



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MYLENA COSTA DA SILVA DE CARVALHO

**ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO DA CHALC6a NA LINHAGEM CELULAR
DE CARCINOMA COLORETAL HUMANO HCT-116**

Fortaleza, Ceará

2021

MYLENA COSTA DA SILVA DE CARVALHO

**ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO DE CHALC6a NA LINHAGEM CELULAR
DE CARCINOMA DE COLORETAL HUMANO HCT-116**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Washington Araújo
Barros Nepomuceno

Coorientador:

Dr. Daniel Pascoalino Pinheiro

Fortaleza, Ceará

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C325e Carvalho, Mylena Costa da Silva de.
Estudo do efeito citotóxico de chalc6a em linhagem celular de carcinoma de coloretal humano HCT-116
/ Mylena Costa da Silva de Carvalho. – 2021.
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Washington Araújo Barros Nepomuceno.
Coorientação: Prof. Dr. Daniel Pascoalino Pinheiro.

1. Neoplasia. 2. Apoptose. 3. Chalconas. I. Título.

CDD 615

MYLENA COSTA DA SILVA DE CARVALHO

**ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO DE CHALC6aEM LINHAGEM CELULAR
DE CARCINOMA DE COLORETAL HUMANO HCT-116**

Aprovada em 08 de dezembro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Washington Araújo Barros Nepomuceno (Orientador)
Instituto de Ciências da Saúde (UNILAB)

Dr. Daniel Pascoalino Pinheiro (Coorientador)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC)

Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (UVA)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente em todas as horas, ao meu esposo Guilherme, ao meu filho Théo, aos meus pais e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus que me permitiu chegar com saúde e determinação para que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos, passar na seleção do mestrado foi sem dúvidas algo muito gratificante, ainda me lembro como se fosse ontem recebendo o resultado de aprovação, o meu esposo e eu gritamos tanto na rua de felicidade, gratidão a Deus por todos os momentos.

Ao meu esposo Guilherme que tanto lutou junto comigo, foram anos difíceis, saímos da nossa cidade para vivenciar experiências novas e desafiadoras porém vencemos juntos e continuaremos vencendo os próximos com a graça de Deus.

Ao meu filho Théo que mesmo muito novo no início desse projeto (01 ano), me ensinou a ser forte e a vencer por mim e por ele. Obrigada meu Filho, te amo.

Aos meus pais e irmãos, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Washington, por ter sido meu orientador e ter desempenhado tal função com dedicação.

Ao meu coorientador, Dr. Daniel Pascoalino, por todos os momentos de ajuda durante os experimentos e discussões sobre o trabalho que foram extremamente importantes.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

Aos meus colegas de curso e de laboratório Vanessa e João Pedro, com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como Mestre.

A minha amiga/irmã na fé, não poderia esquecer de agradecer a Josilan por todos os momentos de orações e por ter sempre ficado perto de mim em todos os momentos da minha vida, sendo eles bons ou ruins.

A todos do NPDM, professor Odorico e professora Claudia pelo fornecimento de dados e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro com a bolsa de estudo, essencial para que pudesse continuar o período do mestrado.

Por fim continuo agradecendo a Deus, porque para mim ele é o início, meio e o fim de todas as coisas. Obrigada meu Deus, por me instruir no caminho do bem e ainda te peço que me ajude a nunca me desviar dele.

EPÍGRAFE

Nunca se está errado fazendo a coisa certa.

Mark Twain

RESUMO

O tratamento antitumoral disponível atualmente representa um grande avanço científico na luta contra o câncer. Apesar disso, observam-se, ainda, muitos efeitos adversos concomitantes ao efeito terapêutico e/ou uma elevada taxa de resistência ao tratamento quimioterápico. Adicionalmente, as estatísticas têm demonstrado que o câncer continua sendo um grave problema de saúde pública e que, portanto, merece atenção especial reforçando a necessidade de se desenvolver moléculas anticâncer mais efetivas e com menos efeitos adversos. Nesse âmbito, a classe química das chalconas tem sido alvo de interesse de muitos pesquisadores, os quais têm sintetizado inúmeras moléculas com promissores efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo*. Baseado em estudo prévio de uma série de 20 chalconas, foi identificada uma pequena molécula (Chalc6a) detentora de forte atividade citotóxica em linhagem celular de carcinoma colorretal humano HCT-116 ($CI_{50} = 3.56 \pm 0.73 \mu\text{M}$). Sendo assim, o objetivo geral do presente trabalho consistiu em estudar o efeito citotóxico de Chalc6a em células tumorais humanas, em especial a linhagem HCT-116, visando ao desenvolvimento de um novo composto com potencial anticâncer. Os resultados do teste do MTT revelaram forte atividade citotóxica para Chalc6a em diferentes linhagens celulares tumorais humanas após 72 h de incubação com valores de CI_{50} variando de 5,65 a 10,52 μM . Nesse tempo de incubação, não foi observado efeito citotóxico em modelo não-tumoral L-929 ($CI_{50} > 20 \mu\text{M}$). Após 48 e 24 h de incubação com células tumorais HCT-116, Chalc6a apresentou valores de CI_{50} de 5,67 e 9,81 μM , respectivamente, que, em conjunto com a CI_{50} de 72 h, sugerem um efeito citotóxico tempo dependente. Buscando analisar o início do efeito citotóxico promovido pelo composto teste, realizaram-se análises morfológicas e de citometria de fluxo após 24 h de incubação de células HCT-116 tratadas com Chalc6a. Os resultados revelaram indução de apoptose independente de despolarização mitocondrial relacionada com parada do ciclo celular na fase G2/M. Assim, o presente estudo corrobora o potencial citotóxico antitumoral de Chalc6a em linhagem celular HCT-116 possibilitando o avanço de seu estudo usando modelos *in vivo*.

Palavras-chave: Neoplasia; Apoptose; Chalconas.

ABSTRACT

The antitumor treatment currently available represents a major scientific breakthrough in the fight against cancer. Despite this, there are still many adverse effects concomitant with the therapeutic effect and/or a high rate of resistance to chemotherapy treatment. In addition, statistics have shown that cancer remains a serious public health problem and, therefore, deserves special attention, reinforcing the need to develop more effective anticancer molecules with less adverse effects. In this context, the chemical class of chalcones has been the target of interest for many researchers, who have synthesized countless molecules with promising antitumor effects *in vitro* and *in vivo*. Based on a previous study of a series of 20 chalcones, a small molecule (Chalc6a) with strong cytotoxic activity in human colorectal carcinoma cell line HCT-116 ($IC_{50} = 3.56 \pm 0.73 \mu M$) was identified. Thus, the general objective of the present work was to study the cytotoxic effect of Chalc6a on human tumor cells, especially the HCT-116 strain, aiming at the development of a new compound with anticancer potential. The results of the MTT test revealed strong cytotoxic activity for Chalc6a in different human tumor cell lines after 72 h of incubation with IC_{50} values ranging from 5.65 to 10.52 μM . During this incubation time, no cytotoxic effect was observed in a non-tumor model L-929 ($IC_{50} > 20 \mu M$). After 48 and 24 h of incubation with HCT-116 tumor cells, Chalc6a showed IC_{50} values of 5.67 and 9.81 μM , respectively, which, together with the IC_{50} of 72 h, suggest a time-dependent cytotoxic effect. Trying to analyze the beginning of the cytotoxic effect promoted by the test compound, morphological and flow cytometric analyzes were performed after 24 h of incubation of HCT-116 cells treated with Chalc6a. The results revealed induction of apoptosis independent of mitochondrial depolarization related to cell cycle arrest in the G2 / M phase. Thus, the present study corroborates the anti-tumor cytotoxic potential of Chalc6a in HCT-116 cell line, enabling the advancement of its study using *in vivo* models.

Keywords: Neoplasia; Apoptosis; Chalcones.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1. Os marcos do câncer.....	17
FIGURA 2. Desenvolvimento temporal do CCR.....	18
FIGURA 3. Estrutura química base das chalconas.....	22
FIGURA 4. Reação por condensação via catálise básica de Claisen-Shimidt.....	23
FIGURA 5. Reação por condensação de Claisen-Shimidt via catálise ácida.....	24
FIGURA 6. Reação de sequestro da glutatona por chalconas.....	25
FIGURA 7. Vias de morte celular por apoptose.....	26
FIGURA 8. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.....	27
FIGURA 9. Ciclo celular eucariótico.....	30
FIGURA 10. Complexos proteicos envolvidos com ciclo celular.....	31
FIGURA 11. Representação esquemática do desenho experimental utilizado nesta pesquisa.....	35
FIGURA 12. Fórmula estrutural plana de Chalc6a.....	36
FIGURA 13. Alterações morfológicas em células HCT-116.....	43
FIGURA 14. Teste de externalização de fosfatidilserina em células HCT-116 após tratamento com Chalc6a (nas concentrações de 2.5, 5.0 e 10.0µM) e menadiona (concentração 20µM) por 24h avaliadas através de citometria de fluxo.....	44
FIGURA 15. Alterações morfológicas em células HCT-116.....	45
FIGURA 16. Percentual de membranas mitocondriais despolarizadas após tratamento com Chalc6a por 24h avaliadas através de citometria de fluxo.....	46
FIGURA 17. Ciclo celular de HCT-116 após tratamento com Chalc6a por 24h avaliadas através de citometria de fluxo.....	47
FIGURA 18. Possível mecanismo de ação da Chalc6a em células HCT116.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais ciclinas e Cdk's envolvidas no ciclo celular.....	32
Tabela 2. Citotoxicidade de Chalcona 6a (Chalc6a) em diferentes concentrações (0,02 – 20 µM) em diferentes linhagens celulares tumorais humanas e células não tumorais após 72h de incubação usando o Ensaio do MTT.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

- AINE – Anti-inflamatório não esteroidal
- BAD – *BCL2 associated agonist of cell death*
- BAX – *BCL2 associated X*
- BCL-2 – *B-cell lymphoma 2*
- CCR – Câncer colorretal
- CDK – *cyclin dependent kinase*
- CI₅₀ – Concentração inibitória para 50%
- DNA – *Deoxyribonucleic acid*
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- H2AX – *H2A histone Family member X*
- HDAC – *Histone deacetylase*
- HTS - *High throughput screening*
- IARC – *International Agency for Research on Cancer*
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- IP – Iodeto de propídio
- LabNOE – Laboratório Nacional de Oncologia Experimental
- miRNA - *MicroRNA*
- NCI – *National Cancer Institute*
- NF-κB – *Nuclear factor kappa B*
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PMEM – Permeabilidade de membrana externa mitocondrial
- RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*
- TRAIL – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
- UFC – Universidade Federal do Ceará
- UVA – Universidade Estadual Vale do Acaraú

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA	14
PARTE 1 – REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS	17
A) O CÂNCER	17
B) CÂNCER COLORRETAL	18
C) <i>SCREENING</i> DE NOVAS “DROGAS” COM POTENCIAL ANTICÂNCER	21
D) AS CHALCONAS	23
E) MORTE CELULAR E ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER	26
F) CICLO CELULAR E O CÂNCER	30
II. OBJETIVOS	35
A) GERAL	35
B) ESPECÍFICOS	35
PARTE 2 - TRABALHO EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
A) DESENHO EXPERIMENTAL	36
B) OBTENÇÃO DO COMPOSTO-TESTE	37
C) LINHAGENS CELULARES	38
D) ENSAIO DO MTT	38
E) MORFOLOGIA CELULAR	39
F) CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
i. <i>Integridade da membrana e densidade celular</i>	40
ii. <i>Externalização da fosfatidilserina</i>	40
iii. <i>Despolarização mitocondrial</i>	41
iv. <i>Conteúdo de DNA</i>	41
RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
A) CITOTOXICIDADE.....	42
B) MORFOLOGIA CELULAR E APOPTOSE	43
c) <i>Ciclo celular</i>	47
MANUSCRITO	54
REFERÊNCIAS	67

INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA

Os tratamentos antitumorais disponíveis atualmente representam um grande avanço científico na luta contra o câncer. Entretanto, muitos pacientes experimentam graves efeitos adversos ou, ainda, chegam a óbito mesmo cumprindo rigorosamente o esquema terapêutico. De fato, as estatísticas têm demonstrado que o câncer continua sendo um grave problema de saúde pública e que, portanto, merece atenção especial, justificando a necessidade continuada do desenvolvimento de novos ou melhores tratamentos (KEUM & GIOVANNUCCI, 2019). Grande parte dessa necessidade ocorre devido a problemas de falha terapêutica, seja devido a custos insustentáveis, alvos moleculares errados ou surgimento de resistência por parte das células tumorais (MAEDA & KHATAMI, 2019).

Dados disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para dados mundiais de forma consolidada, com base em informações da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), indicam mais de 17 milhões de novos casos em 2018 além de estimativa de mais de 27 milhões de novos casos em 2040 (excetuando os casos de câncer de pele não melanoma). Dentro os casos em 2018, os mais incidentes são câncer de pulmão (12,3%), mama (12,3%) e colorretal (10,9%).

Segundo o INCA/BR (2021), números para o Brasil no ano de 2020 estimam a ocorrência de mais de 310 mil e 316 mil casos novos de câncer em homens e mulheres, respectivamente. O perfil epidemiológico encontrado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (59 mil) em mulheres seriam os mais frequentes. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), cólon e reto (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), cólon e reto (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) eram os principais tipos de câncer detectados. Em relação a mortalidade, em 2018, houve um total de 117 mil e 107 mil mortes em homens e mulheres, respectivamente. Entre os homens, os tipos de câncer com maior mortalidade foram pulmões (13,9%), próstata (13,3%) e cólon e reto (8,2%). Entre mulheres, os tipos de câncer com maior mortalidade foram os de mama (16,4%), pulmões (11,5%) e cólon e reto (9,3%). Este cenário reforça a necessidade de se continuar a pesquisa para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial anticâncer.

Dessa maneira, observa-se que, apesar do avanço no conhecimento da doença e nas formas de tratamento, as estatísticas de mortalidade em virtude do câncer ainda são inaceitavelmente altas. Mesmo alguns tratamentos mais atuais ainda possuem efeitos colaterais excessivos, piorando gravemente a qualidade de vida dos pacientes. Assim, os dados reforçam que continua sendo relevante a busca de novas opções terapêuticas para o tratamento do câncer (AGGARWAL, 2019).

Nesse contexto, a síntese química de moléculas tem se destacado como uma importante ferramenta de pesquisa na busca por novos medicamentos para o tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer. Essa importância é fortalecida pelo fato de que a obtenção de fármacos que são produtos naturais é dificultada, muitas vezes, pelo baixo rendimento no processo de extração aliada às dificuldades de cultivo das espécies produtoras em larga escala. Neste sentido, os processos químicos de síntese total ou de semissíntese têm resolvido muitos problemas, principalmente na obtenção de fármacos anticâncer mais potentes e estáveis, com propriedades farmacocinéticas melhoradas e com menos efeitos adversos. É válido ressaltar que os estudos químicos de relação estrutura-atividade dos compostos são ferramentas complementares que fundamentam e orientam o processo de obtenção de uma segunda geração de fármacos (ORTHOLAND & GANESAN, 2004; ISMAEL et al., 2008).

Nesse âmbito, a classe química das chalconas tem sido alvo de interesse de muitos pesquisadores, os quais têm sintetizado inúmeras moléculas com promissores efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* (KARTHIKEYAN et al., 2015). De fato, muitas chalconas têm demonstrado a capacidade de induzir morte celular por apoptose *in vitro* e *in vivo* em diversas linhagens tumorais humanas. Em parte, esta habilidade pode ser explicada pela inibição da polimerização da tubulina e/ou interação com o DNA celular que são alvos anticâncer importantes uma vez que participam ativamente do processo de proliferação celular (LINDAMULAGE et al., 2017; HASSAN et al., 2017; SHANKARAIAH et al., 2017).

Recentemente, o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LabNOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC) em parceria com o Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual Vale do Acaraú de Sobral (UVA), Ceará, iniciou o estudo citotóxico anticâncer de uma série de 20 chalconas oriundas de síntese química (dados não publicados). Os resultados preliminares identificaram a nova chalcona Chalc6a (Figura 2) como detentora de forte e seletiva atividade citotóxica em linhagem celular de carcinoma colorretal humano HCT-116 ($IC_{50} = 2.37 \pm 0.73 \mu M$). A análise da relação

estrutura-atividade dos compostos avaliados indicou que o potencial anticâncer da Chalc6a foi favorecido pelo efeito combinado de dois grupos retiradores de elétrons com a ausência de um sistema adicional de ligações duplas. Estes dados mostram um potencial quimioterapêutico da Chalc6a, o que mostra a necessidade de continuidade do estudo para uma melhor compreensão do seu mecanismo de ação.

Percebe-se, então, que o uso de estratégias de síntese química aliado a estudos biológicos *in vitro* e *in vivo* constituem um caminho promissor na obtenção de novos fármacos anticâncer que superem as dificuldades identificadas na quimioterapia disponível atualmente. Com essa base, buscou-se avaliar a ação da Chalc6a como um composto promissor para tratamento de câncer colorretal devido a classe das chalconas já mostrarem resultados promissores agindo na indução de apoptose (CHEN *et al.*, 2017; DONG *et al.*, 2018), promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZHANG *et al.*, 2017), regulação do p53 (SANTOS *et al.*, 2019), fragmentando DNA e induzindo a despolarização de membrana mitocondrial (KUBALKOVA *et al.*, 2009) ou promovendo aprisionamento do ciclo celular na fase G2/M (KELLO *et al.*, 2016).

PARTE 1 – REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

I. REVISÃO DE LITERATURA

a) O câncer

Câncer é relacionado a mais de 100 tipos de doenças que promovem o crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos e órgãos. Sua rápida divisão faz com que tenha comportamento agressivo e incontrolável na formação de tumores que em estágios mais avançados se espalham para outras regiões do corpo. A classificação do câncer está relacionada ao tipo de tecido de origem. Sua origem é múltipla, podendo ser relacionada a fatores ambientais ou genéticos.

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo, sendo uma das quatro principais causas de mortes antes dos 70 anos na maior parte dos países. A incidência e mortalidade associadas ao câncer gradualmente crescem devido ao envelhecimento da população, pelo crescimento populacional e, também, devido a mudanças nos padrões de vida por questões socioeconômicas (INCA, 2020). As células que se tornam cancerígenas são diferenciadas de células normais por algumas características comuns, apesar da grande variedade gênica que é possível encontrar em uma massa tumoral específica. Essas características comuns são basicamente a capacidade crônica de proliferação, evasão de sistemas de supressão do crescimento, ativação de invasão celular e metástase, promoção de imortalidade, indução de angiogênese e resistência a morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Nesse contexto, as células cancerosas são diferentes das células saudáveis por apresentarem potencial proliferativo ilimitado, autossuficiência para os sinais de crescimento e resistência aos sinais antiproliferativos e apoptóticos. Formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), invasão tecidual e capacidade de sofrer metástase são outras propriedades que podem ser acrescentadas (HANAHAN e WEINBERG, 2000; HANAHAN e WEINBERG, 2011). Alguns trabalhos têm sugerido a adição de outras características que são: fuga do sistema imune (KROEMER e POUYSSEUR, 2008) e fenótipos de estresse (metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e de dano ao DNA) (LUO et al., 2009). Assim, Hanahan e Weinberg (2011), considerando o progresso conceitual no entendimento da biologia do câncer, publicaram um trabalho de revisão que revalida os seis marcos do câncer registrados por eles em 2000, e estabelece a adição de

4 marcos que são: estresse energético, instabilidade genômica, evasão do sistema imune e promoção tumoral por inflamação (Figura 1).



FIGURA 1. Os marcos do câncer. Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Com esse perfil, as células cancerosas tornam-se menos especializadas em suas funções e, aos poucos, substituem as células saudáveis comprometendo o funcionamento dos órgãos, levando quase sempre, o indivíduo à morte (ALMEIDA et al., 2005).

É importante ressaltar que as múltiplas características adquiridas pela célula tumoral são as que as diferenciam das demais do organismo, sendo essas a base oncológica da busca de novas moléculas no combate ao câncer.

b) Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) é um tipo de câncer que se desenvolve na parede interna do colón e reto do sistema digestório e que possui grande relevância no cenário epidemiológico mundial por se tratar de um câncer com alta incidência. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2021), o CCR é o terceiro que mais acomete homens em todo o mundo e o segundo acometendo as mulheres. A ocorrência, estimada para

2020, desse tipo de câncer ultrapassa 41.010 mil casos novos em 2018 sendo 20.540 para homens e 20.470 para mulheres, como mostra nas tabelas abaixo (INCA, 2021). A figura 2 mostra a evolução temporal de tecido saudável até CCR.

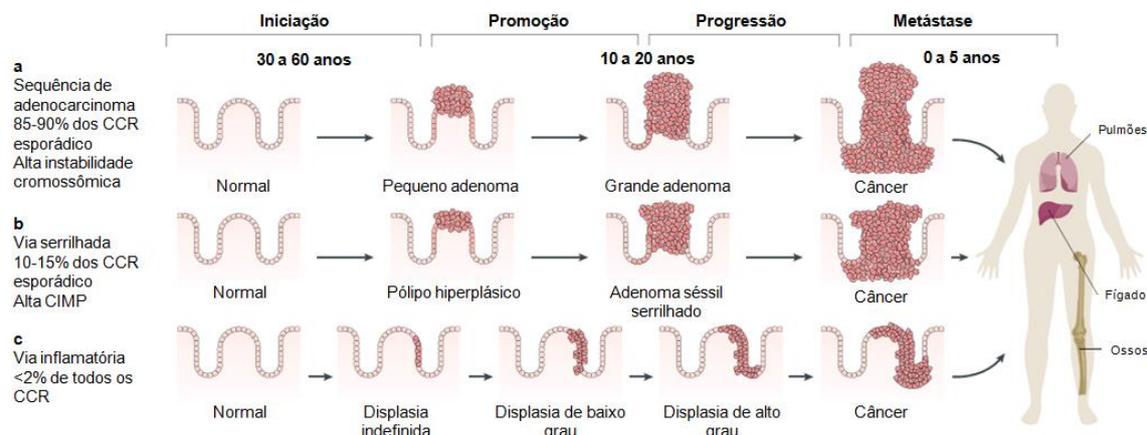


FIGURA 2. Desenvolvimento temporal do CCR. Fonte: adaptado de Keum e Giovanucci, 2019. CCR: câncer colorretal; CIMP: fenótipo de ilha CpG metiladora.

