ao observar atividade citotóxica da bischalcona L01 contra as células de câncer colorretal têm-se oportunidades para um estudo mais aprofundado dos mecanismos de ação desta molécula.

Sharma e colaboradores (2013) evidenciam que a presença e a força de grupos retiradores de elétrons no anel fenil de chalconas e metoxichalconas derivadas de  $\beta$ -ionona têm um efeito significativo na citotoxicidade (SINGH *et al.*, 2014; BANGDAR *et al.*, 2010). De acordo com o estudo de Dias *et al.* (2013), a presença de um grupo nitro na posição *para* do grupo fenil elevou muito a citotoxicidade da chalcona 2a derivada da  $\beta$ -ionona, na qual o grupo orto-hidroxifenil está ligado ao carbono carbonílico e ao *meta*- ou *para*-, ou seja, na posição do anel halobenzeno (F, Cl ou Br) ligado ao carbono  $\beta$ , o valor  $CI_{50}$  para a linhagem

celular de câncer colorretal HCT-116 está na faixa de 10,9 a 20,9  $\mu\text{M}$ . Ademais, a o-hidroxichalcona substituída por um halogênio na posição *para* é menos ativa do que a o-hidroxichalcona halogenada na posição *meta*. Contra a mesma linhagem celular HCT-116, a o-hidroxichalcona semi-halogenada contendo Br e Cl apresentou valores de  $\text{CI}_{50}$  de 19,1 e 20,9  $\mu\text{M}$  respectivamente (Dias *et al.*, 2013), enquanto nossos compostos L01 e L03 com as posições de halogenação *meta* F e Cl são 9,25 e 13,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Kudličková e colaboradores (2021) elaboraram a síntese de 20 derivados de chalcona modificadas pela adição de grupos nitro ( $\text{NO}_2$ ) e fluorocarbono ( $\text{CF}_3$ ). Ao testá-las contra a linhagem de células leucêmicas linfoblástica aguda foi observado que apenas quatro derivados apresentaram valores de  $\text{CI}_{50}$  entre 6,1 e 8,9  $\mu\text{M}$  expressando um potencial antiproliferativo. Entretanto, em nosso estudo as bischalconas halogenadas L01 e L03, apresentaram valores de  $\text{CI}_{50}$  maiores que 100  $\mu\text{M}$  (acima da maior concentração testada) nas linhagens leucêmicas (HL-60, KG-1A e K-562) testadas. Considerando que as linhagens leucêmicas são células em suspensão, é possível inferir uma hipótese de que tais células tenham experimentado um processo de morte celular programada conhecido como anoikis, o qual se manifesta quando não há presença de matriz extracelular (KHAN, 2022). Anoikis é conhecido por ser um processo muito importante do ponto de vista fisiológico, que assegura o desenvolvimento adequado e a manutenção do equilíbrio nos tecidos, desempenhando um papel significativo na proteção do organismo ao evitar que células soltas se fixem em novos lugares inadequados e cresçam de forma anômala (PAOLI, 2013).

A fim de dar início ao estudo do mecanismo de ação da bischalcona L01, foi avaliada a relação tempo dependência do efeito antiproliferativo deste composto frente a linhagem de câncer colorretal, HCT-116. Porém, não foi observado na molécula a relação tempo-dependência nos ensaios de citotoxicidade (24, 48 e 72 horas). Para corroborar com os resultados do MTT, realizou-se o ensaio de exclusão com Azul de Tripán, em que o Tripán é um corante com carga negativa, que pode entrar apenas nas membranas rompidas e ser absorvido pelas células mortas, enquanto em células viáveis, a membrana celular permanece intacta (STROBER, 2015). Por meio deste método, comprovamos que as concentrações 8  $\mu\text{M}$  e 16  $\mu\text{M}$  da bischalcona L01 interferiam na viabilidade das células HCT-116.