O CCR é uma doença multifatorial influenciada por fatores genéticos (componente hereditário, como polimorfismos) e/ou fatores ambientais (forma esporádica, hábitos tabagistas e etilistas) (FLEMING, 2018). Nesse contexto, estima-se que 20% dos casos sejam hereditários, sendo 5% na forma não polipoide e 1% do tipo polipose adenomatosa familiar (FAP). Já a forma esporádica, mais ligada aos fatores ambientais, corresponde a 80% dos casos (VALADÃO 2007; INCA 2018).

O CCR, como outros tipos de câncer, tem início assintomático, o que dificulta muito o seu diagnóstico na fase inicial, onde, geralmente, se tem os melhores resultados de tratamento. Alguns sinais e sintomas podem ser utilizados para um possível diagnóstico: dor abdominal, sangue oculto e alteração nas fezes ou alterações de hábito intestinal. Há possibilidade de haver outros tais como muco nas fezes, obstrução intestinal aguda ou dor no baixo ventre. O CCR é um tipo de câncer que responde ao controle de fatores de risco e rastreamento precoce. Um desses tipos de controle é através de retirada de pólipos que podem ser detectados em exames diagnósticos que são indicados a partir dos 40 anos para pacientes com alto risco ou dos 50 anos para pacientes com menor risco (MENEZES et al., 2016). Além dos exames por imagem, comuns para diagnóstico nesse tipo de câncer, há outros tipos de diagnóstico e prognóstico sendo desenvolvidos como através de níveis séricos de cálcio (SILVEIRA, 2018), miRNAs (MORIDIKIA et al., 2017) ou flora bacteriana nas fezes (LIANG et al., 2017).

Este tipo de câncer, como a grande maioria, é uma doença multifatorial. O CCR é influenciado, por exemplo, por fatores genéticos, apresentando mutações em genes que participam diretamente das vias responsáveis por regular o crescimento celular, como os genes supressores de tumor e os proto-oncogenes (BHALLA, 2018; HUANG, 2018). Outros fatores que influenciam no surgimento de CCR são idade, gênero e fatores ambientais, como o estilo de vida e os hábitos alimentares (MALEY, 2014). A soma de todos esses fatores, com variações que ainda não conseguem ser determinadas quanto à sua importância, podem então levar a predisposição à doença (VLAYKOVA 2009; GORUKMEZ, 2016; GLOBOCAN, 2017). O tabagismo e o etilismo são outros dois fatores de risco para o CCR. O tabaco tem em sua composição diversas substâncias carcinogênicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), nitrosaminas, entre outros, aumentando assim a agressão ao DNA (LIANG, 2009; XUE, 2014; FERNANDES, 2016).

O CCR é tratável e, na maioria dos casos, curável ao ser detectado no início, quando não está espalhado por outros órgãos (INCA 2018). As formas atuais de tratamento do CCR são basicamente as mesmas utilizadas em outros tipos de câncer: radioterapia, quimioterapia e cirurgia. O processo cirúrgico é extremamente eficaz embora muitas vezes não realizado devido aos riscos relacionados ao local de instauração do tumor. A radioterapia tem seu uso evitado por promover diversos efeitos colaterais nos pacientes por não possuir especificidade causando, assim, morte de células que crescem rapidamente, sejam saudáveis ou tumorais. A vantagem do uso de quimioterápicos é marcante quando não há possibilidade cirúrgica e para evitar efeitos colaterais da radioterapia. Contudo, esse tipo de tratamento pode promover a seleção de células resistentes aos fármacos (VASAN *et al.*, 2019). Os quimioterápicos podem ser utilizados para tratamento paliativo, curativo, adjuvante ou neoadjuvante. Alguns dos quimioterápicos usados são: 5-fluorouracil, doxorrubicina, paclitaxel, irinotecano entre outros (DICKENS e AHMED, 2018). O aumento da eficiência quimioterápica tem sido alcançado com a aplicação de formulações funcionalizadas caracterizando um sistema de drug-delivery para o tumor a ser tratado (SENAPATI *et al.*, 2018).

Por fim, apesar de novas terapias (terapia celular, vacinas antitumorais e drogas biotecnológicas) estarem sendo avaliadas com o preceito de serem mais eficazes que a quimioterapia convencional, a necessidade de mais estudos sobre suas ações ainda faz a quimioterapia como uma importante ferramenta para tratamento de câncer (FALZONE *et al.*, 2018).

c) *Screening* de novas “drogas” com potencial anticâncer

As estratégias para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer tem mudado ao longo dos anos. Os programas de *screening* começaram no início dos anos 50 no *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), e consistiam no teste inicial de novos compostos, principalmente produtos naturais, em camundongos inoculados com leucemias L-1210 e P-388. Esse modelo foi bastante questionado, uma vez que não era considerado representativo dos tumores humanos, na sua maioria tumores sólidos (SCHWARTSMANN & WORKMAN, 1993).

O modelo foi reconsiderado e os programas de *screening* do NCI incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas utilizando técnicas automatizadas HTS (*high throughput screening*) com o intuito de avaliar a capacidade antiproliferativa dos compostos. Os testes de investigação do mecanismo de ação desses compostos são realizados a partir de ensaios bastante sensíveis e que avaliam o efeito em alvos celulares mais específicos e pontuais – sistemas enzimáticos, metabólicos, funcionais ou estruturais (NEWMAN et al., 2003; CRAGG et al., 2009).

Em seguida, os compostos selecionados são submetidos ao teste do *HollowFiber* antes de serem avaliados em modelos xenográficos de tumores humanos. O *HollowFiber* combinado ao modelo xenográfico constitui o modelo básico do teste antitumoral pré-clínico *in vivo*. Os testes *in vivo* são conduzidos com os compostos selecionados nas etapas iniciais de *screening* para avaliar seu efeito antitumoral em animais de laboratório portadores de tumor. São propostos diversos esquemas de tratamento, alguns em combinação com outras drogas, particularmente aquelas utilizadas na clínica (revisado por WAGNER-DÖBLER et al., 2002; NEWMAN & CRAGG, 2004).

Vale ressaltar a importância dos estudos pré-clínicos sobre a toxicologia (KRAMER et al., 2007) e farmacocinética (WEBBORN, 2014) do composto que são essenciais para conhecer seus padrões metabólicos e parâmetros fisiológicos assim como a dose tolerada e os efeitos adversos. Essas informações são fundamentais para a discussão dos possíveis efeitos em humanos, antes de prosseguir para a etapa dos ensaios clínicos (ANDRADE et al., 2016; SMIETANA et al., 2016; PACEY et al., 2017).

Todo esse contexto acelerou a pesquisa de novas drogas anticâncer, levando a uma grande demanda por bibliotecas de novas e promissoras moléculas. Dessa maneira,

muitas companhias farmacêuticas são dotadas de estrutura capaz de realizar o *screening* rápido de inúmeros compostos em relação a muitas atividades biológicas simultaneamente (citotoxicidade, antibacteriana, anti-inflamatória e antiviral). Os testes são desenvolvidos com o mínimo de intervenção humana, sendo o trabalho realizado, em sua maioria, por sistemas robóticos acoplados a novas técnicas de fluorescência, ressonância magnética nuclear e de DNA (MANN, 2002; CRAGG et al., 2009; LI & XIA, 2019).

Além disso, há plataformas de testes *in silico* capazes de prever matematicamente possíveis efeitos tóxicos e características cinéticas (SZYMAŃSKI et al., 2012), além de realizar testes computacionais com combinações de grupos farmacofóricos de drogas diferentes (LIU et al., 2019) e realizar os primeiros testes *in vitro* em culturas 3D com objetivo de ter melhores respostas sobre como as drogas agirão em tumores (LANGHANS, 2018). Algumas das ferramentas disponíveis são: TEST (<https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>), eMolTox (<http://xundrug.cn/moltox>), PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>), MouseTox (<http://enalos.insilicotox.com/MouseTox/>), SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), ADMETLab (<http://admet.scbdd.com/calcpred/index/>), entre outros.

Outra abordagem que tenta melhorar o arsenal de drogas contra o câncer incluem o reposicionamento de drogas (NOSENGO, 2016; ANTOSZCZAK et al., 2019). Nesta área, são utilizadas diversas ferramentas de bioinformática para a busca de fármacos conhecidos, que possuem comprovada ação, para o tratamento de doenças diferentes, a exemplo do tratamento para diversos tipos de câncer. Exemplos de drogas que estão em fases de testes são o ácido tolfenâmico (uma droga AINE), celecoxibe (AINE seletivo para COX-2) e pleconaril (antirretroviral) (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2019).

Nos últimos 5 anos, foram lançados 55 novos compostos para tratamento do câncer. Os custos tornam-se cada vez maiores, sendo que alguns tratamentos podem chegar a 150 mil dólares por paciente ao ano. No Brasil ainda se tem um outro agravante que é a disponibilidade de tratamentos mais inovadores só estarem acessíveis a pacientes em determinados centros, promovendo um tratamento desigual entre a população (AGUIAR et al., 2019). Todos esses fatores convergem para o que Scannell et al (2019) consideram como um declínio na eficiência do processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos pela indústria, o que reforça a necessidade de buscar moléculas ligadas a processos menos custosos de desenvolvimento e produção.

d) As chalconas

As chalconas são espécies químicas distribuídas, principalmente, em plantas arbóreas e rasteiras consideradas precursoras essenciais para a biossíntese de flavonóides (RAO, FANG E TZENG, 2004). Possuem nomenclatura oficial básica (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona, sendo caracterizadas como cetonas aromáticas α , β -insaturadas que possuem dois anéis benzênicos (anel A e B) ligados por ponte formada por 3 carbonos, conjugando grupamentos carbonílicos e porção olefínica (Figura 3). Não são caracterizados como flavonóides devido a presença de anel pirânico, este sendo formado por adição de oxigênio na posição 2 das chalconas e consequente ciclização com cadeia de 3 átomos de carbono e o anel A (CESARIN, FERREIRA E BRAZ, 2001).

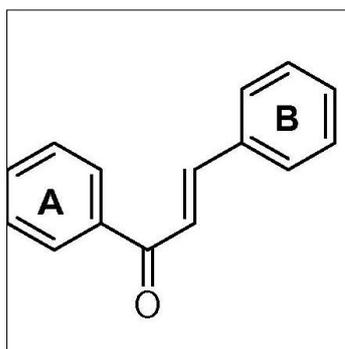


FIGURA 3. Estrutura química base das chalconas (Jeon et. al., 2016).

As chalconas podem ser obtidas por síntese química pela reação de condensação aldólica conhecida como reação Claisen-Schimidt entre cetonas e aldeídos aromáticos na presença de catalisadores básicos ou ácidos. O mecanismo de reação por catalização de Claisen-Schimidt via catalise básica está representado na figura 4.

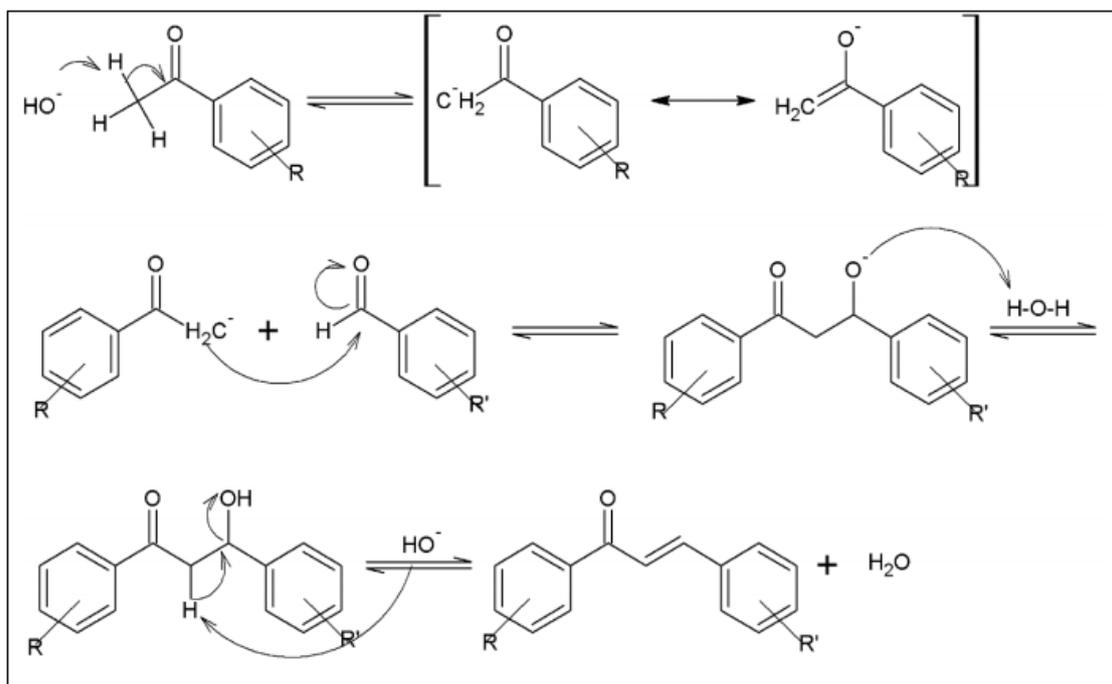


FIGURA 4. Reação por condensação via catálise básica de Claisen-Shimidt.

A reação de condensação aldólica é uma reação geral para todas as cetonas e aldeídos com átomos de hidrogênio *alfa* (α), enquanto as reações de condensação de Claisen-Shimidt são restritas as cetonas que possuem *alfa* (α) e aldeído que não os tenham (MURRY, 1997). A reação de condensação de reações por Claisen-Shimidt em meio básico é inicializada a partir da retirada de um hidrogênio α ácido, de uma molécula de cetona para formar o ionenolato, o qual se estabiliza com a ressonância. Apesar da carga negativa estar deslocalizada no ionenolato, o carbânion ataca a molécula de aldeído por adição nucleofílica e forma de ionalcóxido (intermediário tetraédrico). A protonação do ionalcóxido gera o produto de condensação e regenera o catalisador básico (MURRY, 1997).

A reação de Claisen-Shimidt em meio ácido, por sua vez, é inicializada com a protonação do oxigênio de carbonila tornando-a mais eletrofílica. Logo após, através de um equilíbrio ceto-enólico sobrevém a formação do enol. Este será ligado a carbonila protonada, formando um íon oxônio, que sofre prototropismo. Finalmente, ocorre a saída de água com a formação de cetona α,β -insaturados e a regeneração do catalisador ácido (COSTA, 2005).

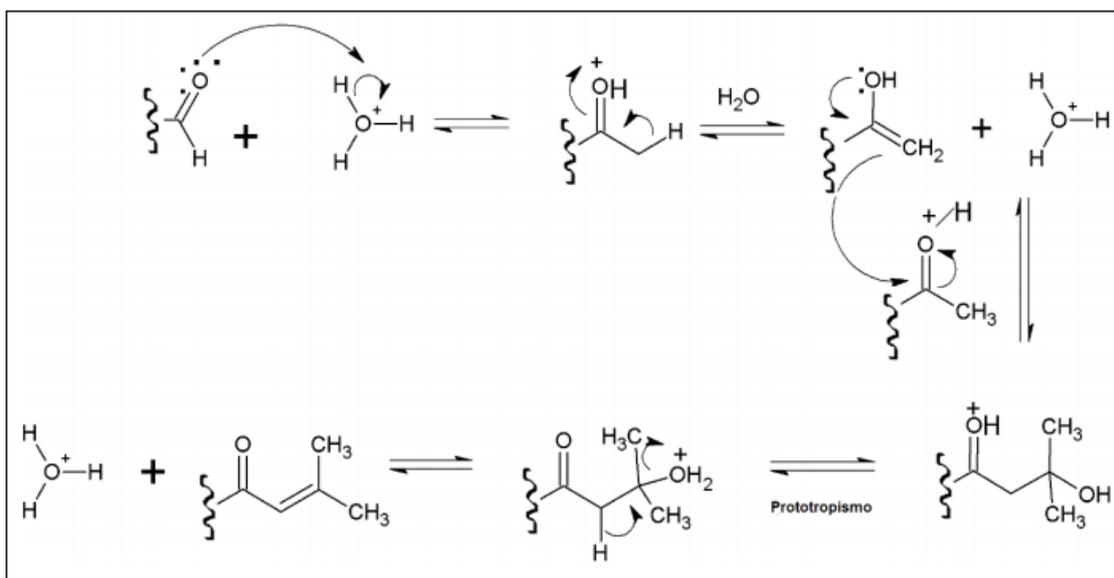


FIGURA 5. Reação por condensação de Claisen-Shimidt via catálise ácida.

As chalconas são interessantes quimicamente devido a sua versatilidade para modificações em suas estruturas ampliando sua capacidade e potência do ponto de vista farmacológico. As alterações mais frequentemente relatadas nas chalconas são as substituições nos anéis A e B em diferentes posições (JURCSAK E ZAMINI, 1999), isomerizações cis-trans (IWATA et al, 1995), além de adições halogênicas na dupla ligação olefínica (BIEBER, 1999). Vogel *et. al.* (2010) destacam que substituições no anel A propiciaram maiores ações anti-inflamatórias e menor capacidade citotóxica nos compostos estudados.

As chalconas, seguindo sua grande variabilidade, tem apresentado atividade antiviral (COLE et. al., 2016), antiprotozoária (LUNARDI et al, 2003), antibacterianas (ALVAREZ et al 2004), anti-inflamatória (HERENCIA et al, 2002; ROJAS et al, 2002), antiplaquetária (KO et al, 2004), inibição de tirosinase (THANIGAIMANI et. al., 2015).

Em relação ao câncer, as chalconas tem surgido como interessantes protótipos para o desenvolvimento de moléculas com potencial antitumoral e têm mostrado, basicamente, três tipos de ações: ação antioxidante, citotóxica e indutora de apoptose. Essas ações têm sido relacionadas nos estudos de relação estrutura atividade com substituições dos anéis arila ou introdução de porções heterocíclicas (LÉON-GONZALEZ, A. J. et. al., 2015). Alvos de ação das chalconas podem ser: inibição da ATM (ASHRAF et. al., 2017), ativação de caspases 3 e 9, além de ciclina dependente de quinase 2 (CKD-2) (MORENO-LONDOÑO et. al., 2017), modulação de Bcl-2 com ativação de Bax e Bad (CHEN et. al., 2017), inibição de proliferação celular através de

desfosforilação de Akt e Erk (SHI et. al., 2017) e, em linhagem tumoral de cólon HCT-116, Shin et. al. (2016) mostraram que houve parada de ciclo celular, dano ao DNA marcado por fosforilação de H2AX e externalização de fosfatidilserina identificados por citometria de fluxo. Ainda em linhagem de células HCT-116, Pande et. al. (2017) demonstraram que chalconas promoveram parada do ciclo celular em G2/M e inibição de histona desacetilase (HDAC) com efeitos citotóxicos em HCT-116. Outros autores, como Fonseca et. al. (2015), Kuete et. al. (2015), Wu et. al. (2016), Semaan et. al. (2016), e Ng et. al. (2017), também tem relatado a ação de inibição de proliferação celular em linhagem HCT-116 através de outros mecanismos, tais como alterações em funcionamento em ias de sinalização e alterações de ciclos celulares.

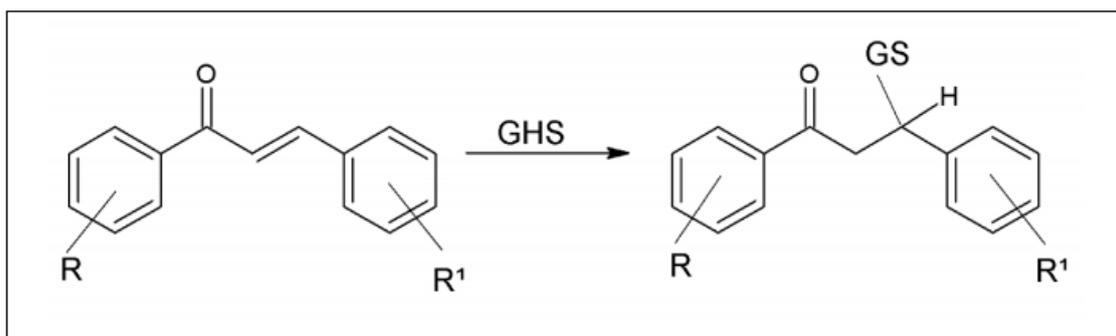


FIGURA 6. Reação de sequestro da glutathione por chalconas.

e) Morte celular e estratégias para o tratamento do câncer

O processo de morte celular foi descrito primeiramente por Carl Vogt em 1842. Desde a descoberta inicial, diferentes modos de morte e suas condições morfológicas associadas têm sido identificadas e estudadas. Por um longo tempo, a morte celular foi considerada como somente um acidente e todo seu processo regulatório permanecia desconhecido (CLARGALLUZI *et al.*, 2015). O processo de morte celular, historicamente, passou a ser dividido em três processos morfológicamente distintos: apoptose (tipo 1), autofagia (tipo 2) e necrose (tipo 3). Todos esses tipos são ativados por estímulos únicos de sinalização que muitas vezes passam a sobrepor outras vias. Apesar dessa classificação, há diversos outros tipos de morte celular, tais como: ferroptose, senescência, morte celular imunogênica, necrose dirigida por transição de permeabilidade

mitocondrial, necroptose, morte celular dependente de lisossomos, piroptose, catástrofe mitótica entre outros (GALLUZI *et al.*, 2018).

Morte celular pode ocorrer em múltiplas formas como resposta a diferentes tipos de estresse, especialmente estresse oxidativo. A perda de controle sobre um ou mais tipos de morte celular contribuem para doenças tais como câncer, doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes e doenças infecciosas. É importante que haja um entendimento aprofundado dos processos celulares que ocorrem no câncer para que se possa criar/modificar formas mais eficientes de tratamento (TANG *et al.*, 2019).

A apoptose é o tipo de morte celular mais estudado (WONG, 2011) por se tratar de um mecanismo fundamental para organismos multicelulares, tanto em processos fisiológicos quanto em processos patológicos. As células que entram em apoptose possuem características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas específicas. (Kerr *et al.* 1972; Liu *et al.*, 1996). A apoptose pode ser dividida em duas formas: extrínseca e intrínseca. Na via intrínseca a morte celular é caracterizada por perturbações do microambiente celular que incluem retiradas de fator de crescimento, dano ao DNA, estresse de retículo endoplasmático, aumento de espécies reativas de oxigênio, alterações em microtúbulos, defeitos mitóticos entre outros. Outra característica importante é a manutenção de integridade de membrana. O desencadear da morte por via extrínseca é iniciada com a ligação a receptores específicos (como o TNFRSF1A) ou com a alteração de níveis de sinalizações a níveis específicos (TANG *et al.*, 2019), a figura 7 mostra as vias e as moléculas envolvidas em cada tipo.

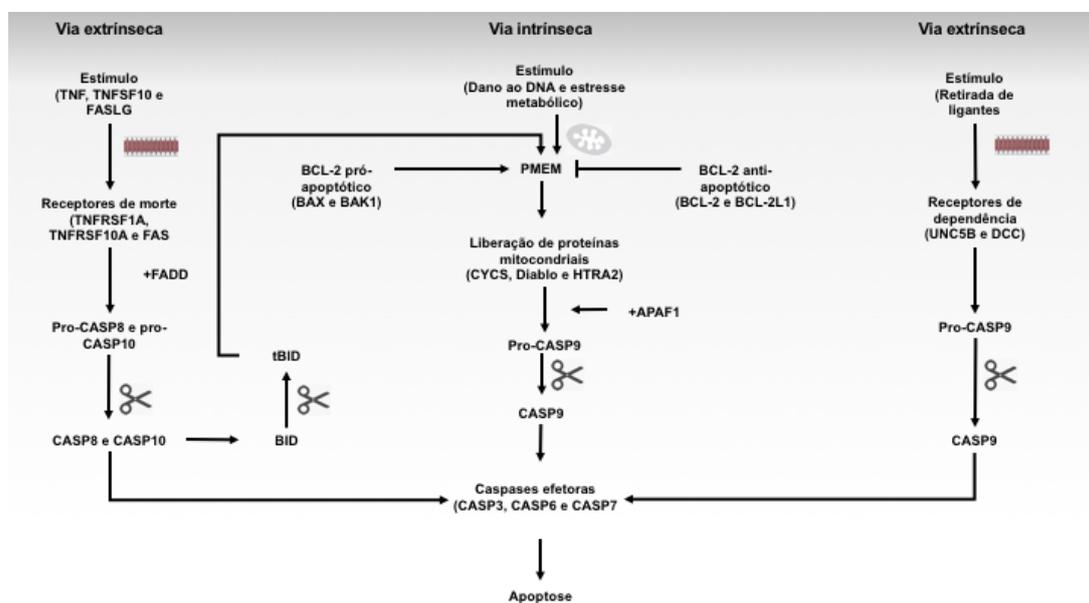


FIGURA 7. Vias de morte celular por apoptose. Fonte: adaptado de Tang *et al* (2019).

Apoptose é um processo geneticamente controlado e conservado por evolução sendo desencadeado por várias vias de sinalização quando o dano celular é considerado irreparável. Os dois principais tipos de vias apoptóticas, a via extrínseca (receptor de morte) e via intrínseca (mitocondrial), são ligados para aumentar o sinal apoptótico e ambos levam para a ativação de caspases, que são enzimas chave no processo apoptótico, que clivam proteínas que levam à morte celular (Figura 8). É importante citar que o conhecimento do funcionamento dessas vias, aliado ao desenvolvimento de novas formas de modular esses pontos podem ser cruciais no surgimento de novas ferramentas terapêuticas contra o câncer (FULDA & DEBATIN, 2006; BAIG et al., 2016).

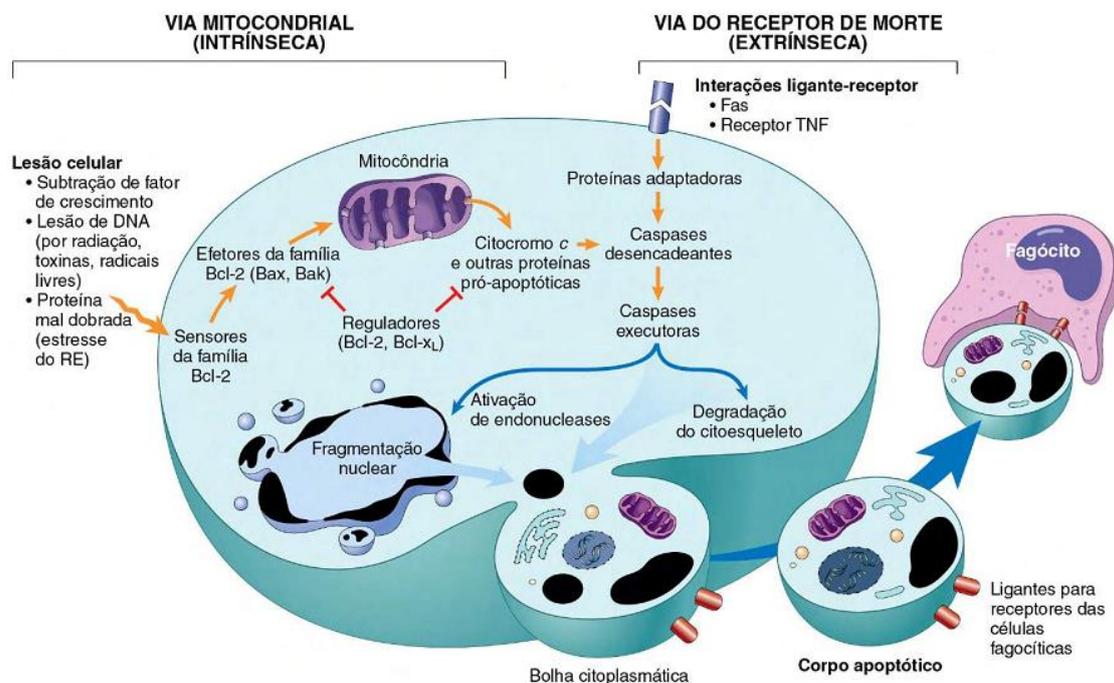


FIGURA 8. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Fonte: adaptado de Kumar *et al.*, (2013).

Sendo um dos principais fatores envolvidos da morte celular, como descrito anteriormente, as caspases estão, usualmente, na forma inativa de pró-enzima e depois de sua ativação ou clivagem própria pode tornar ativa outras caspases, resultando em cascata de proteases, amplificando o sinal apoptótico e acelerando o processo de morte celular. A maioria das caspases são pró-apoptóticas, mas algumas delas podem fazer parte do processo inflamatório, tais como as caspases 1, 4, 5 e 11 (JIMENEZ FERNANDES, 2015) ou estarem envolvidas em processos de diferenciação de queratinócitos, como a caspase 14 (RENDL *et al.*, 2002). Existem dois grupos de caspases apoptóticas, caspases

iniciadoras (caspase 2, 8, 9 e 10) e caspases efetoras (caspase 3, 6 ou 7). As caspases iniciadoras, tais como sinalizado pelo nome, ativam outros complexos e caspases efetoras. As caspases efetoras, por exemplo, a caspase 3, cliva proteínas antiapoptóticas, tais como inibidor de caspase ativado por DNase ou BCL-2 (THORNBERRY *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 1997), além de estruturas celulares como proteínas reguladoras do citoesqueleto (TAKAHASHI *et al.*, 1996). Ativação de caspases resultará em ativação de fragmentação de DNA e encolhimento celular. Outra importante característica da apoptose é a exposição da fosfatidilserina na superfície da célula para que haja atração de macrófagos para as células apoptóticas (BRATTON *et al.*, 2010).

A maioria das drogas anticâncer iniciam apoptose pela via intrínseca. Entretanto, uma das razões para a resistência a terapias são mutações frequentes nos genes relacionados a apoptose por via mitocondrial. Por exemplo, mutações no gene p53 são as mais prevalentes do câncer em humanos, detectados em 80% das linhagens celulares tumorais e em 40% dos tumores humanos, que além do mais afeta a efetividade da via intrínseca de apoptose (YU *et al.*, 2010). Além disso, mutações no gene bax, tais como substituições simples de nucleotídeos, foram identificadas tanto em tumorais sólidos como em hematológicos (KITADA *et al.*, 2002). Em adição a isso, células cancerígenas possuem altos níveis de proteínas pró-apoptóticas, embora sua ativação seja inibida de diversas formas (YANG *et al.*, 2003). A apoptose intrínseca pode ser suprimida pela superexpressão de proteínas inibidoras da apoptose (PIAs). Assim sendo, a inibição das PIAs é um importante caminho para avaliação de novas drogas contra o câncer. Por exemplo, superexpressão de Smac/DIABLO ou administração de ligantes de PIAs, tal como Smac-N7, pode sensibilizar células tumorais ao tratamento (BARTLING *et al.*, 2004; MCNEISH *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2006). Contudo, PIAs não aparentam ser os principais reguladores de indução de apoptose. Outra via que regula proteínas apoptóticas é por modulação transcricional e pós-transcricional. Por exemplo, família de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 são reguladas por transcrição por meio do NF- κ B de células B ativadas (CATZ *et al.*, 2001).

As células cancerígenas também desenvolveram várias estratégias para evitar os sinais apoptóticos extrínsecos. A morte celular é evitada por um aumento nas moléculas antiapoptóticas ou por uma diminuição ou disfunção nas proteínas pró-apoptóticas. Por exemplo, as células tumorais podem ter mutações (DEBATIN *et al.*, 2000; DECHANT *et al.*, 2004; PAI *et al.*, 1998) ou regular negativamente a expressão nos receptores de morte da superfície celular (FRIESEN *et al.*, 1997). Além disso, a sinalização do receptor de

morte nas células tumorais também pode ser evitada afetando a atividade de seus domínios citoplasmáticos. Um desses reguladores é a proteína FLIP, inibidora da caspase-8, que é altamente expressa em muitas células cancerígenas (KRUEGER *et al.*, 2001; FULDA *et al.*, 2000; LONGLEY *et al.*, 2006).

Numerosas drogas anticâncer induzem a expressão de CD95L e a morte extrínseca das células via receptor CD95. Este processo é independente de p53 e é especialmente útil para pacientes com p53 excluído, mutado ou inativado (EL-DEIRY, 2001). No entanto, CD95L e TNF α mostraram efeitos colaterais graves e, portanto, seu uso clínico é questionável (WALCZAK *et al.*, 2002), enquanto TRAIL tem sido candidato mais promissor (LEBLANC *et al.*, 2003). O efeito sinérgico do TRAIL e dos medicamentos quimioterapêuticos resulta em uma regulação negativa das proteínas antiapoptóticas (OLSSON *et al.*, 2001) e na regulação positiva das moléculas pró-apoptóticas (GUO *et al.*, 2014), o que leva à ativação da via apoptótica intrínseca e extrínseca, promovendo efeito contra células tumorais bem maior.

Apesar dos vários possíveis alvos para tratamento do câncer CCR, há espaço para busca de outros alvos e novas drogas para o tratamento dessa doença considerando que ainda não se tem tratamento tão efetivo. Assim sendo, drogas melhores que as disponíveis atualmente são necessárias.

f) Ciclo celular e o câncer

A divisão celular consiste em dois processos consecutivos caracterizados pela replicação do DNA e sua divisão em duas células novas que são formadas. A repetição desse processo de proliferação celular denomina-se ciclo celular. O ciclo celular é controlado por numerosos mecanismos que garantem seu funcionamento correto. Esse processo é controlado por maquinaria celular específica que consiste de quinases dependentes de ciclina (CDKs), ciclinas e inibidores de CDKs (VERMEULEN *et al.*, 2003). Sabe-se que defeitos no ciclo celular associados a tumores são frequentemente relacionados com alterações na atividade das CDKs. Essa desregulação induz proliferação desordenada além de instabilidade genômica e cromossômica (MALUMBRES e BARBACID, 2009). O ciclo celular de células de mamíferos é um processo altamente organizado de modo a garantir seu correto funcionamento, sendo que conta com a participação de sinais reguladores de crescimento bem como proteínas que

monitoram a presença e ausência de danos ao DNA, como H2AX, por exemplo (OTTO e SICINSKI, 2017).

Danos ao DNA e anormalidades cromossômicas podem ocorrer em diferentes estágios do ciclo celular, que é o processo regulador da divisão celular (COLLINS *et al.*, 1997; MORGAN, 2007). O ciclo celular é separado nos 2 estágios seguintes: (i) interfase e (ii) fase M (CAMPBELL & REECE, 2006).

A interfase começa com a fase G₁, onde a célula possui 46 cromossomos e 46 cromátides. Na fase G₁, o conteúdo celular (organelas) cresce, com exceção dos cromossomos. Antes de completar a fase G₁, a nutrição precisa ser suficiente, fatores de crescimento precisam estar presentes e nenhum dano ao DNA ocorrer. Essa verificação no final da fase G₁ é chamada de ponto de verificação G₁ (ou checkpoint), que pode ou não permitir a entrada na próxima parte da fase. O próximo estágio da interfase é a fase de síntese (fase S), na qual o DNA é replicado e os cromossomos são duplicados, deixando-nos 46 cromossomos e 92 cromátides. O estágio final da interfase é o G₂, no qual a célula cresce e se prepara para a mitose. Esse ponto de verificação é o ponto de verificação chamado G₂, que garante que a replicação cromossômica seja concluída e que nenhum dano ao DNA tenha ocorrido (MORGAN, 2007). Essas fases são demonstradas na figura 8.

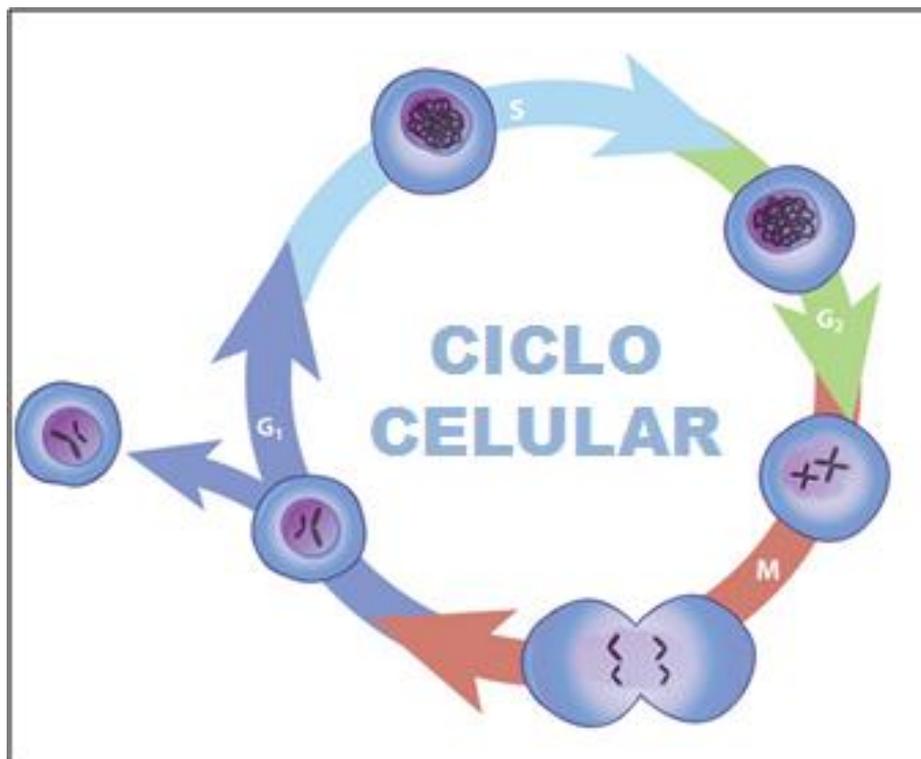


Figura 9. Ciclo celular eucariótico. Fonte: adaptado de Nature Education, 2020.

Após a finalização bem-sucedida da intérfase, a célula entra na fase M, que é separada em dois estágios: (i) mitose e (ii) citocinese. A mitose é a separação dos cromossomos dentro da célula original e a citocinese é a divisão da célula em duas células filhas presumivelmente idênticas. A mitose é ainda separada em (i) prófase, (ii) prometáfase, (iii) metáfase, (iv) anáfase e (v) telófase. O material cromossômico da prófase é condensado, o envelope do nucléolo é disperso, o citoesqueleto é desmontado e o fuso mitótico é montado. Na prometáfase, os cromossomos estão associados ao fuso mitótico, o que significa que os microtúbulos se conectam ao centrossomo orientado de forma polar. Na anáfase, as cromátides irmãs são separadas pelos centrossomas e movem-se para os pólos opostos. Na telófase, os cromossomos se agrupam em pólos opostos do fuso, os cromossomos se dispersam novamente, o envelope nuclear se remonta e reforma das organelas. Finalmente, a célula está pronta para iniciar a citocinese, que separa as duas células filhas. Essas células filhas podem reiniciar na fase G1 ou permanecer em uma parada reversível do ciclo celular chamada G0 (CAMPBELL & REECE, 2006; MORGAN, 2007).

A perda do controle do ciclo celular é uma marca registrada do câncer, onde há aumento da proliferação celular sem mecanismos de controle evitando senescência celular ou apoptose (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011; LODISH *et al.*, 2000). Além disso no câncer, há diversos eventos de perda de função de reguladores importantes, como RB, p16CDKN2A e p27CDKN1B. A funcionalidade do TP53 e do p21CDKN1 também é frequentemente perdida para contornar a resposta a danos no DNA, a parada do ciclo celular e a apoptose. Por outro lado, CDKs (*cell cycle dependente kinases* ou ciclinas dependentes de quinases) e ciclinas são reguladas em muitos tipos de câncer para aumentar o potencial proliferativo. A figura 10 mostra um esquema com complexos de ciclina-Cdk envolvidos no controle do ciclo celular. Em seguida, a tabela 1 mostra as ciclinas e quinases envolvidas em diversas etapas do ciclo celular.

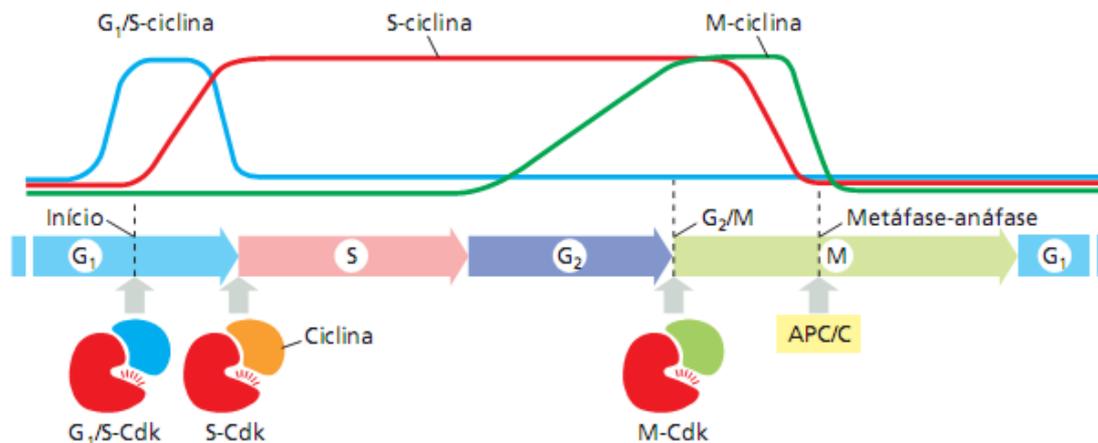


FIGURA 10. Complexos proteicos envolvidos com ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2017).

Tabela 1. Principais ciclinas e Cdk's envolvidas no ciclo celular.

Complexo de ciclina-Cdk	Ciclina	Parceiro de Cdk
G ₁ -Cdk	Ciclina D	Cdk4, Cdk6
G ₁ /S-Cdk	Ciclina E	Cdk2
S-Cdk	Ciclina A	Cdk2, Cdk1
M-Cdk	Ciclina B	Cdk1

Fonte: adaptado de Alberts *et al.*, 2017.

A compreensão da função das CDKs e de seus inibidores deu origem a vários produtos químicos desenvolvidos para atingir CDKs específicas (BESSON *et al.*, 2008; SHERR & ROBERTS, 1999), por exemplo, RO-3306 (CDK1i), CGP-082996 (CDK4i), THZ-2-102-1 (CDK7i), AT-7519 (CDK9i), KIN001-270 (CDK9i) ou THZ-2-49 (CDK9i). Existem também inibidores para múltiplas CDKs, por exemplo palbociclib (CDK4 / 6i) ou inibidores pan-CDK, por exemplo, CGP-60474 (CDK1 / 2/5/7 / 9i), roscovitina (CDK1 / 2/4/5 / 6i), PHA-793887 (CDK1 / 2/4/5/7 / 9i). Todos esses compostos visam a reduzir a atividade do ciclo celular.

Uma abordagem terapêutica alternativa para desacelerar o ciclo celular pode ser acelerá-lo ainda mais, permitindo que as células com DNA danificado prossigam nos pontos de verificação do ciclo celular. A princípio, isso pode parecer controverso, pois o câncer visa à proliferação descontrolada; no entanto, sua carga mutacional acumulada pode torná-las mais vulneráveis do que as células normais (HUBER *et al.*, 2014). Compostos experimentais como o 681640, que têm como alvo WEE1 e CHK1, são capazes de remover o 'freio de ciclo celular'. A inibição de WEE1 e CHK1 leva a alta atividade de CDKs, início prematuro da replicação e estruturas aberrantes que causam

susceptibilidade a danos no DNA (SØRENSEN & SYLJUÅSEN, 2012). Podendo todas essas abordagens servirem como formas de tratamento do câncer.

As limitações ao uso de agentes moduladores de ciclo celular na clínica se relacionam ao tipo de componente que será modulado. A inibição de CDK1, 2, 4, 7 ou 9 por drogas como Flavopiridol pode ocasionar diarreia severa e eventos vasculares. A inibição de CDK1, 2, 5, 7, 8 ou 9 por R-roscovitina é responsável por distúrbios eletrolíticos e efeitos adversos gastrointestinais. A inibição de CDK4 ou 6 seja por palbociclib, ribociclib ou abemaciclib é causadora de neutropenia, leucopenia, fadiga, náuseas e efeitos gastrointestinais adversos (BAI et al., 2017). O correto planejamento do uso de agentes inibidores de ciclo celular é extremamente importante para evitar maiores prejuízos ao paciente que já sofre com o câncer (LAPENNA et al., 2009; INGHAM et al., 2017).

Dessa maneira, percebe-se a importância do desenvolvimento de moléculas com potencial de interferir no ciclo celular de células neoplásicas uma vez que a multiplicação descontrolada é uma característica fundamental do câncer.