As alterações morfológicas induzidas por esta molécula em células HCT-116 foram avaliadas por coloração com kit panótico rápido, utilizando microscopia óptica. A partir da concentração de 4  $\mu\text{M}$ , células HCT-116 tratadas com L01 durante 24 horas exibiram formação

de blebs na membrana de algumas células, presença de alteração de membrana citoplasmática, alguns vacúolos e restos celulares na concentração de 16  $\mu\text{M}$ . As alterações celulares observadas nas concentrações de 8 e 16  $\mu\text{M}$  indica um perfil citotóxico iniciado pelo composto já nas primeiras 24 horas de tratamento. Após 48 horas, foi possível observar esse perfil citotóxico desde a concentração de 4  $\mu\text{M}$ , sendo observadas alterações, como rarefação celular, alteração na membrana citoplasmática, figuras mitóticas, vacúolos e aparecimento de algumas células com corpos apoptóticos.

Diante todos os dados obtidos nesse trabalho, pode-se relatar que a molécula bischalcona L01 demonstra um bom potencial anticâncer sobre as linhagens de câncer colorretal, comportando-se como potenciais moléculas candidatas para o tratamento do câncer, sendo necessários análises complementares do mecanismo de morte celular apoptótico, autofágico e/ou anoikis.

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, foi possível determinar efeito citotóxico dos compostos bischalconas L01 e L03 frente a oito linhagens de células tumorais e duas não tumorais. As bischalconas reduziram a viabilidade celular nas linhagens tumorais Mel501, MDA-MB-231 e HCT-116 e na linhagem não tumoral L929, mas não apresentou efeito significativo para o composto L03 no período de 72h. Quanto a linhagem MC-F10A os compostos não apresentaram efeito significativo. O composto L01 induziu, possivelmente, morte celular por apoptose na linhagem HCT-116. Contudo, mais estudos devem ser realizados a fim de verificar seus efeitos na toxicidade e sua capacidade de indução a apoptose em outras linhagens celulares e/ou em modelos animais *in vivo*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ZIED, Hesham 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. 102997, 2019.
- ADAN, Aysun; KIRAZ, Yagmur; BARAN, Yusuf. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- AKSÖZ, B. Evranos; ERTAN, Rahmiye. 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, 2019.
- American Cancer Society. *Cancer Basics: Gene Changes and Cancer 2022*. Disponível em: <https://shre.ink/r8GQ>. Acesso em: 10 fev.2024
- ANDRICOPULO, A. D. et al. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.*, v.9, n.9, p.771-90, 2009.
- BANDGAR, Babasaheb 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, 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, 2017.
- BERNARDES, A. et al. Study of reactions of two Mannich bases derived of 4'-hydroxychalcones with glutathione by RP-TLC, RP-HPLC and RP-HPLC- ESI-MS analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 6, p. 1048–1062, 2017.
- BHALE, Pravin S. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Indolyl Bis-chalcones as Anti-Breast Cancer and Antioxidant Agents. *Croatica Chemica Acta*, v. 94, n. 1, p. 35-41, 2021.
- BHUKAL, Akanksha et al. Recent advances in chalcone-triazole hybrids as Potential Pharmacological Agents. *Results in Chemistry*, p. 101173, 2023.
- BONAKDAR, Ahmad Pesaran Seied et al. Synthesis and anticancer activity assay of novel chalcone-sulfonamide derivatives. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, v. 16, n. 2, p. 565, 2017.
- BUZUN, Kamila et al. DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 35, n. 1, p. 1781-1799, 2020.
- CONSTANTINESCU, Teodora; LUNGU, Claudiu N. Anticancer activity of natural and synthetic chalcones. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 21, p. 11306, 2021.
- DAVEY, W.; GWILT, J. R. 196. Chalcones and related compounds. Part I. Preparation of nitro-, amino-, and halogeno-chalcones. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, p. 1008-1014, 1957.