II. OBJETIVOS

a) Geral

Estudar o efeito citotóxico de Chalc6a em células tumorais humanas, em especial a linhagem HCT-116, por meio de ensaios *in vitro* visando ao desenvolvimento de um novo composto com potencial anticâncer.

b) Específicos

- i. Avaliar a citotoxicidade do composto-teste em diferentes linhagens celulares tumorais humanas e em linhagem celular não-tumoral;
- ii. Descrever a morfologia de células HCT-116 tratadas com o composto-teste;
- iii. Investigar a indução de apoptose (densidade celular/integridade de membrana, externalização da fosfatidilserina e despolarização mitocondrial) em células HCT-116 tratadas com o composto-teste;
- iv. Determinar o conteúdo de DNA (subG₀/G₁, G₀/G₁, S e G₂M) de células HCT-116 tratadas com o composto-teste;

PARTE 2 - TRABALHO EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS

a) Desenho experimental

O presente trabalho foi executado de acordo com o desenho experimental indicado pela **figura 11**. Nesta figura, percebe-se que o estudo foi dividido em 2 fases: Citotoxicidade (Fase 1) e Mecanismo de ação citotóxica (Fase 2).

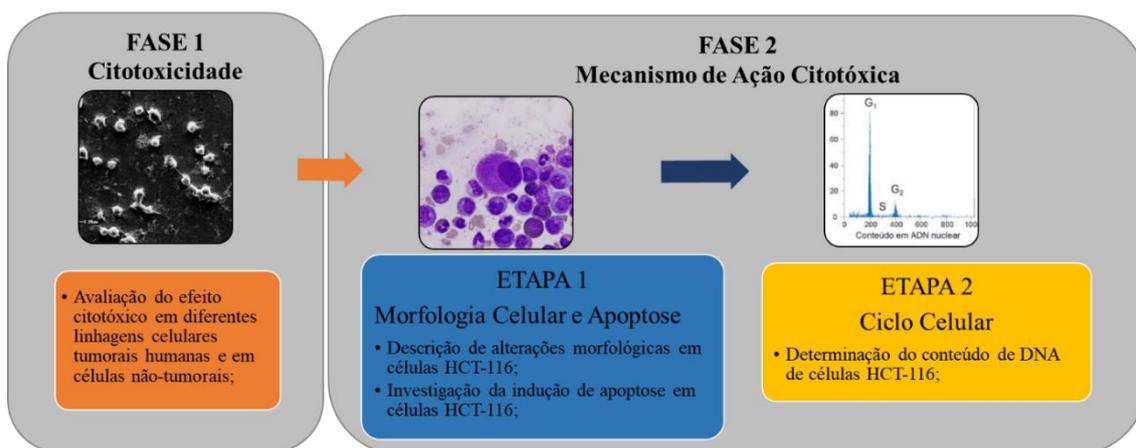


FIGURA 11. Representação esquemática do desenho experimental utilizado nesta pesquisa.

Na primeira fase, buscou-se responder as seguintes perguntas sobre o composto-teste:

- Qual o efeito citotóxico em linhagens celulares tumorais humanas de diferentes origens?
- Qual o efeito citotóxico em células não-tumorais?
- O efeito citotóxico antitumoral é tempo dependente?

Na segunda fase, buscou-se estudar o efeito citotóxico do composto-teste em células de câncer colorretal humano HCT-116 por ter apresentado elevada sensibilidade ao tratamento experimental realizado inicialmente. Para tanto, células HCT-116 ($0,7 \times 10^4$ células/poço) foram tratadas por 24 h com o composto-teste em 3 diferentes concentrações (2,5; 5,0 e 10 μ M) definidas com base nos valores de CI_{50} obtidos pelo Ensaio do MTT. Assim, a fase 2 consistiu em duas etapas: Morfologia celular e apoptose; e Ciclo celular. Nas etapas 1 e 2, buscou-se responder as seguintes perguntas, respectivamente:

- Qual o padrão de morte celular induzido pelo composto-teste?

- O composto-teste promove parada do ciclo-celular?

Doxorrubicina (2 μM ; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) e/ou menadiona (20 μM ; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) foram utilizadas como controle positivo devido aos seus conhecidos efeitos citotóxicos relacionados à indução de apoptose e/ou parada do ciclo celular na fase G2/M. As soluções dos compostos testados foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em meio de cultura para obter as concentrações desejadas. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi mantido constante e abaixo de 0,5%.

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) com o apoio científico dos seguintes pesquisadores: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa e Prof. Dr. Odorico de Moraes Filho.

b) Obtenção do composto-teste

O composto-teste, a chalcona N- {4'-[(E)-3-(3-nitrofenil)-1-(fenil)prop-2-en-1-ona]}acetamida identificada pelo código Chalc6a (Figura 12), foi produzido por síntese química pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Paulo N. Bandeira do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, Ceará, Brasil (BANDEIRA et al., 2019).

Para os testes *in vitro*, Chalc6a foi dissolvido em DMSO na concentração estoque de 1 mM. O estoque foi mantido sob refrigeração (-20 °C) até o momento do uso respeitando um máximo de 10 ciclos de congelamento e descongelamento.

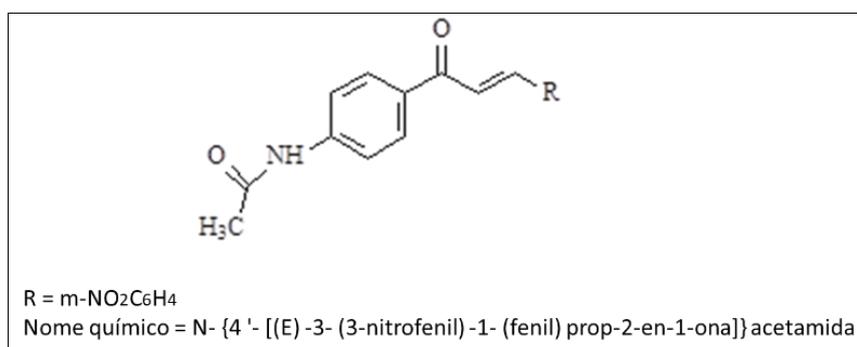


FIGURA 12. Fórmula estrutural plana de Chalc6a. Obtido com *ChemSketch*.

c) Linhagens celulares

As linhagens celulares de câncer humano (HCT-116, carcinoma de cólon; PC-3, adenocarcinoma de próstata; HL-60, leucemia promielocítica; K-562, leucemia mieloide crônica; e KASUMI-1, leucemia mieloide aguda) usadas neste estudo foram, gentilmente, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (INCA – EUA). A linhagem de fibroblasto murino L-929 foi, também, utilizada neste estudo como modelo celular não tumoral, para avaliação do índice de seletividade do composto, sendo adquirida por compra do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil.

As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino fetal (Gibco) e 1% penicilina/estreptomicina (Invitrogen) (para uma concentração final de 100U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina), e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Para a linhagem L-929 foi utilizado o meio DMEM em condição igual a descrita anteriormente e para linhagem Kasumi-1 foi utilizado meio RPMI com 20% de soro fetal bovino.

d) Ensaio do MTT

A citotoxicidade do composto-teste foi determinada pelo Ensaio do MTT (Mosmann, 1983) usando células HCT-116, PC-3, HL-60, K-562, Kasumi-1 e L-929 após 72h de incubação. Em células HCT-116, a citotoxicidade, também, foi determinada após 24 e 48 h por apresentarem elevada sensibilidade ao tratamento após 72 h de incubação com o composto-teste.

O Ensaio do MTT é um teste colorimétrico que permite a quantificação indireta de células metabolicamente viáveis baseado na conversão enzimática do sal de MTT, um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura.

Neste ensaio, as células foram plaqueadas 7×10^4 células/poço para HCT-116, 1×10^5 para PC3 e L-929 e 3×10^6 para HL-60, K-562 e Kasumi-1 (células/poço para células suspensas) em placas de 96 poços e o composto-teste (0,02 - 10 µM) dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) foi adicionado usando o sistema *high-throughput screening* Biomek 3000 (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA). Três horas antes do término do tempo de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min; Centrifuge 5810R, Eppendorf) e o sobrenadante descartado. Em seguida, cada poço recebeu 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em

meio de cultura; Sigma Aldrich) e a placa foi reincubada em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂ para completar o tempo total do teste. As placas foram, então, centrifugadas (3000 rpm/10min) e o sobrenadante desprezado. O precipitado de formazan (sal reduzido) obtido foi dissolvido em 150µL de DMSO e quantificado em espectrofotômetro (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA) por medida da absorbância no comprimento de onda de 595 nm.

As absorbâncias obtidas a partir de 3 experimentos independentes realizados em triplicata foram utilizadas para calcular a concentração capaz de inibir/reduzir a viabilidade celular em 50 % (CI₅₀) pelo programa *GraphPad Prism* versão 6.0. O quimioterápico anticâncer doxorrubicina (0.07–8.6 µM; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em DMSO e utilizado como controle positivo do ensaio. Todos os dados foram normalizados, transformados em log, considerado o percentual de morte celular e criada curva de resposta por regressão não linear.

e) Morfologia celular

As características morfológicas das células HCT116 foram avaliadas usando microscopia óptica (Olympus, Tóquio, Japão). Para tanto, as células foram transferidas para lâminas *Cytospin*. Em seguida, as células foram fixadas com metanol, coradas usando kit Panóptico Rápido (Laborlin, Brasil) e contracoradas com 0,1% de xantrose tiazinas a 0,1% antes da análise.

f) Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma ferramenta estratégica de pesquisa para a análise e quantificação acurada de eventos celulares morfológicos e bioquímicos baseado, principalmente, em mecanismos de fluorescência (ADAN *et al.*, 2016). Esta ferramenta foi utilizada, como descrito abaixo, para avaliar as seguintes características de acordo com Moura (2015): densidade celular, integridade de membrana, externalização da fosfatidilserina, despolarização mitocondrial e conteúdo de DNA. Para tanto, foram considerados 10.000 eventos para a análise e o citômetro utilizado foi o da marca *EasyCyte/Guava Technologies*. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) de três experimentos independentes realizados em triplicata e

calculados pelo programa *GraphPad Prism* versão 5.0. Para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

i. Integridade da membrana e densidade celular

O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídio de penetrar nas células cuja membrana esteja com integridade alterada e, após a ligação ao DNA, emitir alta fluorescência quando é excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência que, em conjunto com os dados anteriores, permitem quantificar a integridade de membrana e a densidade celular. Neste ensaio, as células tumorais não-tratadas e tratadas com a composto-teste foram recolhidas (250 μ L) e misturadas com 25 μ L do iodeto de propídio (2 μ g/mL em PBS) por 10 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo.

ii. Externalização da fosfatidilserina

A apoptose foi examinada por coloração com anexina V/7-AAD seguido de citometria de fluxo. Ao entrar em apoptose, a externalização do fosfolípido de membrana fosfatidilserina é um dos primeiros eventos celulares a ocorrer. Este ensaio permite diferenciar células apoptóticas das necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. A detecção das células apoptóticas é feita pela ligação da anexina V conjugada a fico eritrina (PE), que emite fluorescência amarela, com a fosfatidilserina externalizada. Células necróticas ou em apoptose tardia são coradas com o 7-AAD (emitem fluorescência de cor vermelha) que penetra as membranas celulares desintegradas e aderem ao núcleo. Células positivas para os dois corantes devem ser consideradas como necróticas (VERMES et al., 1995). Anexina V é uma proteína ligada a um fosfolípido que tem alta afinidade por FS. 7AAD é um corante hidrofílico impermeável em células intactas, e é utilizado como indicador da integridade da membrana celular. A fluorescência da anexina V conjugada com a fico eritrina será mensurada por fluorescência amarela a 583nm e o 7AAD na fluorescência vermelha a 680nm. A percentagem de células viáveis e de células apoptóticas inicial e tardia foi calculada.

Neste ensaio, as células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com PBS e ressuspendidas em 50 μ L de PBS. Em seguida, 50 μ L do reagente principal (mistura de corantes fluorescentes: anexina V e 7-AAD) foram adicionados e as células foram, gentilmente, agitadas e incubadas por 20 min em temperatura ambiente (20–25 °C) no escuro antes da leitura pelo equipamento. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo. Foram criados gates específicos para cada situação em que a célula pudesse estar e verificado o percentual de células em cada um. Posteriormente esses percentuais foram tratados no GraphPad Prism para avaliação de significância estatística.

iii. Despolarização mitocondrial

O teste baseia-se na capacidade da mitocôndria de sequestrar a rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, quando esta apresenta potencial transmembrânico normal. Dessa forma, células contendo rodamina emitem alta fluorescência quando atingidas pelo laser. No entanto, ao entrar em apoptose por via intrínseca, a célula sofre um influxo de íons H⁺ através da membrana mitocondrial interna, induzindo uma alteração de seu potencial transmembrânico. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina 123, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparada com as células que possuem mitocôndrias normais. Assim, é possível diferenciar populações de células com potencial transmembrânico mitocondrial normal daquelas com potencial alterado usando a citometria de fluxo. É importante ainda destacar que essa alteração de potencial não é exclusividade de apoptose.

Para tanto, as células não tratadas e tratadas com o composto-teste foram recolhidas (250 μ L) e lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 250 μ L de solução contendo rodamina 123 (1 μ g/mL) e mantidas em eppendorfs abertos, dentro de incubadora de CO₂ a 5% por 15 min, sendo homogeneizado a cada 5 minutos. Após esta incubação no escuro, a suspensão de células foi centrifugada (2000 rpm/5min) e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspendido em 250 μ L de PBS e a amostra lida em citômetro de fluxo após 30 min.

iv. Conteúdo de DNA

O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídio (IP) de ligar-se ao DNA celular permitindo sua determinação e qualificação em DNA fragmentado, G0/G1, S ou G2/M. Inicialmente, a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o IP possa se ligar ao núcleo.

Assim, células tumorais não tratadas e tratadas com o composto-teste foram recolhidas (250 μ L) e misturadas com 2,5 μ L de solução de lise (0,1% de citrato de sódio e 0,1 % de Triton X-100) e ,25 μ L de solução de iodeto de propídio (2 μ g/mL em PBS e 5 μ g.mL⁻¹ RNase). Após incubação de 40 min no escuro e a temperatura ambiente, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Os dados obtidos do citômetro foram analisados com auxílio do software ModFit LT para obtenção de percentual de células em cada fase do ciclo celular. Posteriormente, esses valores foram transferidos para o software GraphPad para avaliação de significância estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

a) Citotoxicidade

A avaliação inicial da atividade citotóxica do composto-teste Chalc6a foi realizada por meio do Ensaio do MTT em diferentes linhagens celulares tumorais humanas (HCT-116, carcinoma de colorretal; PC-3, adenocarcinoma prostático; HL-60, leucemia promielocítica aguda; K-562, leucemia mieloide crônica e Kasumi-1, leucemia mieloblástica aguda) e células não tumorais (L-929, fibroblasto murinho) após 72h de incubação. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2 e revelam que os valores de CI₅₀ de Chalc6a em células tumorais variaram de 5,65 a 10,52. Em células L-929, o composto 6a não apresentou efeito citotóxico (CI₅₀ > 20 μ M) nas concentrações testadas, que pode ocorrer por características específicas das células tumorais que devem estar sendo afetadas pelo composto-teste nas concentrações testadas, mas não sendo possível ter certeza de tal efeito. De fato, as células neoplásicas apresentam características biológicas marcantes como manutenção de sinalização proliferativa, evasão de supressores de proliferação e resistência à morte celular (Hanahan e Weinberg 2011). Nesse contexto, Karthikeyan *et al.* (2015) relataram que a atividade citotóxica de chalconas apresenta múltiplos mecanismos incluindo bloqueio do ciclo celular

(envolvendo inibição de cinases reguladoras), inibição da polimerização da tubulina, indução da apoptose e bloqueio da via de sinalização de NF- κ B.

Tabela 2. Citotoxicidade de Chalcona 6a (Chalc6a) em diferentes concentrações (0,02 – 20 μ M) em diferentes linhagens celulares tumorais humanas e células não tumorais após 72h de incubação usando o Ensaio do MTT.

Composto	Linhagem celular					
	HCT-116	PC-3	HL-60	K-562	KASUMI-1	L-929
	CI ₅₀ \pm E.P.M (μ M)					
Chalc6a	3,56 \pm 0,03	9,33 \pm 0,05	5,65 \pm 0,41	7,49 \pm 1,35	10,52 \pm 0,10	> 20
Dox	0,11 \pm 0,03	0,44 \pm 0,10	0,02 \pm 0,002	0,46 \pm 0,01	0,13 \pm 0,007	0,66 \pm 0,17

Dados são apresentados como concentração capaz de inibir/reduzir a viabilidade celular em 50 % (CI₅₀ em μ M) \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.) linhagens celulares tumorais humanas (HCT-116, carcinoma de colorretal; PC-3, adenocarcinoma prostático; HL-60, leucemia promielocítica aguda; K-562, leucemia mielógena crônica e Kasumi-1, leucemia mieloblástica aguda) e células não tumorais (L-929, fibroblasto murino) obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Considerando a elevada sensibilidade de células HCT-116 ao tratamento com Chalc6a após 72h de incubação, decidiu-se prosseguir com o estudo do composto-teste usando essa linhagem tumoral humana de câncer colorretal, na presente investigação. Sendo assim, o próximo passo consistiu em determinar a CI₅₀ de Chalc6a em células HCT-116 após 24 e 48h de incubação com o intuito de avaliar se o efeito citotóxico do composto-teste teria perfil tempo-dependente. Os resultados revelam valores de CI₅₀ de 9,81 \pm 0,49 e 5,67 \pm 0,32 μ M em 24 e 48 h de incubação, respectivamente. Esses dados, em combinação com a CI₅₀ de 72 h, sugerem que a citotoxicidade de Chalc6a tem relação direta com o tempo de exposição, o que é razoável conjecturar para compostos que, provavelmente, tenham potencial de bloquear o ciclo celular.

Sendo assim, todas as análises posteriores (morfologia celular, padrão de morte celular e conteúdo de DNA) foram realizadas após 24 h de incubação, buscando avaliar o início do efeito citotóxico, com o composto-teste em 3 diferentes concentrações (2,5; 5 e 10 μ M), a fim de avaliar se o efeito citotóxico tem perfil concentração dependente.

b) Morfologia celular e apoptose

A morfologia de células HCT-116 após 24 h de incubação com Chalc6a foi analisada por microscopia ótica e está apresentada na figura 13. A necessidade e a importância desse tipo de análise são ressaltadas por Chernobrovkin e Zubarev (2016) e, também, por Xu e colaboradores (2015) por se tratar de um excelente ponto de partida na elucidação de possíveis mecanismos de ação e indução de morte celular por drogas experimentais. No teste realizado, Chalc6a foi capaz de induzir alterações morfológicas, em células HCT-116, características de apoptose (fragmentação, condensação da cromatina, corpos apoptóticos e encolhimento celular) e mais evidentes nas concentrações de 5 e 10 μM (Figura 13 D e E) (KROEMER e POUYSSEGUR, 2008). Padrão similar de indução de apoptose foi observado no tratamento com os controles positivos doxorrubicina (2 μM) e menadiona (20 μM) (Figura 13 B e F).

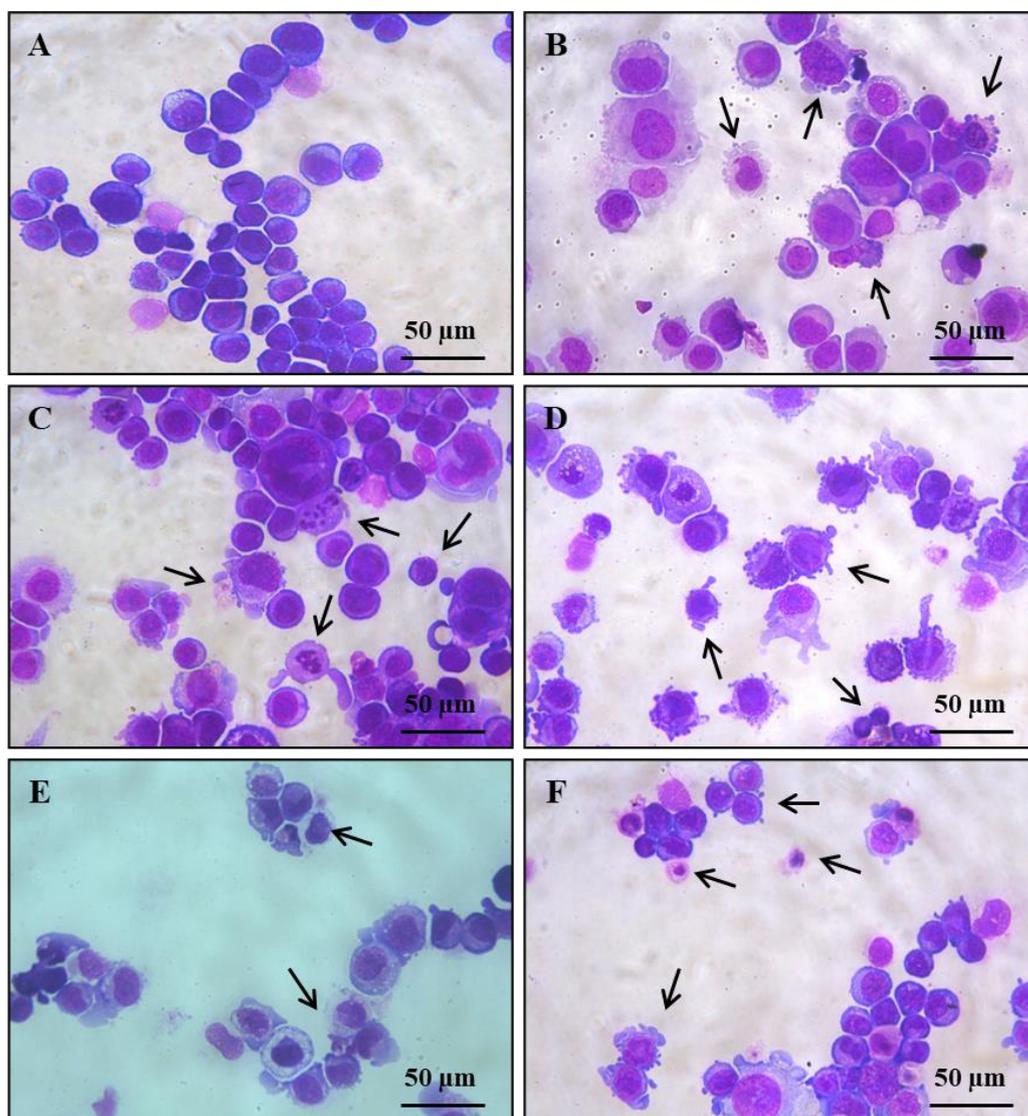


FIGURA 13. Alterações morfológicas em células HCT-116. Células foram fixadas com metanol, coradas e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400x após 24h de incubação com veículo (A), doxorrubicina 2 μ M (B), Chalc6a 2.5 μ M (C), 5 μ M (D), 10 μ M (E) e menadiona 20 μ M (F). Setas mostram células com características celulares que se associam a apoptose (fragmentação nuclear, condensação de cromatina, corpos apoptóticos e diminuição celular).

A hipótese de indução de apoptose por Chalc6a levantada a partir da análise morfológica de células HCT-116 foi confirmada pela externalização da fosfatidilserina acompanhada de manutenção da integridade da membrana celular e redução do número de células determinadas por citometria de fluxo (Figuras 14 e 15). Na concentração de 10 μ M, por exemplo, Chalc6a induziu significativo aumento de células apoptóticas ($9,60 \pm 1,68\%$) quando comparado com o controle negativo ($1,55 \pm 0,18\%$). Nesta concentração, também, observamos $90,29 \pm 0,62\%$ de integridade de membrana (nenhuma diferença quando comparada com o valor do controle negativo de $95,10 \pm 0,55\%$) e $4,21 \pm 0,19 \times 10^5$ células/mL (estatisticamente significativa quando comparado ao controle negativo, $7,34 \pm 0,35 \times 10^5$ células/mL) de densidade celular após 24 h de incubação.

Corroborando com esses resultados, diversos trabalhos tem mostrado uma forte relação entre o efeito citotóxico de chalconas e a indução de apoptose (Zhao *et al.*, 2017, Mielcke *et al.*, 2017 e Zhang *et al.*, 2017). Das e Manna (2016) destacaram a participação da apoptose na atividade antitumoral de chalconas por meio da ativação de caspases, superexpressão de bax, bak e bid, reduzida expressão de bcl-2, bcl-xl e superexpressão de p53. No estudo realizado por James e colaboradores (2017), a chalcona cardamonina foi capaz de induzir apoptose em tecido tumoral de câncer colorretal após análise de cortes histológicos. Os autores ressaltaram que dois fatores foram importantes para esse processo: alteração da expressão de MicroRNAs e inibição da via Wnt/ β -catenina, que é fundamental na biologia do câncer colorretal.

Em se tratando, especificamente, de células de câncer de cólon humano, a indução de apoptose por chalconas pode estar relacionada com parada do ciclo celular na fase G2/M, envolvendo o comprometimento do aparato microtubular mitótico e/ou dano ao DNA. O aparato microtubular mitótico é essencial para o processo de divisão celular, sendo seu comprometimento um importante sinal para deflagrar o processo de morte por apoptose (DI CESARE *et al.* 2017).

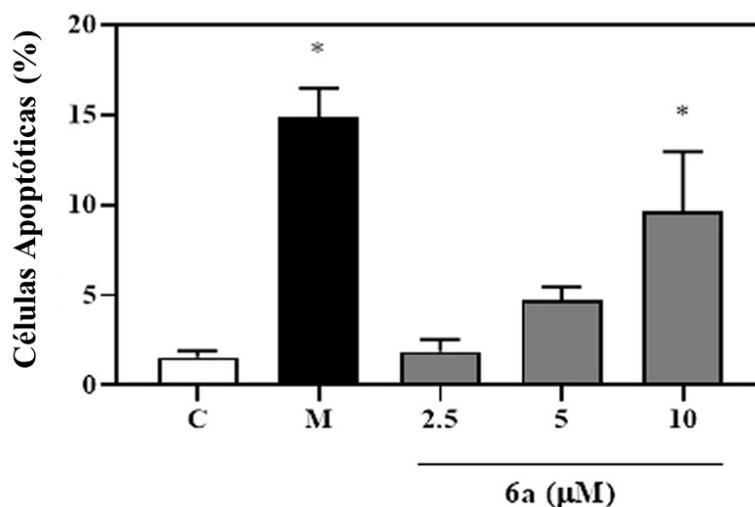


FIGURA 14. Teste de externalização de fosfatidilserina em células HCT-116 após tratamento com Chalc6a (nas concentrações de 2.5, 5.0 e 10.0mM) e menadiona (concentração 20μM) por 24h avaliadas através de citometria de fluxo. Resultados mostrados com * possuem significância estatística ($p < 0,05$).

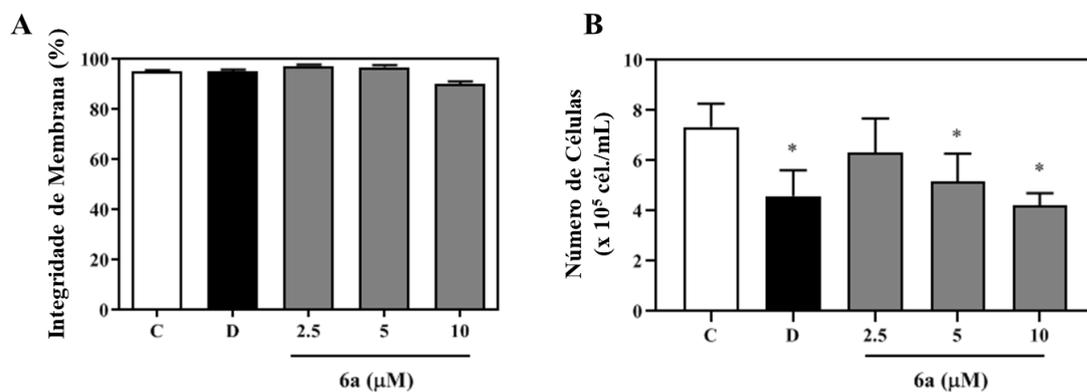


FIGURA 15. A-Percentual de células viáveis após tratamento por 24h com Chalc6a avaliadas através de citometria de fluxo. B- Número de células totais após tratamento por 24 horas com Chalc6a avaliadas através de citometria de fluxo. Resultados mostrados com * possuem significância estatística ($p < 0,05$).

Com o objetivo de reforçar a sugestão de indução de apoptose pelo tratamento das células com Chalc6a, bem como, verificar a via envolvida nesse processo de morte celular, buscou-se, então, realizar a avaliação da despolarização da membrana mitocondrial por citometria de fluxo. A figura 16 mostra o resultado do teste utilizando o corante Rodamina123 após 24 h de incubação. Os controles positivos testados, doxorrubicina e menadiona, promoveram aumento significativo do percentual de células

com membranas mitocondriais despolarizadas ($5.54 \pm 1.47\mu\text{M}$ e $4.767 \pm 0.05\mu\text{M}$, respectivamente). Todavia, esse efeito não ocorreu em células tratadas com Chalc6a nas concentrações testadas. Esse processo pode ser explicado devido a mecanismos apoptóticos que não envolvam (pelo menos inicialmente) estruturas mitocondriais.

Vale ressaltar, ainda, que vários autores já demonstraram que a morte celular promovida por chalconas pode envolver os mais diferentes mecanismos, tais como: modulação do p53 (Santos *et al.*, 2019), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zhang *et al.*, 2017), inibição da polimerização da tubulina (Wang *et al.*, 2018) ou, mesmo, inibição de MRP1 (Lindamulage *et al.*, 2017).

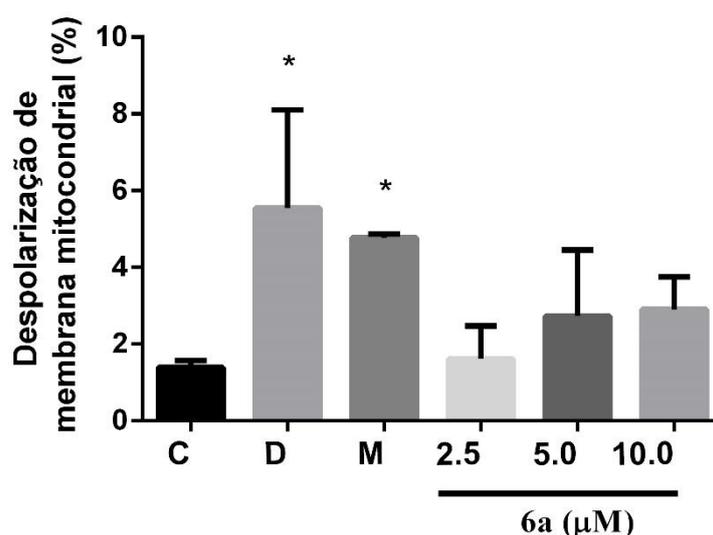


FIGURA 16. Percentual de membranas mitocondriais despolarizadas após tratamento com Chalc6a por 24h avaliadas através de citometria de fluxo. Resultados mostrados com * possuem significância estatística ($p < 0,05$).

c) Ciclo celular

Baseado em estudos prévios (SHEN *et al.*, 2007; DONG *et al.*, 2018; e ZHU *et al.*, 2019), é sabido que chalconas induzem parada no ciclo celular de células neoplásicas. Assim, esta etapa do estudo consistiu em determinar o conteúdo de DNA de células HCT-116 após 24h de incubação com Chalc6a através de citometria de fluxo (Figura 17). Similar ao efeito do controle positivo doxorrubicina ($2\mu\text{M}$: % G2/M = $79,78 \pm 1,35\%$), Chalc6a induziu parada significativa de células HCT-116 em G2/M ($59,87 \pm 5,15\%$) quando comparado com o controle negativo (tratado apenas com veículo; % G2/M =

36,70 ± 2,47%). O resultado sugere que Chalc6a pode estar interferindo com o processo de divisão celular detectável pelos pontos de verificação do ciclo celular (Das eManna, 2016). Conseqüentemente, os mecanismos apoptóticos de morte celular podem estar sendo ativados, como observado nos resultados apresentados acima (dados morfológicos e de citometria de fluxo).

Vale a pena mencionar que Chalc6a não foi capaz de induzir fragmentação do DNA nas concentrações testadas e no tempo de incubação utilizado (dados não mostrados). Assim, sugere-se que a fragmentação do DNA não está diretamente envolvida com a parada do ciclo celular induzida por Chalc6a em células HCT-116, pelo menos, não como evento deflagrador. Essa evidência reforça a hipótese de interferência no aparato mitótico microtubular que precisa ser investigado. De fato, Martel-Frchet et al. (2015) identificaram um novo derivado de chalcona capaz de induzir parada em prometáfase e apoptose subsequente em células cancerígenas da bexiga atuando como inibidor de microtúbulos. Assim, é importante observar que testes adicionais são necessários para avaliar o mecanismo de ação específico envolvido na citotoxicidade seletiva da Chalc6a em células HCT-116.

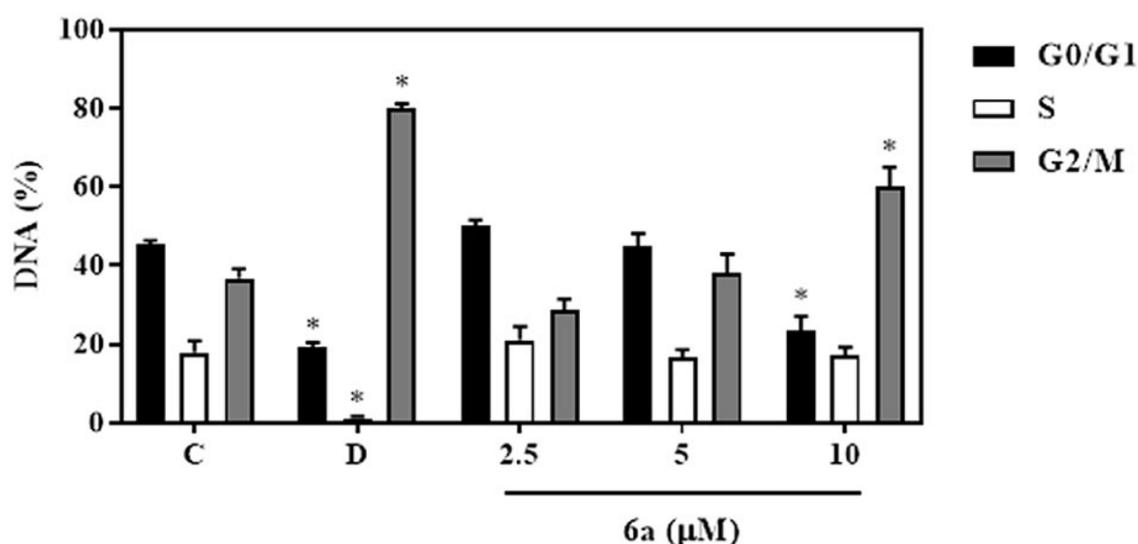


FIGURA 17. Ciclo celular de HCT-116 após tratamento com Chalc6a por 24h avaliadas através de citometria de fluxo. Resultados mostrados com * possuem significância estatística ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO GERAL

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Vários fatores da vida moderna contribuem para que haja um aumento no número de casos, tais como aumento da longevidade e mudança em hábitos alimentares. Os gastos com esse problema de saúde só aumentam a cada ano e ainda continuamos sem tratamento curativo, exceto determinados tipos de câncer. Quimioterapia convencional e radioterapia são tratamentos que oferecem tratamento parcial, mas com muitos efeitos adversos e a cirurgia, que poderia trazer a cura, somente se aplica a poucos casos (PATHAK *et al.*, 2018).

O câncer é determinado por desordens multigenéticas que iniciam mutações, promovendo alteração de vias de sinalizações proteínas, resultando em descontrole da proliferação celular, divisão celular entre outros (VAN DER ZANDEN *et al.*, 2020). Nesse contexto há a produção de diversas proteínas que estarão ou presentes ou alteradas em sua expressão. Essa característica pode ser utilizada como forma de terapia direcionada contra o câncer, buscando essas características específicas para melhor identificar essas células (ZHANG *et al.*, 2019).

O processo de transição entre um tratamento quimioterápico puramente citotóxico para uma abordagem com direcionamento molecular para o câncer vem mudando o paradigma na área e resultando em melhora de número de casos com tratamento bem-sucedido ao longo dos últimos anos. Por exemplo: o uso de moléculas antiestrogênicas e antiandrogênicas para tratamento de câncer de mama e próstata, respectivamente (BROUGH *et al.*, 2011). Outro exemplo bem-sucedido é o uso do imatinib que tem ação inibidora de ABL para tratamento de leucemia mieloide crônica, pois possui translocação no gene BCR-ABL (CHAN *et al.*, 2011).

O uso de moléculas com ações inibidoras múltiplas ou seletivas pode ser ferramenta chave no processo de tratamento do câncer com pequenas moléculas (BEDARD *et al.*, 2020). As chalconas são conhecidas por suas múltiplas ações. Entre elas podem ser destacadas as atividades contra câncer podendo ocorrer por indução da apoptose, dano ao DNA, inibição de tubulina, dano a mitocôndrias, inibição de quinases entre outros (DAS e MANNA, 2016). É também conhecida a atividade inibitória para canais de resistência a múltiplas drogas (MDR – *multiple drug resistance*), inibição hormonal, inibição de histona desacetilases (HDACs – *histone deacetylases*), inibição de

degradação de p53, inibição de angiogênese, inibição de vias da JAK (*Janus Kinase*) e inibição de CDKs (MAHAPATRA *et al.*, 2015).

No presente estudo foi avaliada a ação de uma nova chalcona sintética denominada Chalc6a, ou somente, C6a. Para tanto, no primeiro momento, foi avaliada sua citotoxicidade seletiva contra diversas linhagens tumorais, como de câncer de colón e reto, câncer de próstata e alguns tipos de leucemias, e contra linhagem não tumoral para que houvesse avaliação de sua seletividade. Ao se analisar sua seletividade, inclusive perante outras chalconas similares, verificou-se a maior atividade em células de câncer colorretal do tipo HCT-116. Uma característica importante dessas células é a expressão de antígeno carcinoembrionário, responsável pelo processo de adesão celular no estágio de desenvolvimento fetal e que possui quantidade elevadas em pacientes que possuem câncer colorretal. Além de também ser um indicador de possíveis metástases.

Em seguida, foram realizados testes para avaliação da ação tempo-concentração dependente do composto na linhagem que obteve a maior ação. Foi verificado após os testes em diversos tempos, 24, 48 e 72h que o composto agia de forma tempo e concentração dependente, tal como ocorreu no trabalho publicado por Silva e colaboradores (2016), Mori e colaboradores (2017) e Zhao e colaboradores (2017). Isso sugere que a ação da classe das chalconas pode ser tempo e concentração dependente pois, mesmo em linhagens e tipos diferentes de câncer, essa classe de compostos agiu de forma semelhante.

A avaliação de alterações morfológicas promovidas pela C6a em células após o tratamento por 24h e analisadas por microscopia óptica com coloração panótica mostraram um padrão de morte com características morfológicas semelhante ao observado por apoptose. Essas características se assemelham aos padrões descritos por Galluzzi e colaboradores (2018) e que poderiam apontar, pelo menos inicialmente, alguma participação mitocondrial nesse padrão de morte.

Para melhor entendimento de qual seriam as características fenotípicas e moleculares das ações promovidas pela C6a nas células da linhagem HCT-116 foram então realizados testes de citometria de fluxo. A primeira avaliação foi a verificação da integridade de membrana onde observou-se que a C6a não promoveu perda da integridade da membrana das células tratadas em nenhuma das concentrações testadas aqui. Entretanto, observou-se que as células tratadas tiveram redução no seu número total de forma concentração dependente, em que somente a menor concentração testada, 2.5µM, não promoveu diminuição no número de células. Efeitos citostáticos de chalconas

também já foram observados em trabalhos de Champelovier e colaboradores (2011) utilizando linhagem de glioblastoma (LN229) e também no trabalho de Lima e colaboradores (2016) em linhagens de câncer de mama (OVCAR-8), câncer de sistema nervoso central (SF-295) e também câncer colorretal (HCT-116). É importante ainda ressaltar que em ambos os trabalhos também foram encontradas as mesmas características de morte celular obtidas nesse estudo: parada em G2/M e ação citostática.

A avaliação do ciclo celular após tratamento com a C6a em linhagem de HCT-116 revelou um padrão de parada de ciclo celular na fase G2/M, com diferença significativa apenas na maior concentração testada. A promoção da parada do ciclo celular na fase G2/M por moléculas da classe das chalconas já é bem descrita na literatura e diversas publicações relatam isso, tais como nos trabalhos de Hseu e colaboradores (2012), Wu e colaboradores (2013), Jandial e colaboradores (2017) e Takac e colaboradores (2018).

Após a avaliação da despolarização da membrana mitocondrial com o tratamento de células HCT-116 por 24h com C6a observou-se que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado, independente da concentração utilizada. Essa ação pode demonstrar que os mecanismos de apoptose, observados por microscopia e no ensaio de anexina V, podem ocorrer de forma independente de despolarização mitocondrial. Tal tipo de ação também foi encontrado nos trabalhos de Ruis-Ruis e Lopez-Rivas (2002), Xu e colaboradores (2013) e Arciuch e colaboradores (2012). Todavia, de todos os trabalhos envolvendo chalconas encontrados para a discussão desse trabalho, esse seria o único que teria essa característica. Alguns exemplos de trabalhos que envolvem apoptose com participação mitocondrial após o tratamento com chalconas são os de Zhang e colaboradores (2017), Zhu e colaboradores (2019) e Ramirez-Tagle e colaboradores (2016).

Como explanado anteriormente, o uso de chalconas se torna importante por ter fácil manipulação/síntese química e por agir em diversos alvos moleculares, tais como: MDM2/p53, tubulina, proteossoma, NF-kappa B, TRIAL/receptores de morte e vias apoptóticas mediadas por mitocôndria, ciclo celular, STAT3, PPAR- γ e β -catenin/Wnt (JANDIAL *et al.*, 2014). Essa possibilidade de efeitos diferentes de chalconas é notada ao verificar que compostos dessa família podem promover aprisionamento do ciclo celular em G1 (MIELCKE *et al.*, 2017) ou em G2/M (KELLO *et al.*, 2016), sendo esse último também verificado no presente trabalho. Essas características mostram a possibilidade da chalcona aqui testada continuar em mais experimentos para avaliação de

seus efeitos em modelos *in vivo*, como em trabalho realizado por Maeda & Khatami, 2018).

Por fim, as próximas etapas para continuação do presente trabalho serão para confirmação da hipótese aqui levantada, onde serão realizados teste de avaliação de inibição de CDKs através de kits e, também, avaliação de expressão de ciclinas do ciclo celular através da metodologia de western blot. Após esses passos, poderão ser feitos os testes toxicológicos *in vivo* para avaliação da ação da Chalc6a.

CONCLUSÕES GERAIS

A chalcona N-(4'-[(E)-3-(3-nitrofenil)-1-(fenil)prop-2-en-1-ona]) acetamida (Chalc6a) apresentou forte e seletivo efeito citotóxico em linhagens celulares tumorais humanas, sendo capaz de induzir em células de câncer colorretal HCT-116 morte celular por apoptose independente de despolarização mitocondrial e relacionada com parada do ciclo celular em G2/M. A figura 15 mostra o possível mecanismo de ação do composto testado com indicação de pontos a serem futuramente investigados para melhor elucidação.