- DIAS, Tatiana A. et al. Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 65, p. 500-510, 2013.
- DOMÍNGUEZ, José N. et al. Synthesis and evaluation of new antimalarial phenylurenyl chalcone derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 10, p. 3654-3658, 2005.
- DOROTEIO, N. Síntese de análogos de bis-chalconas simétricos e não simétricos. Mestrado—Brasília: Universidade de Brasília, 2017.
- DOROTEIO, Najla Leão. Síntese de análogos de bis-chalconas simétricos e não simétricos. 2016.
- ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of chalcones. *Current medicinal chemistry*, v. 6, n. 12, p. 1125, 1999.
- FERREIRA, Maria Luiza Ludermir et al. Qualidade de vida relacionada à saúde de idosos em tratamento quimioterápico. *Revista Brasileira de Geriatria e gerontologia*, v. 18, p. 165-177, 2015.
- FU, Yue et al. Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 322, n. 1, p. 263-270, 2004.
- GANESA, R.; RAO AVUPATI, V.; SHABI, M. Ultrasonic synthesis and in vitro evaluation of some new bischalcones as potential cytotoxic agentes. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. 03, p. 670–687, 2017.
- GHONEIM, Amira A.; ELBARGISY, Rehab M.; MANOER, Afaf. Design and synthesis of heterocyclic Compounds from 1, 4-diacetylbenzene with Expected Antimicrobial Activity. *Egyptian Journal of Chemistry*, v. 63, n. 8, p. 2901-2910, 2020
- GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature*, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 2012
- GURR, Edward. *Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry*. Elsevier, 2012.
- HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.
- HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.
- HUANG, Lihua; FU, Liwu. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 5, n. 5, p. 390-401, 2015.
- HULL, L. A. The Dibenzalacetone Reaction Revisited. *Journal of Chemical Education*, v. 78, n. 2, p. 226–227, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (Brasil). O que é câncer? Instituto Nacional do Câncer, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>

INSUASTY, Daniel et al. Design, synthesis, and molecular docking study of novel quinoline-based bis-chalcones as potential antitumor agents. *Archiv der Pharmazie*, v. 354, n. 9, p. 2100094, 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. (IARC, 2024). Disponível em: [https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2024/02/pr345\\_E.pdf](https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2024/02/pr345_E.pdf). Acesso em: 10 fev.2024

J LEON-GONZALEZ, Antonio et al. Chalcones as promising lead compounds on cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 30, p. 3407-3425, 2015.

KARTHIKEYAN, Chandrabose et al. Advances in chalcones with anticancer activities. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, v. 10, n. 1, p. 97-115, 2015.

KHAN, Sameer Ullah; FATIMA, Kaneez; MALIK, Fayaz. Understanding the cell survival mechanism of anoikis-resistant cancer cells during different steps of metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, v. 39, n. 5, p. 715-726, 2022.

KUDLIČKOVÁ, Zuzana et al. Novel 1-methoxyindole-and 2-alkoxyindole-based chalcones: Design, synthesis, characterization, antiproliferative activity and DNA, BSA binding interactions. *Medicinal Chemistry Research*, v. 30, p. 897-912, 2021.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins e Contran. *Patologia: bases patológicas da doença*. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

LEÓN-GONZÁLEZ, Antonio J.; AUGER, Cyril; SCHINI-KERTH, Valérie B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochemical pharmacology*, v. 98, n. 3, p. 371-380, 2015.

LESHCHINER, Elizaveta S. et al. Direct activation of full-length proapoptotic BAK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 11, p. E986-E995, 2013.

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

LIMA, Rosa S. et al. Structure and cytotoxic activity of terpenoid-like chalcones. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 12, n. 8, p. 3890-3901, 2019.

MAGALHÃES, Luma Godoy. Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina candidatos a fármacos para o tratamento do câncer. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MAGHRABY, Mohamed T.-E. et al. Design, synthesis, and modeling study of new 1, 2, 3-triazole/chalcone hybrids with antiproliferative action as epidermal growth factor receptor inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 101, n. 3, p. 749-759, 2023.

MILLER, K. D. et al. *Cancer treatment and survivorship statistics*, 2019. CA: a cancer journal for clinicians, v. 69, n. 5, p. 363-385, 2019.

MODZELEWSKA, Aneta et al. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 14, n.10, p. 3491-3495, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOURA, Andréa F. et al. New Synthetic Sulfonamide Chalcone Induced Cell Cycle Arrest and Cell Death in Colorectal Adenocarcinoma Metastatic Cells (SW-620). *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, v. 22, n. 12, p. 2340-2351, 2022.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon 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, p. 770-803, 2020.

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

NI, Liming; MENG, Charles Q.; SIKORSKI, James A. Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 14, n. 12, p. 1669-1691, 2004.

NILES, Andrew L. et al. High-Throughput Screening Assays for the Assessment of Cytotoxicity. *High-Throughput Screening Methods in Toxicity Testing*, p. 107-127, 2013.