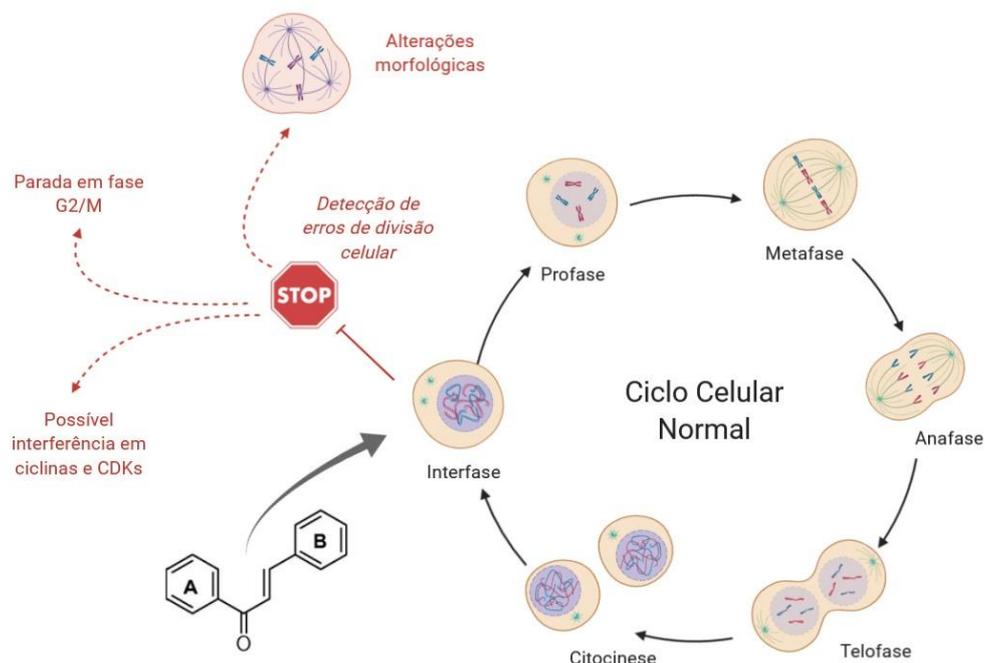


FIGURA 18. Possível mecanismo de ação da Chalc6a em células HCT116.



Synthesis, structural characterization, and cytotoxic evaluation of chalcone derivatives

Paulo N. Bandeira¹ · Telma L. G. Lemos² · Hécio S. Santos^{1,3} · Mylena C. S. de Carvalho⁴ · Daniel P. Pinheiro⁴ · Manoel O. de Moraes Filho⁴ · Cláudia Pessoa^{4,5} · Francisco W. A. Barros-Nepomuceno⁶ · Tigressa H. S. Rodrigues¹ · Paulo R. V. Ribeiro⁷ · Herbert S. Magalhães² · Alexandre M. R. Teixeira³

Received: 16 March 2019 / Accepted: 28 August 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Chalcones containing amino or acetamide groups on ring A and electron donating/withdrawing groups on ring B have been shown to have great cytotoxic potential against human cancer cell lines. In this work, a series of twenty chalcones, including nine 1-(4'-aminophenyl)-3-(substituted aryl)-2-propen-1-ones (**1–9**), nine 1-(4'-acetamidophenyl)-3-(substituted aryl)-2-propen-1-ones (**1a–9a**), and two 1-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-3-(substituted aryl)-2-propen-1-ones (**10, 11**), were synthesized and submitted for initial biological screening using HCT-116 cells. Among the evaluated compounds, chalcone **6a** showed strong and selective activity against HCT-116 cells ($IC_{50} = 2.37 \pm 0.73 \mu\text{M}$). The preliminary structure–activity relationship analysis indicated that the cytotoxic effect of these compounds might be attributed to the combined effect of two electron withdrawing groups: the nitro group (NO_2) at the *meta*-position of ring B and the acetyl group at the *para*-position of ring A. Moreover, chalcone **6a** was able to induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis at a concentration of $10 \mu\text{M}$ after 24 h of incubation. These data reinforce that compound **6a** could be a promising lead compound for the future exploration of selective anti-colon carcinoma cancer agents.

Keywords Synthesis · NMR · Infrared · Chalcone · 4'-acetamidochalcones · Cytotoxic activity

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00044-019-02434-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alexandre M. R. Teixeira
amrteixeira@gmail.com

- ¹ Curso de Química, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil
- ² Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
- ³ Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil
- ⁴ Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
- ⁵ Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-CE, Eusebio, CE, Brazil
- ⁶ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Acarape, CE, Brazil
- ⁷ Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brazil

Introduction

Chalcones are open chain flavonoids that are characterized by two aromatic rings joined by a three-carbon α , β -unsaturated carbonyl system (Fig. 1). These compounds can be isolated from natural sources due to their widespread distribution in fruits, vegetables, and tea or they can be synthesized by chemical processes (Abbas et al. 2014; Di Carlo et al. 1999).

Over the last several years, chalcones have instigated the interest of chemical and pharmacological researchers due to their simple chemical structure and varied biological activities. The chalcone biological activity spectrum includes antinociceptive, anti-inflammatory (Padaratz et al. 2009; Corrêa et al. 2001; De Campos-Buzzi et al. 2007; Nowakowska 2007; de Campos-Buzzi et al. 2006), anti-tumor (Zingales and Moore 2016; Cabrera et al. 2007), antibacterial, antifungal (Karaman et al. 2010), antileishmanial (Boeck et al. 2006), and antioxidant activity (Prasad et al. 2013). This wide range of activity is mainly due to the numerous substitution possibilities on the chalcone aromatic rings. Moreover, the synthesis of chalcones

based on the Claisen–Schmidt condensation reaction allows a vast number of compounds to be obtained, providing the desired structural variety (Ducki et al. 1998).

There is a continuous scientific effort that has been expended on the design and development of anticancer chalcones that has resulted in many novels and chemically diverse chalcones with therapeutic potential against different types of cancer (Karthikeyan et al. 2015). In this context, chalcones are able to induce cell cycle arrest and apoptosis in various human cancer cell lines. These abilities can be attributed, in part, by tubulin polymerization inhibition and/or the capacity to bind at the DNA minor groove of neoplastic cells. The antimetastatic potential and antiangiogenic actions are related to flavokawain B, a chalcone isolated from the root extracts of kava-kava plants (Lindamulage et al. 2017; Hassan et al. 2017; Shankaraiah et al. 2017; Rossette et al. 2017).

Recent studies have shown the cytotoxic anticancer potential of chalcones that contain an amino or acetamide group on ring A (Santos et al. 2017; Jardim et al. 2015; Tristão et al. 2012.). Chalcones with hydroxyl, methoxy, and halogen groups on the B ring have also presented effective cytotoxic potential against human cancer cell lines (Karthikeyan et al. 2015). Based on this information, chalcones containing amino or acetamide groups on ring A and electron donating/withdrawing groups on ring B were synthesized, and their cytotoxicity was evaluated in the present work.

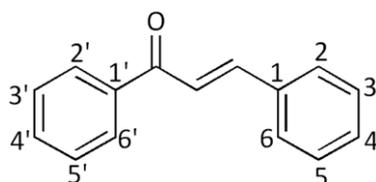


Fig. 1 Fundamental structure of a chalcone

This study describes the synthesis and characterization of twenty chalcones, including nine 4'-aminochalcones, nine 4'-acetamidechalcones, and two 3'-hydroxy-4'-methoxychalcones. Figure 2 shows the molecular structures of these twenty chalcones. Among these compounds, a new chalcone (**11**) is being reported for the first time. After the initial cytotoxic screening for all synthesized compounds, we explored the cytotoxic effect of chalcone **6a** against a panel of the tumor and nontumor cell lines. In addition, we evaluated the induction of apoptosis and cell cycle progression in HCT-116 cells incubated with chalcone **6a** for 24 h.

Materials and methods

Synthesis of the chalcones

The description of the procedure of the synthesis of the twenty chalcones are shown in Fig. 3. The 4'-aminochalcones (**1–9**) and 3'-methoxy-4'-hydroxy chalcones (**10, 11**) were synthesized by a Claisen–Schmidt condensation reaction in basic medium (Bhat et al. 2005). An ethanol solution of 4-aminoacetophenone (2 mmol) and 3-methoxy-4-hydroxyacetophenone (2 mmol) were added to a solution of benzaldehyde and the derivatives (2 mmol), followed by the addition of ten drops of 50% w/v aq. NaOH with stirring for 48 h. The solid that formed was filtered under reduced pressure, washed with cold water, and analyzed by TLC, giving yields of 25.65–69.85%. The 4'-acetamidechalcones (**1a–9a**) were prepared by the acetylation reaction of the 4'-aminochalcones (2 mmol) with acetic anhydride (2 mmol) in a buffered medium (5 mL) at pH = 5.0 with AcOH/AcONa (de Campos-Buzzi et al. 2007). The reaction mixture was refluxed for 1 h. The product was filtered under vacuum and washed with cold water, giving yields of 22.27–88.92%.

The structural data of the twenty chalcones which were synthesized in this work are given below.

Fig. 2 Molecular structures of the synthesized chalcones

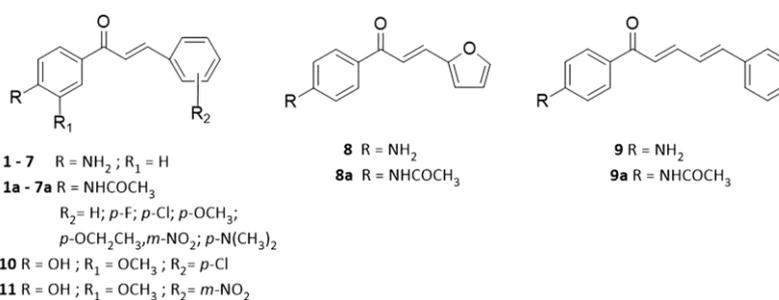
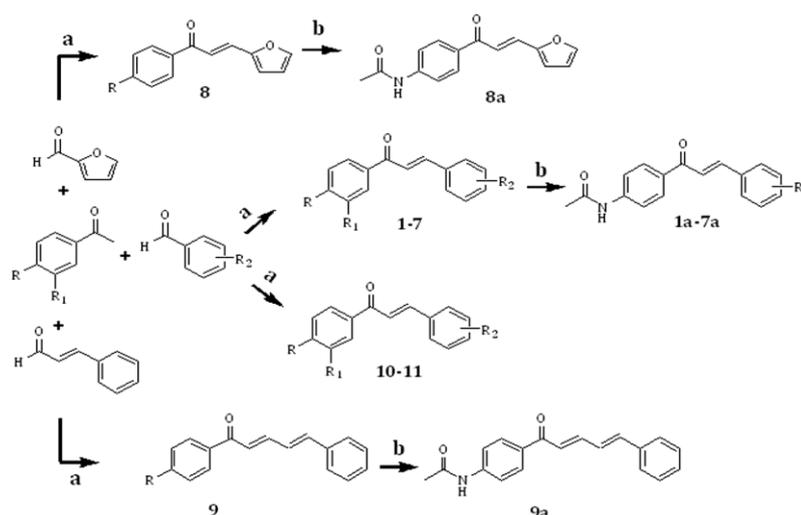


Fig. 3 Description of the procedure of the synthesis of the chalcones (**1–11**) and (**1a–9a**).

a NaOH_{aq}, 50% w/v, ethanol, r. t., 48 h. **b** (CH₃CO)₂, (AcOH /AcONa), r.t. *Novel chalcone



Chalcone	R	R ₁	R ₂	Chalcone	R ₂
1	NH ₂	H	H	1a	H
2	NH ₂	H	4-F	2a	4-F
3	NH ₂	H	4-OCH ₃	3a	4-OCH ₃
4	NH ₂	H	4-OCH ₂ CH ₃	4a	4-OCH ₂ CH ₃
5	NH ₂	H	4-Cl	5a	4-Cl
6	NH ₂	H	3-NO ₂	6a	3-NO ₂
7	NH ₂	H	4-N(CH ₃) ₂	7a	4-N(CH ₃) ₂
8	NH ₂	H		8a	
9	NH ₂	H		9a	
10	OH	OCH ₃	4-Cl		
11	OH	OCH ₃	3-NO ₂		

(2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(phenyl)-prop-2-en-1-one (1)

Yellow amorphous powder (25.65 %), m.p. 109.3–109.9 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3522, 3434, 1623, 1578, 1554 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.40–7.42 (3H, m, H-3, H-5, H-4), 7.93 (2H, d, J = 8.7 Hz H-2', H-6'), 6.73 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3', H-5'), 7.69–7.72 (4H, m, H-2/H-6, H- α , H- β). ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ = 136.8 (C, C-1), 129.6 (CH, C-2, C-6), 130.1 (CH, C-3, C-5), 131.4 (CH, C-4), 128.2 (C, C-1'), 132.6 (CH, C-2', C-6'), 115.1 (CH, C-3', C-5'), 154.8 (C, C-4'), 123.3 (CH, C- α), 144.4 (CH, C- β), 190.3 (C, COBz); EIMS m/z (M^{+} : 223), calcd for C₁₅H₁₃NO/223.

(2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(4-fluophenyl)-prop-2-en-1-one (2)

Yellow amorphous powder (28%), m.p. 161.5–162.5 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3600, 1660, 1590, 1570 cm⁻¹; ¹H-NMR

(CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.76 (2H, dd, J = 8.8, 2.1 Hz, H-2, H-6), 7.14 (2H, t, J = 8.8 Hz, H-3, H-5), 7.91 (2H, d, J = 6.93 Hz H-2', H-6'), 6.73 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', H-5'), 7.67 (1H, d, J = 12.1 Hz, H- α), 7.74 (1H, d, J = 14.2 Hz, H- β). ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ = 132.6 (C, C-1), 132.6 (CH, C-2, C-6), 116.1 (CH, C-3, C-5), 163.8 (C, C-4), 128.1 (C, C-1'), 131.8 (CH, C-2', C-6'), 114.9 (CH, C-3', C-5'), 155.0 (C, C-4'), 123.2 (CH, C- α), 142.9 (CH, C- β), 190.1 (C, COBz); EIMS m/z (M^{+} : 241), calcd for C₁₅H₁₂NOF/241.

(2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-prop-2-en-1-one (3)

Yellow amorphous powder (38%), m.p. 148–148.5 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 1628, 1570, 1560 1555, 1480, 1240 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.92 (2H, d, J = 8.61 Hz, H-2, H-6), 6.70 (2H, d, J = 8.58 Hz, H-3, H-5), 7.59 (2H, d, J = 8.64 Hz, H-2', H-6'), 6.93 (2H, d, J = 8.67 Hz, H-3', H-5'), 7.42 (1H, d, J = 15.57 Hz, H- α), 7.76 (1H, d, J =

15.39 Hz, H- β), 3.89 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 128.3 (C, C-1), 131.1 (CH, C-2, C-6), 114.2 (CH, C-3, C-5), 161.5 (C, C-4), 127.8 (C, C-1'), 130.2 (CH, C-2', C-6'), 114.5 (CH, C-3', C-5'), 151.1 (C, C-4'), 120.1 (CH, C- α), 143.2 (CH, C- β), 188.4 (C, COBz), 55.8 (CH₃, OCH₃); EIMS m/z (M^+ : 253), calcd for C₁₆H₁₅NO₂/253.

(2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(4-ethoxyphenyl)-prop-2-en-1-one (4)

Yellow amorphous powder (33.89%), m.p. 140–140.8 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 1634, 1600, 1588, 1575, 1480, 1167 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.90 (2H, d, J = 8.70 Hz, H-2, H-6), 6.69 (2H, d, J = 8.73 Hz, H-3, H-5), 7.63 (2H, d, J = 7.98 Hz, H-2', H-6'), 6.94 (2H, d, J = 8.70 Hz, H-3', H-5'), 7.58 (1H, d, J = 15.57 Hz, H- α), 7.65 (1H, d, J = 15.06 Hz, H- β), 4.08 (2H, q, J = 6.96, OCH₂CH₃), 1.39 (3H, t, J = 6.99 Hz, OCH₂CH₃). ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ = 129.3 (C, C-1), 132.5 (CH, C-2, C-6), 114.6 (CH, C-3, C-5), 155.5 (C, C-4), 127.9 (C, C-1'), 131.4 (CH, C-2', C-6'), 116.1 (CH, C-3', C-5'), 162.6 (C, C-4'), 120.7 (CH, C- α), 144.4 (CH, C- β), 199.3 (C, COBz), 64.8 (CH₂, OCH₂CH₃), 15.2 (CH₃, OCH₂CH₃); EIMS m/z (M^+ : 267), calcd for: C₁₇H₁₇NO₂/267.

(2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(4-chlorophenyl)-prop-2-en-1-one (5)

Yellow amorphous powder (53.59%), m.p. 162.9–163.3 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3555, 3350, 1621, 1570, 1550, 1490 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.91 (2H, d, J = 8.73 Hz, H-2, H-6), 7.69 (2H, d, J = 8.79, H-3, H-5), 7.42 (2H, d, J = 8.46 Hz, H-2', H-6'), 6.68 (2H, d, J = 8.76 Hz, H-3', H-5'), 7.70 (1H, d, J = 14.28 Hz, H- α), 7.74 (1H, d, J = 15.60 Hz, H- β). ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ = 135.6 (C, C-1), 132.7 (CH, C-2, C-6), 130.9 (CH, C-3, C-5), 137.5 (C, C-4), 127.6 (C, C-1'), 130.8 (CH, C-2', C-6'), 114.6 (CH, C-3', C-5'), 155.8 (C, C-4'), 124.3 (CH, C- α), 142.9 (CH, C- β), 189.9 (C, COBz); EIMS m/z (M^+ : 257.5), calcd for: C₁₅H₁₂NOCl/257.5.

(2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(3-nitrophenyl) prop-2-en-1-one (6)

Orange amorphous powder (69.85%), m.p. 208–208.7 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3400, 1640, 1600, 980 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃COCD₃, 300 MHz): δ = 8.26 (1H, d, J = 1.95 Hz, H-2), 7.98–8.26 (2H, m, H-4, H-5), 7.75 (2H, d, J = 7.89 Hz, H-2', H-6'), 6.74 (2H, d, J = 8.67 Hz, H-3', H-5'), 7.72 (1H, d, J = 15.96 Hz, H- α), 7.80 (1H, d, J = 17.34 Hz, H- β). ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 75 MHz): δ = 138.6 (C, C-1), 124.9 (CH, C-2), 149.9 (C, C-3), 126.3 (CH, C-4), 132.2

(CH, C-5), 135.2 (CH, C-6), 127.6 (C, C-1'), 132.3 (CH, C-2', C-6'), 114.2 (CH, C-3', C-5'), 154.7 (C, C-4'), 123.9 (CH, C- α), 140.0 (CH, C- β), 186.9 (C, COBz); EIMS m/z (M^+ : 268), calcd for C₁₅H₁₂N₂O₃/268.

(2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(4-dimethylaminophenyl)-prop-2-en-1-one (7)

Orange amorphous powder (35.66%), m.p. 169–170 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3500, 3460, 1610, 1570, 1350, 1160, 980 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.57 (2H, d, J = 8.85 Hz, H-2, H-6), 6.69 (2H, d, J = 8.76 Hz, H-3, H-5), 7.89 (2H, d, J = 8.73 Hz, H-2', H-6'), 6.76 (2H, d, J = 8.88 Hz, H-3', H-5'), 7.46 (1H, d, J = 15.39 Hz, H- α), 7.68 (1H, d, J = 15.39 Hz, H- β), 3.02 (6H, s, 2CH₃). ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ = 124.7 (C, C-1), 131.5 (CH, C-2, C-6), 113.3 (CH, C-3, C-5), 153.8 (C, C-4), 40.4 (C, N(CH₃)₂), 128.4 (C, C-1'), 132.3 (CH, C-2', C-6'), 114.6 (CH, C-3', C-5'), 155.2 (C, C-4'), 117.6 (CH, C- α), 145.8 (CH, C- β), 190.8 (C, COBz); EIMS m/z (M^+ : 266), calcd for C₁₇H₁₈N₂O/266.

(2E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(furan-2-yl)-prop-2-en-1-one (8)

Orange amorphous powder (69.85%), m.p. 118–118.3 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3447, 3434, 1640, 1584, 1545, 1173 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 6.78 (1H, d, J = 3.36 Hz, H-3), 6.55 (1H, m, H-4), 7.62 (1H, s, H-5), 7.85 (2H, d, J = 8.73 Hz, H-2', H-6'), 6.68 (2H, d, J = 8.73 Hz, H-3', H-5'), 7.50–7.62 (2H, s broad, H- α , H- β). ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ = 153.4 (C, C-2), 113.7 (CH, C-3), 116.5 (CH, C-4), 146.3 (CH, C-5), 127.6 (C, C-1'), 132.4 (CH, C-2', C-6'), 114.6 (CH, C-3', C-5'), 155.5 (C, C-4'), 130.5 (CH, C- α), 120.5 (CH, C- β), 189.7 (C, COBz); EIMS m/z (M^+ : 213), calcd for C₁₃H₁₁NO₂/213.

(2E,4E)-1-(4-aminophenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one (9)

Orange amorphous powder (34.00%), m.p. 151.8–152 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3458, 3376, 1635, 1611, 1576 1564 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.26–7.35 (5H, m, Ar), 7.84 (2H, d, J = 8.79 Hz, H-2', H-6'), 6.67 (2H, d, J = 8.76 Hz, H-3', H-5'), 7.00–7.25 (3H, m, H- α , H-7, H-8), 7.38 (1H, ddd, J = 15.96, 8.43, 1.65 Hz, H- β). ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ = 138.0 (C, C-1), 128.7 (CH, C-2, C-6), 130.0 (CH, C-3, C-5), 128.4 (C, C-4), 126.8 (CH, C-7), 142.6 (CH, C-8), 127.7 (C, C-1'), 132.5 (CH, C-2', C-6'), 114.6 (CH, C-3', C-5'), 155.6 (C, C-4'), 130.5 (CH, C- α), 144.6 (CH, C- β), 190.3 (C, COBz); EIMS m/z (M^+ : 253), calcd for C₁₇H₁₅NO/253.

N-(4'[(2E)-3-(phenyl)-1-(phenyl) prop-2-en-1-one]) acetamide (1a)

Yellow amorphous powder (88.92%), m.p. 158–158.5 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3330, 1658, 1600, 1310, 980 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz): δ = 7.40–7.72 (5H, m, Ar), 8.06 (2H, d, J = 8.79 Hz, H-2', H-6'), 7.71–7.75 (2H, s broad, H- α , H- β), 2.14 (3H, s, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz): δ = 136.5 (C, C-1), 129.8 (CH, C-2, C-6), 131.8 (CH, C-3, C-5), 131.1 (C, C-4), 134.6 (C, C-1'), 130.2 (CH, C-2', C-6'), 123.0 (CH, C-3', C-5'), 144.9 (C, C-4'), 24.2 (CH_3 , COCH_3), 120.4 (CH, C- α), 145.9 (CH, C- β), 191.0 (C, COBz), 172.1 (C, N-C=O); EIMS m/z (M^+ : 265), calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ /265.

N-(4'[(2E)-3-(4-fluorophenyl)-1-(phenyl) prop-2-en-1-one]) acetamide (2a)

Yellow amorphous powder (88.21%), m.p. 178.4–179 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3430, 1650, 1615, 1500, 1300, 980 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz): δ = 7.76 (2H, m, H-2, H-6), 7.16 (2H, t, J = 8.70 Hz, H-3, H-5), 8.07 (2H, d, J = 8.67 Hz, H-2', H-6'), 7.73 (2H, m, H-3', H-5'), 7.72–7.81 (2H, s broad, H- α , H- β), 2.16 (3H, s, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz): δ = 133.1 (C, C-1), 131.1 (CH, C-2, C-6), 116.9 (CH, C-3, C-5), 164.0 (C, C-4), 132.1 (C, C-1'), 131.1 (CH, C-2', C-6'), 122.9 (CH, C-3', C-5'), 144.9 (C, C-4'), 120.4 (CH, C- α), 144.5 (CH, C- β), 190.8 (C, COBz), 172.1 (C, N-C=O); EIMS m/z (M^+ : 283), calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{F}$ /283.

N-(4'[(2E)-3-(4-methoxyphenyl)-1-(phenyl) prop-2-en-1-one]) acetamide (3a)

Yellow amorphous powder (49.40%), m.p. 202.5–202.8 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3260, 1640, 1600, 1310, 1160, 970 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz): δ = 7.71 (2H, m, H-2, H-6), 7.00 (2H, d, J = 8.70 Hz, H-3, H-5), 8.00 (2H, d, J = 8.70 Hz, H-2', H-6'), 7.74 (2H, d, J = 8.55 Hz, H-3', H-5'), 7.72 (1H, d, J = 15.63 Hz, H- α), 7.76 (1H, d, J = 16.47 Hz, H- β), 3.85 (3H, s, OCH_3), 2.16 (3H, s, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz): δ = 129.1 (C, C-1), 131.4 (CH, C-2, C-6), 115.7 (CH, C-3, C-5), 163.6 (C, C-4), 132.6 (C, C-1'), 131.8 (CH, C-2', C-6'), 120.4 (CH, C-3', C-5'), 146.2 (C, C-4'), 120.4 (CH, C- α), 144.7 (CH, C- β), 191.1 (C, COBz), 172.1 (C, N-C=O), 56.1 (C, OCH_3); EIMS m/z (M^+ : 295), calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ /295.

N-(4'[(2E)-3-(4-ethoxyphenyl)-1-(phenyl) prop-2-en-1-one]) acetamide (4a)

Yellow amorphous powder (38.02%), m.p. 134–135 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3310, 1650, 1670, 1600, 1310, 1155,

980 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.57 (2H, d, J = 8.50 Hz, H-2, H-6), 6.91 (2H, d, J = 8.45 Hz, H-3, H-5), 8.00 (2H, d, J = 8.40, H-2', H-6'), 7.66 (2H, d, J = 7.75 Hz, H-3', H-5'), 7.39 (1H, d, J = 15.55 Hz, H- α), 7.78 (1H, d, J = 15.60 Hz, H- β), 4.08 (2H, q, J = 6.85 Hz, OCH_2CH_3), 1.43 (3H, t, J = 6.90 Hz, OCH_2CH_3), 2.21 (3H, s, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 127.6 (C, C-1), 130.0 (CH, C-2, C-6), 115.1 (CH, C-3, C-5), 161.3 (C, C-4), 134.2 (C, C-1'), 130.5 (CH, C-2', 6'), 119.2 (CH, C-3', 5'), 142.3 (C, C-4'), 63.9 (CH_2 , OCH_2CH_3), 14.9 (CH_3 , OCH_2CH_3), 25.0 (CH_3 , COCH_3), 119.5 (CH, C- α), 144.8 (CH, C- β), 189.4 (C, COBz), 168.9 (C, N-C=O); EIMS m/z (M^+ : 309), calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ /309.

N-(4'[(2E)-3-(4-chlorophenyl)-1-(phenyl) prop-2-en-1-one]) acetamide (5a)

Yellow amorphous powder (54.02%), m.p. 198.5–199 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3270, 1650, 1600, 1310, 980 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz): δ = 7.42 (2H, d, J = 8.49 Hz, H-2, H-6), 7.90 (2H, d, J = 8.76 Hz, H-3, H-5), 8.00 (2H, d, J = 8.79 Hz, H-2', H-6'), 6.69 (2H, d, J = 8.76 Hz, H-3', H-5'), 7.40 (1H, d, J = 17.04 Hz, H- α), 8.71 (1H, d, J = 14.88 Hz, H- β), 2.15 (3H, s, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz): δ = 134.5 (C, C-1), 130.4 (CH, C-2, C-6), 131.0 (CH, C-3, C-5), 137.5 (C, C-4), 135.3 (C, C-1'), 132.7 (CH, C-2', 6'), 120.4 (CH, C-3', 5'), 142.6 (C, C-4'), 130.3 (CH, C- α), 145.0 (CH, C- β), 190.0 (C, COBz), 172.1 (C, N-C=O), 24.2 (CH_3 , COCH_3); EIMS m/z (M^+ : 283.5), calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NOCl}$ /283.5.

N-(4'[(2E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(phenyl) prop-2-en-1-one]) acetamide (6a)

Orange amorphous powder (51.29%), m.p. 198–198.3 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3330, 1610, 1660, 1580, 1340, 970 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3SOCD_3 , 300 MHz): δ = 8.17–7.75 (2H, m, H-4, H-5), 8.17 (1H, d, J = 10.53 Hz, H-6), 7.96 (2H, d, J = 7.41 Hz, H-2', H-6'), 6.63 (2H, d, J = 7.32 Hz, H-3', H-5'), 8.00 (1H, d, J = 17.04, H- α), 8.71 (1H, d, 14.88 Hz, H- β), 2.09 (3H, s, COCH_3). NMR de ^{13}C (CD_3SOCD_3 , 75 MHz): δ = 134.9 (C, C-1), 122.8 (CH, C-2), 148.4 (C, C-3), 122.6 (CH, C-4), 130.1 (C, C-5), 134.7 (CH, C-6), 137.1 (C, C-1'), 131.4 (CH, C-2', C-6'), 112.9 (CH, C-3', 5'), 144.0 (C, C-4'), 122.9 (CH, C- α), 144.0 (C, C- β), 187.4 (C, COBz), 169.2 (C, N-C=O), 24.2 (CH_3 , COCH_3); HRESIMS, m/z : 310.1445($\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3$) [$M+H$] $^+$ (calcd. 310.1443).

N-(4'[(2E)-3-(4-dimethylaminophenyl)-1-(phenyl) prop-2-en-1-one]) acetamide (7a)

Yellow amorphous powder (60.40%), m.p. 207–207.5 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3410, 1680, 1650, 1580, 1380, 1030 cm

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.66 (2H, d, J = 8.20 Hz, H-2,H-6), 7.53 (2H, d, J = 8.65 Hz H-3,H-5), 8.00 (2H, d, J = 8.30 Hz, H-2',H-6'), 6.71 (2H, d broad, H-3'/H-5'), 7.34 (1H, d, J = 15.45 Hz, H- α), 7.78 (1H, d, J = 15.45 Hz, H- β), 3.04 (6H, s, 2CH₃), 2.21 (3H, s, COCH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 134.6 (C, C-1), 130.1 (CH, C-2, C-6), 112.3 (CH, C-3,C-5), 152.0 (C, C-4), 40.5 (C, N(CH₃)₂), 133.0 (C, C-1'), 130.6 (CH, C-2',C-6'), 116.9 (CH, C-3',C-5'), 145.7 (C, C-4'), 24.9 (CH₃, COCH₃), 119.2 (CH, C- α), 142.0 (CH, C- β), 189.5 (C, COBz), 169.0 (C, N-C=O), 40.5(C, N(CH₃)₂), 24.9(CH₃, COCH₃); EIMS m/z (M⁺: 308), calcd for C₁₉H₂₀N₂O₂/308.

N-(4'[(2E)-3-(furan-2-yl)-1-(phenyl) prop-2-en-1-one] acetamide (8a)

Orange amorphous powder (76.17%), m.p. 122–122.4 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3470, 1690, 1640, 1600, 1375, 1005 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 6.51 (1H, s broad, H-3), 6.70 (1H, d, J = 3.09 Hz, H-4), 7.46 (1H, s, H-5), 8.00 (2H, d, J = 8.55 Hz, H-2', H-6'), 7.66 (2H, d, J = 8.31 Hz, H-3', H-5'), 7.33 (1H, d, J = 15.33 Hz, H- α), 7.51 (1H, d, J = 17.58 Hz, H- β), 2.21 (3H, s, COCH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 151.9 (C, C-2), 112.7 (CH, C-3), 116.2 (CH, C-4), 145.1 (CH, C-5), 133.9 (C, C-1'), 130.0 (CH, C-2', C-6'), 119.3 (CH, C-3', C-5'), 24.8 (CH₃, COCH₃), 119.4 (CH, C- α), 130.7 (CH, C- β), 188.8 (C, COBz), 169.0 (C, N-C=O), 24.9 (CH₃, COCH₃); EIMS m/z (M⁺: 239), calcd for C₁₅H₁₃NO₂/239.

N-(4'[(2E)-5-[phenylpenta-2,4-dien]-1-(phenyl) prop-2-en-1-one] acetamide (9a)

Orange amorphous powder (22.27%), m.p. 176.5–177 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3300, 1670, 1650, 1600, 1300, 1000 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.33–7.40 (5H, m, Ar), 7.98 (2H, d, J = 8.64 Hz, H-2',H-6'), 7.01 (2H, d, J = 7.71 Hz, H-3',H-5'), 7.19 (1H, d, J = 14.79 Hz, H- α), 7.51 (1H, dd, J = 17.40, 8.76 Hz, H- β), 7.02–7.07 (2H, m, H-7,H-8), 2.23 (3H, s, COCH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 136.4 (C, C-1), 127.5 (CH, C-2, C-6), 129.1 (CH, C-3,C-5), 129.4 (C, C-4), 134.1 (C, C-1'), 130.0 (CH, C-2', C-6'), 119.2 (CH, C-3', C-5'), 142.1 (C, C-4'), 24.9 (CH₃, COCH₃), 127.2 (CH, C- α), 144.8 (CH, C- β), 125.4 (CH, C-7), 142.0 (CH, C-8), 189.2 (C, COBz), 168.8 (C, N-C=O), 24.9 (CH₃, COCH₃); EIMS m/z (M⁺: 291), calcd for C₁₉H₁₇NO₂/291.

(2E)-1-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-3-(4-chlorophenyl)-prop-2-en-1-one (10)

Yellow amorphous powder (20.89%), m.p. 141–141.3 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3390, 1640, 1590, 1290, 1180, 970 cm⁻¹;

¹H-NMR (CD₃COCD₃, 300 MHz): δ = 7.50 (2H, d, J = 7.50 Hz, H-2,H-6), 7.70 (2H, d, J = 8.73 Hz, H-3, H-5), 7.76 (1H, d, J = 1.92 Hz, H-2'), 6.70 (1H, d, J = 8.22 Hz, H-5'), 7.74 (1H, dd, J = 8.85, 2.01 Hz, H-6'), 7.73 (1H, d, J = 17.90 Hz, H- α), 7.91 (1H, d, J = 15.48 Hz, C- β), 3.90 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 75 MHz): δ = 135.3 (C, C-1), 129.9 (CH, C-2,C-6), 130.9 (CH, C-3, C-5), 136.9 (C, C-4), 136.2 (C, C-1'), 112.6 (CH, C-2'), 148.7 (C, C-3'), 152.7 (C, C-4'), 115.6 (CH, C-5'), 124.6 (CH, C-6'), 123.7 (CH, C- α), 142.2 (CH, C- β), 56.5 (C, OCH₃), 187.9 (C, COBz); EIMS m/z (M⁺: 288.5), calcd for C₁₆H₁₃NO₃Cl /288.5.

(2E)-1-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl) prop-2-en-1-one (11)

Yellow amorphous powder (46.33%), m.p. 179.4–180 °C; FT-IR (KBr) ν_{\max} 3425, 1621, 1575, 1350, 990 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃COCD₃, 300 MHz): δ = 6.96–8.26 (5H, m, Ar), 8.65 (1H, s, H-2'), 7.73 (1H, m, H-5'), 8.23 (1H, d, J = 6.36 Hz, H-6'), 7.82 (1H, d, J = 15.35 Hz, H- α), 7.87 (1H, d, J = 15.35 Hz, H- β), 3.90 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 75 MHz): δ = 131.1 (C, C-1), 124.9 (CH, C-2), 152.9 (C, C-3), 125.1 (CH, C-4), 131.2 (CH, C-5), 135.4 (CH, C-6), 138.3 (C, C-1'), 124.9 (CH, C-2'), 148.8 (C, C-3'), 149.9 (C, C-4'), 115.6 (CH, C-5'), 125.8 (CH, C-6'), 123.5 (CH, C- α), 141.1 (CH, C- β), 56.5 (C, OCH₃), 187.8 (C, COBz); HRESIMS m/z : 300.0867 (C₁₆H₁₃NO₃) [M+H]⁺ (calcd. 300.0872).

NMR, GC-MS, and IR measurements

The chemical reagents were from Sigma-Aldrich. ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained using a Bruker Spectrometer, either model Avance DPX-300 or model Avance DRX-500 operating at frequencies of 300 or 500 MHz for hydrogen, and 75 or 125 MHz for carbon, respectively. The spectra were measured in the solvents CD₃OD, CD₃COCD₃, and CDCl₃, and chemical shifts are reported as δ values in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (δ 0.00) as the internal standard. The mass spectra were obtained with a Shimadzu QP201 GC-MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry) using an RTX-5MS capillary column (30.0 m \times 0.25 mm \times 0.30 mm) for compounds within the literature record, and UPLC-QTOF-MS was performed with an ACQUITY UPLC BEH column (150 \times 2.1 mm, 1.7 μ m; Waters Co.) on a Waters Acquity UPLC system. The column temperature was set at 40 °C. The binary gradient elution system consisted of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B), with a linear gradient from 2 to 95% B (0–15 min), with a flow rate of 0.4 mL.min⁻¹ for the new compound (11). The high mass spectra of the chalcone 11

was obtained with LC–MS on an Acquity UPLC system coupled with quadrupole/TOF mass analyzers (Waters) equipped with an ESI source operated in the negative ionization mode (UPLC-ESI-qTOF). The chromatographic separations were performed using a Waters Acquity UPLC BEH column (150.0 × 2.1 mm × 1.7 μm) at 40 °C. Water and acetonitrile were used for the mobile phase, both with 0.1% formic acid. The gradient ranged from 95 to 2% water in 15 min at a flow rate of 0.4 mL/min and an injection volume of 5.0 μL. The desolvation gas was N₂ at 350 °C at a flow rate of 350 L/h and a source temperature of 120 °C. The capillary voltage was set to 2.600 V. The collision energies/cone voltages were set to 6 eV/15 V (low) and 30–50 eV/30 V (high) to achieve sufficient fragmentation. The MS spectra were acquired in negative ionization mode between 100 and 1180 Da in MSE tandem mode. The samples were prepared by filtering 1 mL of the chalcones directly through a 0.22 μm PTFE syringe filter (Simple Pure, USA). Infrared spectra were determined on a Perkin Elmer FT/IR 1000 spectrophotometer and reported as the wavenumber (cm⁻¹). The melting point was determined with the MQAPF-302 apparatus (microchemistry) with a heating rate of 3.0 °C/min.

Cell culture

The human cancer cell lines (HCT-116, colon carcinoma; PC-3, prostate adenocarcinoma; HL-60, promyelocytic leukemia; K-562, chronic myeloid leukemia; and KASUMI-1, acute myeloid leukemia) were obtained from the National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA. The L-929 (murine fibroblasts) nontumor cell line was purchased from ATCC[®] and deposited in the Rio de Janeiro cell bank. The cell lines were maintained in RPMI-1640 medium or DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Determination of cytotoxic activity

The cytotoxicity of the compounds was determined using the MTT assay (Mosmann 1983). Briefly, cells were seeded in 96-well plates (0.7 × 10⁴ cells/well for adherent cells and 0.3 × 10⁵ cells/well for suspended cells). The compounds dissolved in DMSO were added to each well using high-throughput screening with a Biomek 3000 (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA) and incubated for 3 days (72 h). The control group received the same amount of vehicle, and the final concentration of DMSO in the culture media was constant (below 0.5%). After incubation, the supernatant was replaced by fresh medium containing MTT (0.5 mg·mL⁻¹). Three hours later, the MTT formazan product was dissolved in 150 μL of DMSO, and the absorbance was measured at

595 nm (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA).

To carry out a structure-activity relationship analysis, all compounds were tested against HCT-116 cells at different concentrations (0.04–20 μM) to determine the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) after 72 h of incubation. In addition, the IC₅₀ value of the most active compound was determined for four other human tumor cell lines (PC-3, HL-60, K-562, and KASUMI-1) and one nontumor cell line (L-929) after 72 h of incubation. Doxorubicin (0.07–8.6 μM; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) was used as a positive control.

Study of the mechanism of cytotoxicity

In this stage, the study aimed to describe the chalcone **6a**-induced cytotoxicity against HCT116 cells (chosen based on the preliminary cytotoxicity screening). For this purpose, the cells (0.7 × 10⁵ cells/well) were incubated with the chalcone **6a** for 24 h at three different concentrations (2.5, 5 and 10 μM; chosen based on the IC₅₀ values obtained by the MTT assay), and the experiments below were performed (Pereira et al. 2016). The control group received the same amount of vehicle whose concentration was kept constant (below 0.5%). Cell treatments were carried out in triplicate. Doxorubicin (2 μM; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) was used as a positive control due to its known cytotoxic effects, as well as its ability to induce cell cycle arrest in the G2/M phase. Stock solutions of the compounds tested were prepared in DMSO and diluted in culture medium to obtain the desired concentrations.

Morphological analysis

The morphological features of HCT116 cells were assessed using light microscopy (Olympus, Tokyo, Japan). Cells were harvested, transferred to Cytospin slides, and stained using a quick panoptic kit (Laborlin, Brazil). Cells were fixed with methanol and counterstained with 0.1% xanthenes and 0.1% thiazines before the analysis.

Apoptosis assay

Apoptosis was examined by Annexin V/7-AAD staining followed by flow cytometry. Briefly, HCT116 cells were collected (both floating and attached cells) and stained using an Annexin V-PE/7-AAD apoptosis detection kit. Annexin V binds to phosphatidylserine (PS) in cells undergoing apoptosis due to the translocation of PS from the inner leaflet to the outer leaflet of the cytoplasmic membrane. 7-AAD is a fluorescent intercalator of DNA impermeant to the cell, indicating membrane integrity. Double staining is used to distinguish between viable, early apoptotic cells, and necrotic

or late apoptotic cells. The resulting fluorescence (Annexin V-PE at 583 nm and 7-AAD at 680 nm) of all samples was analyzed with BD FACSVerserTM. 7-AAD-positive and annexin V-negative cells were considered necrotic. Annexin V-positive cells (both 7-AAD positive and negative cells) were considered apoptotic cells. 7-AAD-negative and Annexin V-negative cells were considered viable.

Determination of cell viability and membrane integrity

Cell viability and cell membrane integrity analyses were performed with propidium iodide (5 µg/mL, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) exclusion using flow cytometry. HCT116 cells were plated in 24-well plates and treated with PJOV56. After cell harvesting, the treated and untreated cells were incubated with propidium iodide in the dark for 5 min. Then, the fluorescence was measured by flow cytometry with BD FACSVerserTM (BD Biosciences, San Jose, CA).

DNA fragmentation and cell cycle analysis

The DNA content of HCT116 cells was assessed by propidium iodide DNA staining followed by flow cytometry analysis. Briefly, cells were treated with PJOV56, harvested and incubated in the dark with a solution containing 5 µg.mL⁻¹ propidium iodide, 5 µg.mL⁻¹ RNase, 0.1 % sodium citrate, and 0.1 % Triton X-100 at room temperature for 40 min. The DNA fragmentation and cell cycle profile were obtained by cell counting and fluorescence measurements using a BD FACSVerserTM flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Data were analyzed by ModFit LT software (Verity Software House, Inc., Topsham, ME).

Statistical analysis

Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) from three independent experiments performed in triplicate as calculated by Prism 8.0 (GraphPad/Intuitive Software for Science, San Diego, CA). The IC₅₀ values of the compounds were obtained from the nonlinear regression of the cytotoxicity curves. Statistical analyses for multiple comparisons were performed using one-way ANOVA followed by Turkey's Test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results and discussion

Structural characterization

The structures of the twenty synthetic chalcones were elucidated by spectroscopic methods, including 1D NMR for

those chalcones registered in the literature, and 1D and 2D (COSY, HSQC and HMBC) NMR for the new chalcone (**11**), electron ionization mass spectrometry, high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). The ¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR spectra in CDCl₃ (δ, ppm, J/Hz) are presented in the Supplementary Material in Figs S1–S44. The mass spectra of these chalcones are shown in Figs S45–S64 and their infrared spectra are given in Figs S65–S84. The values of the coupling constants between H_α and H_β ($J = 12.10$ – 17.98 Hz) confirm that for this reaction, the products generated were only *E*-isomers.

Cytotoxic activity against tumor and nontumor cells

The MTT assay was used to determine the cytotoxicity of the synthesized chalcones. This test is extremely useful for both determining cell viability studies and defining the anticancer potential of new compounds (Kepp et al. 2011). Table 1 displays the IC₅₀ values of the investigated compounds whose data were used for the structure–activity relationship analysis.