ORLIKOVA, Barbora et al. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes & nutrition*, v. 6, n. 2, p. 125-147, 2011.

OUYANG, Y. et al. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. *Biomolecules* 2021, 11, 894. 2021.

PANDE, Aditya Narayan et al. In vitro and in vivo anticancer studies of 2'-hydroxy chalcone derivatives exhibit apoptosis in colon cancer cells by HDAC inhibition and cell cycle arrest. *EXCLI journal*, v. 16, p. 448, 2017.

PAOLI, Paolo; GIANNONI, Elisa; CHIARUGI, Paola. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1833, n. 12, p. 3481-3498, 2013.

PEREIRA, Rui et al. Bis-chalcones: A review of synthetic methodologies and anti-inflammatory effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 252, p. 115280, 2023.

PRASAD, Ch et al. Synthesis, Antimicrobial Evaluation, and In Silico Molecular Docking Studies of Chalcone-Based 1, 2, 3-Triazoles. *Russian Journal of General Chemistry*, v. 93, n. 5, p. 1162-1170, 2023.

SAIYAD, I. Z.; NADKARNI, D. R.; WHEELER, T. S. 365. Chalkones. The condensation of aromatic aldehydes with resacetophenone. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, p. 1737-1739, 1937.

SANTOS, Lorena dos et al. Síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico de derivados obtidos a partir de chalconas. 2008.

SHARMA, Vishal et al.  $\beta$ -Ionone derived chalcones as potent antiproliferative agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 69, p. 310-315, 2013.

SHEIKH, Khursheed Ahmad et al. Advances in Chalcone Derivatives: Unraveling Their Anticancer Potential Through Structure-Activity Studies. *Journal of Molecular Structure*, p. 137154, 2023.

SIDDIQUI, Z. N.; KHAN, T. An efficient synthesis of novel bis-chalcones and bispyrazolines in the presence of cellulose sulfuric acid as biodegradable catalyst under solvent-free conditions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 6, p. 1002– 1011, 2014.

SILVA, Wender A. et al. Biological and structure-activity evaluation of chalcone derivatives against bacteria and fungi. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, p. 133-144, 2013.

SINGH, Parvesh; ANAND, Amit; KUMAR, Vipin. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European journal of medicinal chemistry*, v. 85, p. 758-777, 2014.

STROBER, Warren. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.

SU, Qing et al. Design and development of novel 1, 2, 3-triazole chalcone derivatives as potential anti-osteosarcoma agents via inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Acta Pharmaceutica*, v. 72, n. 3, p. 389-402, 2022.

TOMASELLO, Chiara et al. Resistance to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer: Clinical management and future perspectives. *Critical reviews in oncology/hematology*, v. 123, p. 149-161, 2018.

TSUKERMAN, S. V. et al. Electronic spectra of isomeric para-dichalcones and para-dichalcone analogs. *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 12, n. 1, p. 76-80, 1970.

TUTAR, Uğur; KOÇYIĞIT, Ümit M.; GEZEGEN, Hayreddin. Evaluation of antimicrobial, antibiofilm and carbonic anhydrase inhibition profiles of 1, 3-bis-chalcone derivatives. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 33, n. 4, p. e22281, 2019.

VIEIRA, Vanessa et al. Quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *ENCICLOPEDIA BIOSFERA*, v. 17, n. 34, 2020.

WEINBERG, R. A. *The biology of cancer* 2nd edition. Garland Science. Cambridge, MA, p. 658-691. 2013, 2013.

WINTER, Evelyn et al. Symmetric bis-chalcones as a new type of breast cancer resistance protein inhibitors with a mechanism different from that of chromones. *Journal of medicinal chemistry*, v. 57, n. 7, p. 2930-2941, 2014.

WHO. World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://shre.ink/rtU5> Acesso em: 30/01/2024.

YANG, Jie; MU, Wen-Wen; LIU, Guo-Yun. 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, 2020.

YUSUF, M.; JAIN, P. New bispyrazoline derivatives built around aliphatic chains: Synthesis, characterization and antimicrobial studies. *Journal of Chemical Sciences*, v. 125, n. 1, p. 117–127, 2013.

ZHAI, Lin et al. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 43, n. 6, p. 793-803, 1999.