Out of 20 compounds tested, only **1a** (IC₅₀ = 4.96 ± 0.03 µM), **2a** (IC₅₀ = 7.05 ± 0.02 µM), **5a** (IC₅₀ = 5.75 ± 0.44 µM), and **6a** (IC₅₀ = 3.56 ± 0.03 µM) showed a strong cytotoxic effect (IC₅₀ < 10 µM) against HCT-116 cells, revealing that small modifications to the chalcone chemical structure were able to alter the biological activity. Careful analysis of the structures suggests that the cytotoxicity can be attributed to the combined effects of the two electron-withdrawing groups in the structure of **6a** (an amide group on ring A and a nitro group on ring B). For the amide group contribution, compound **1a** (IC₅₀ = 4.96 ± 0.03 µM) presented higher cytotoxic activity when compared to **1** (IC₅₀ > 20 µM). Regarding the nitro group, compounds **6** (IC₅₀ = 13.96 ± 0.03 µM) and **6a** (IC₅₀ = 3.56 ± 0.03 µM) presented greater activity when compared with **1** and **1a**, respectively. Moreover, the presence of an extended conjugated system significantly reduced the cytotoxic effect. Compound **9a** (IC₅₀ > 20 µM) showed no cytotoxic effect when compared to compound **1a** (IC₅₀ = 4.96 ± 0.03 µM), and this effect was influenced by the presence of an additional double bond in the conjugated system. Another important structural feature that reduced the cytotoxic activity was a high electronic density in ring B (IC₅₀ > 20 µM) for compounds **3**, **3a**, **4**, **4a**, **7** (% RCV = 4.25 ± 2.60 %), **7a** (% RCV = 0.00 %), **8** (% RCV = 9.15 ± 3.01 %), and **8a** (% RCV = 9.45 ± 1.37 %). These data are corroborated by a review of the anticancer activity of chalcones that states that the cytotoxic properties of chalcones against cancer cell lines are mainly influenced by the substituents on the two aryl rings of the chalcone molecule simultaneously (Karthikeyan et al. 2015). Recent studies (Nazir et al. 2013; Guilherme et al.

Table 1 Cytotoxicity of the chalcones **1–11** and **1a–9a** at different concentrations (0.02–20 μM) against HCT-116 cells (human colon carcinoma) after 72 h of incubation using MTT assay

Chalcone	Chemical group ^b			HCT-116
	R	R ₁	R ₂	IC ₅₀ ± S.E.M. (μM) ^a
1	NH ₂	H	Ph	>20
1a	–NHCOCH ₃	H	Ph	4.96 ± 0.03
2	NH ₂	H	<i>p</i> -F-Ph	15.16 ± 0.06
2a	–NHCOCH ₃	H	<i>p</i> -F-Ph	7.05 ± 0.02
3	NH ₂	H	<i>p</i> -OCH ₃ -Ph	>20
3a	–NHCOCH ₃	H	<i>p</i> -OCH ₃ -Ph	>20
4	NH ₂	H	<i>p</i> -OCH ₂ CH ₃ -Ph	>20
4a	–NHCOCH ₃	H	<i>p</i> -OCH ₂ CH ₃ -Ph	>20
5	NH ₂	H	<i>p</i> -Cl-Ph	>20
5a	–NHCOCH ₃	H	<i>p</i> -Cl-Ph	5.75 ± 0.44
6	NH ₂	H	<i>m</i> -NO ₂ -Ph	13.96 ± 0.03
6a	–NHCOCH ₃	H	<i>m</i> -NO ₂ -Ph	3.56 ± 0.03
7	NH ₂	H	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂ -Ph	>20
7a	–NHCOCH ₃	H	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂ -Ph	>20
8	NH ₂	H	Furan-2-yl	>20
8a	–NHCOCH ₃	H	Furan-2-yl	>20
9	NH ₂	H	Phenylpenta-4-en	>20
9a	–NHCOCH ₃	H	Phenylpenta-4-en	>20
10	OH	OCH ₃	<i>p</i> -Cl-Ph	>20
11	OH	OCH ₃	<i>m</i> -NO ₂ -Ph	>20

^aData are presented as half maximal inhibitory concentration (IC₅₀ in μM) ± Standard Error of the Mean (S.E.M.) obtained from three independent experiments performed in triplicate

^bSpecific chemical groups of each compound bonded to fundamental core

Table 2 Cytotoxicity of chalcone **6a** at different concentrations (0.02–20 μM) against six cell lines after 72 h of incubation using MTT assay

Chalcone	Cell line					
	HCT-116	PC-3	HL-60	K-562	KASUMI-1	L-929
	IC ₅₀ ± S.E.M. (μM) ^a					
6a	3.56 ± 0.03	9.33 ± 0.05	5.65 ± 0.41	7.49 ± 1.35	10.52 ± 0.10	>20
Dox^b	0.11 ± 0.03	0.44 ± 0.10	0.02 ± 0.002	0.46 ± 0.01	0.13 ± 0.007	0.66 ± 0.17

^aData are presented as half maximal inhibitory concentration (IC₅₀ in μM) ± Standard Error of the Mean (S.E.M.) for tumor cells (HCT-116, human colon carcinoma; PC-3, human prostate adenocarcinoma; HL-60, human promyelocytic leukemia; K-562, human chronic myeloid leukemia; and KASUMI-1, human acute myeloid leukemia), and nontumor cells (L-929, murine fibroblast), obtained from at least two independent experiments performed in triplicate

^bDoxorubicin (**Dox**, 0.07–8.6 μM) was used as positive control of the assay

2015) have also demonstrated the high cytotoxic effects of nitro- and amide-containing chalcones against various types of human cancer cell lines, including colon cancer. Moreover, Guo et al. (2018) showed that a synthetic compound bearing the strongly electron-withdrawing NO₂ group displayed the highest anticancer activity (7.3 ± 1.2 μM) against the A549 cell line (lung cancer) compared with the other synthesized compounds. All of these findings reinforce the synthetic proposal of the present work. For these reasons, chalcone **6a** was selected for further IC₅₀ value determination against four human tumor cell lines (PC-3, HL-60, K-562, and KASUMI-1) and nontumor murine fibroblasts (L-929 cells). Table 2 shows the cytotoxicity of chalcone **6a** at different concentrations (0.02–20 μM) against six cell lines after 72 h of incubation using MTT assay. Against the tumor cells, the IC₅₀ values of **6a** ranged from 5.65 to 10.52 μM (strong cytotoxic activity). Against L-929 cells, compound **6a** was not active (IC₅₀ > 20 μM). This suggests that there are specific characteristics of the tumor cells that are being affected by compound **6a** at the tested concentrations. In fact, cancer has six biological capabilities, including sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, and activating invasion and metastasis (Hanahan and Weinberg 2011). In this context, Karthikeyan et al. (2015) reported the cytotoxic activity of chalcones through multiple mechanisms, including cell cycle disruption, angiogenesis inhibition, tubulin polymerization inhibition, apoptosis induction, blockade of the NF- κ B signaling pathway, and inhibition of cell cycle regulatory kinases.

Mechanism of cytotoxicity against human colon cancer cells

Based on the initial data indicating the in vitro cytotoxic potential of the chalcone **6a**, we decided to investigate the pattern of cell death induced by this chalcone in HCT-116 cells at three concentrations (2.5, 5, and 10 μM) after 24 h of incubation. First, microscopic analysis showed that

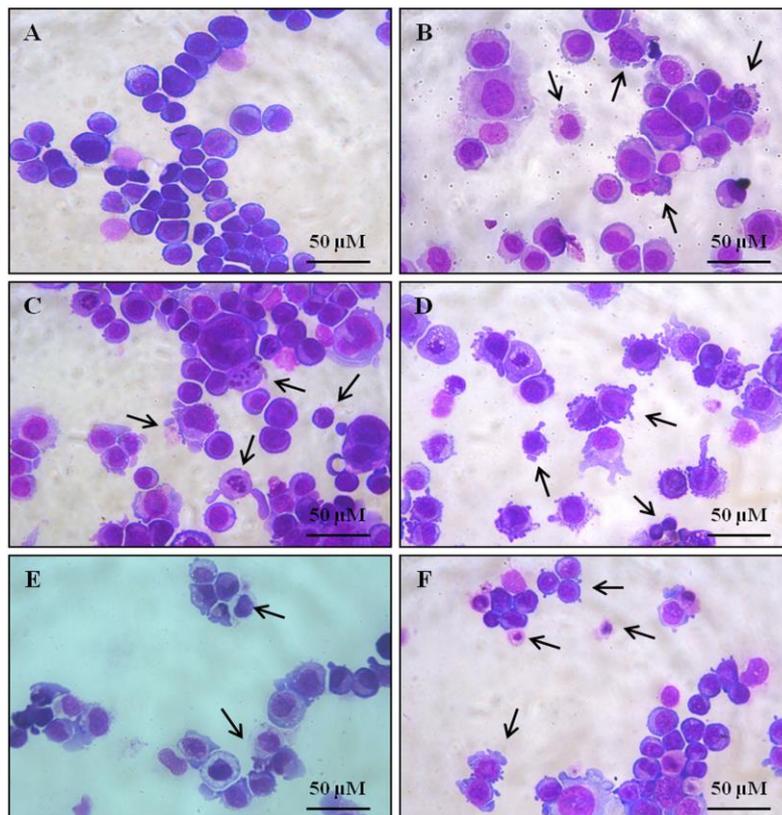


Fig. 4 Effect of chalcone **6a** on the morphology of HCT-116 cells determined by light microscopy (400 \times) using panoptic kit after 24 h of incubation. Cells untreated (**a**) or treated with chalcone **6a** (2.5 μ M, **c**; 5 μ M, **d**; and 10 μ M, **e**) were fixed with methanol and counter-stained

with 0.1% xanthanes and 0.1% thiazines before the analysis. Black arrows show apoptotic cells (nuclear fragmentation, chromatin condensation, apoptotic bodies, and cell shrinkage)

chalcone **6a** was able to induce morphological changes in HCT-116 cells that were characteristic of apoptosis (nuclear fragmentation, chromatin condensation, apoptotic bodies, and cell shrinkage), and these changes were more evident at the concentrations of 5 and 10 μ M (Fig. 4d, e) (Kroemer et al. 2008).

Chalcone **6a**-induced apoptosis was confirmed by the externalization of phosphatidylserine accompanied by maintenance of membrane integrity and a reduction in the number of cells as determined by flow cytometry (Figs 5 and 6). At 10 μ M, chalcone **6a** induced a significant increase in apoptotic cells (9.60 ± 1.68 %) when compared with the negative control (1.55 ± 0.18 %). At this concentration, we also observed 90.29 ± 0.62 % membrane

integrity (no difference when compared with the negative control value of 95.10 ± 0.55 %) and $4.21 \pm 0.19 \times 10^5$ cells/mL (statistically significant when compared with the negative control, $7.34 \pm 0.35 \times 10^5$ cells/mL) after 24 h of incubation. Corroborating these results, Das and Manna (2016) highlighted the participation of apoptosis in the anticancer activity of chalcones. Specifically, against human colon cancer, apoptosis induction might be correlated with a cell cycle arrest in the G2/M phase, involving disruption of the microtubular network and/or DNA damage. The mitotic spindle network is critical for the process of cell division, whereas disruption leads to apoptosis (Bond et al. 2018).

In this work, we confirmed this effect for chalcone **6a** against HCT-116 cells (Fig. 7). Similar to the positive control

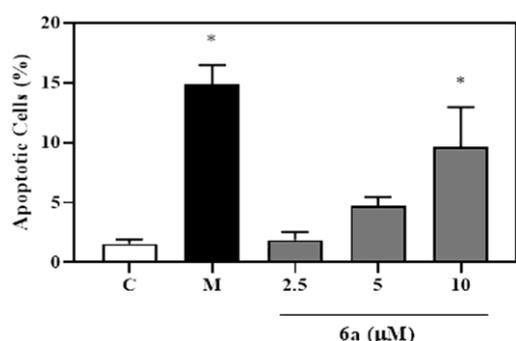


Fig. 5 Effect of chalcone **6a** on the PS externalization of HCT-116 cells determined by flow cytometry using Annexin V-PE/7-AAD after 24 h of incubation. Data are presented as mean \pm S.E.M. from three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared with negative control (c) by One-way ANOVA followed by the Turkey's Test. Ten thousand events were analyzed in each experiment, and menadione (M; 20 μ M) was used as positive control

doxorubicin (2 μ M; %G2/M = 79.78 ± 1.35 %), chalcone **6a** induced significant G2/M arrest (59.87 ± 5.15 %) in HCT-116 cells when compared with the negative control (treated with only vehicle; %G2/M = 36.70 ± 2.47 %). This means that compound **6a** may interfere with the process of cellular division that is detectable by cell cycle checkpoints (Das and Manna 2016). Consequently, the cells are triggered to cell death by apoptosis, as we can observe in the data shown above (morphological and flow cytometry data). It is worth mentioning that the chalcone **6a** was not able to induce DNA at the tested concentrations and incubation time (data not shown). It seems that DNA fragmentation is not involved with the chalcone **6a**-induced cell cycle arrest in HCT-116 cells, at least not as a starting point. This evidence reinforces the hypothesis of mitotic spindle network interference that shall be investigated further. In fact, Martel-Frchet et al. (2015) identified a new chalcone derivative that is capable of inducing prometaphase arrest and subsequent apoptosis of bladder cancer cells that acts as a microtubule inhibitor. Finally, it is important to note that additional tests are necessary to evaluate the specific mechanism of action involved in the selective cytotoxicity of chalcone **6a** against HCT-116 cells.

Conclusions

A series of twenty *E*-isomer chalcones were synthesized by the Claisen–Schmidt condensation reaction; nine 4'-aminochalcones, nine 4'-acetamidochalcones, and two 3'-methoxy-4'-hydroxychalcones. Regarding cytotoxic activity, this work demonstrated that small changes in the

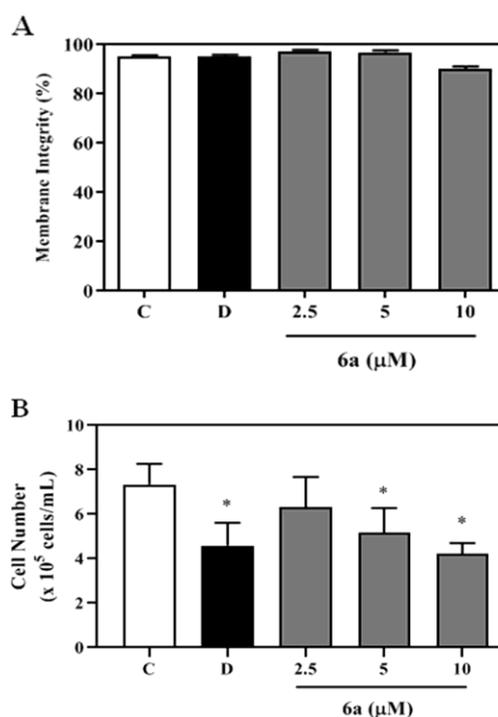


Fig. 6 Effect of chalcone **6a** on cell membrane integrity (a) and cell number (b) of HCT-116 cells determined by flow cytometry using propidium iodide (PI) after 24 h incubation. Data are presented as mean \pm S.E.M. from three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared with negative control (c) by One-way ANOVA followed by the Turkey's Test. Ten thousand events were analyzed in each experiment, and doxorubicin (d; 2 μ M) was used as positive control

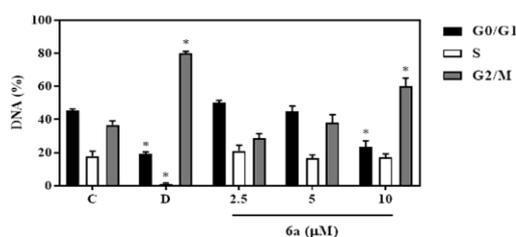


Fig. 7 Effect of chalcone **6a** on the DNA content of HCT-116 cells determined by flow cytometry using propidium iodide (PI) after 24 h of incubation. Data are presented as mean \pm S.E.M. from three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared with negative control (c) by ANOVA followed by Turkey's Test. Ten thousand events were analyzed in each experiment, and doxorubicin (d; 2 μ M) was used as positive control

structure of the chalcone are capable of improving the in vitro effects against human cancer cells. In this context, chalcone N-(4'-(E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(phenyl)prop-2-en-1-one)] acetamide (**6a**) containing an amide group on ring A and a nitro group on ring B showed a strong and selective cytotoxic effect against HCT-116 cells and was able to induce cell death by apoptosis related to G2/M cell cycle arrest. These data provide us with the prospect of conducting studies on the specific mechanism of action of chalcone **6a** using human cancer cell-based assays.

Acknowledgements The authors thank the National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA) for donating of all human tumor cell lines used in this study. CENAUREMN—Northeastern Center for the Application and Use of Nuclear Magnetic Resonance and EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL—Multiuser Laboratory of Natural Product Chemistry by obtaining the spectral data. Teixeira AMR also acknowledges financial support from the PQ/CNPq (Grant#: 3 05719/2018-1).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Abbas A, Naseer MM, Hasan A, Hadda TB (2014) Synthesis and cytotoxicity studies of 4-Alkoxychalcones as new antitumor agents. *J Mater Environ Sci* 5:281–292
- Bhat BA, Dhar KL, Puri SC, Saxena AK, Shanmugavel M, Qazi GN (2005) Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem Lett* 15:3177–3180
- Boeck P, Bandeira Falcão CA, Leal PC, Yunes RA, Filho VC, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B (2006) Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorg Med Chem* 14:1538–1545
- Bond MJ, Bleiler M, Harrison LE, Scocchera EW, Nakanishi M, G-Dayanan N, Keshipeddy S, Rosenberg DW, Wright DL, Giardina C (2018) Spindle assembly disruption and cancer cell apoptosis with a CLTC-binding compound. *Mol Cancer Res* 16:1361–1372
- Cabrera M, Simoens M, Falchi G, Lavaggi ML, Piro OE, Castellano EE, Vidal A, Azqueta A, Monge A, de Cerain AL, Sagrera G, Seoane G, Cerecetto H, González M (2007) Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure–activity relationships. *Bioorg Med Chem* 15:3356–3367
- Corrêa R, Pereira MAS, Buffon D, dos Santos L, Filho VC, Santos ARS, Nunes RJ (2001) Antinociceptive properties of chalcones. Structure-activity relationships. *Arch Pharm* 334:332–334
- De Campos-Buzzi F, Padaratz P, Meira VA, Corrêa R, Nunes JR, Cechinel-Filho V (2007) 4'-acetamidochalcone derivatives as potential antinociceptive agents. *Molecules* 12:896–906
- de Campos-Buzzi F, Pereira de Campos J, Pozza Tonini P, Corrêa R, Augusto Yunes R, Boeck P, Cechinel-Filho V (2006) Antinociceptive effects of synthetic chalcones obtained from xanthoxylone. *Arch Pharm* 339:361–365
- Das M, Manna K (2016) Chalcone scaffold in anticancer armamentarium: a molecular insight. *J Toxicol* 6:7651047
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65:337–353
- Ducki S, Forrest R, Hadfield JA, Kendall A, Lawrence NJ, McGown AT, Rennison D (1998) Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorg Med Chem Lett* 8:1051–1056
- Guilherme AM, Jardim T, Guimaraes T, Maria do Carmo FR, Pinto BC, Cavalcanti KMF, Pessoa C, Gatto CC, Nair DK, Namboothiri INN, Junior ENS (2015) Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. *Med Chem Comm* 6:120–130
- Guo L, Zhang H, Tian M, Tian Z, Xu Y, Yang Y, Peng H, Liu P, Liu Z (2018) Electronic effects on reactivity and anticancer activity by half-sandwich N,N-chelated iridium (III) complexes. *New J Chem* 42:1–22
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
- Hassan GS, El-Messery SM, Abbas A (2017) Synthesis and anticancer activity of new thiazolo[3,2-a]pyrimidines: DNA binding and molecular modeling study. *Bioorg Chem* 74:41–52
- Jardim GAM, Guimarães TT, Pinto MCFR, Cavalcanti BC, Farias KM, Pessoa C, Gatto CC, Nair DK, Namboothiri INN, Júnior ENS (2015) Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. *Med Chem Comm* 6:120–130
- Karaman İ, Gezegen H, Gürdere MB, Dingil A, Ceylan M (2010) Screening of biological activities of a series of chalcone derivatives against human pathogenic microorganisms. *Chem Biodivers* 7:400–408
- Karthikeyan CN, Moorthy SH, Ramasamy N, Vanam S, Manivannan U, Karunakaran ED, Trivedi P (2015) Advances in chalcones with anticancer activities. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 10:97–115
- Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G (2011) Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 10:221–237
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2008) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16:3–11
- Lindamulage IK, Vu H-Y, Karthikeyan C, Knockleby J, Lee Y-F, Trivedi P, Lee H (2017) Novel quinolone chalcones targeting colchicine-binding pocket kill multidrug-resistant cancer cells by inhibiting tubulin activity and MRP1 function. *Sci Rep* 7:1–5
- Martel-Franchet V, Keramidas M, Nurisso A, DeBonis S, Rome C, Coll JL, Ahcène B, Skoufias DA, Ronot X (2015) IPP51, a chalcone acting as a microtubule inhibitor with in vivo antitumor activity against bladder carcinoma. *Oncotarget* 6:14669–14686
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63

- Nazir S, Ansari FL, Hussain T, Mazhar K, Muazzam AG, Qasmi ZU, Makhmoor T, Noureen H, Mirza B (2013) Brine shrimp lethality assay 'an effective prescreen': microwave-assisted synthesis, BSL toxicity and 3DQSAR studies-based designing, docking and antitumor evaluation of potent chalcones. *Pharm Biol* 51:1091–1093
- Nowakowska Z (2007) A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem* 42:125–137
- Padaratz P, Fracasso M, De Campos-Buzzi F, Corrêa R, Niero R, Monache FD, Cechinel-Filho V (2009) Antinociceptive activity of a new benzofuranone derived from a chalcone. *Basic Clin Pharm Toxicol* 105:257–261
- Pereira UA, Moreira TA, Barbosa LCA, Maltha CRA, Bomfim IS, Maranhão SS, Moraes MO, Pessoa C, Barros-Nepomuceno FWA (2016) Rubrolide analogues and their derived lactams as potential anticancer agents. *Med Chem Comm* 7:345–352
- Prasad YR, Rani VJ, Rao AS (2013) In vitro antioxidant activity and scavenging effects of some synthesized 4'-aminochalcones. *Asian J Chem* 25:52–58
- Rossette MC, Moraes DC, Sacramento EK, Romano-Silva MA, Carvalho JL, Gomes DA, Caldas H, Friedman E, Bastos-Rodrigues L, De Marco L (2017) The in vitro and in vivo antiangiogenic effects of Flavokawain B. *Phytother Res* 31:1607–1613
- Santos MB, Pinhanelli VC, Garcia MAR, Silva G, Baek SJ, França SC, Fachim AL, Marins M, Regasini LO (2017) Antiproliferative and pro-apoptotic activities of 2- and 4-aminochalcones against tumor canine cells. *Eur J Med Chem* 138:884–889
- Shankaraiah N, Nekkanti S, Brahma UR, Praveen Kumar N, Deshpande N, Prasanna D, Senwar KR, Jaya Lakshmi U (2017) Synthesis of different heterocycles-linked chalcone conjugates as cytotoxic agents and tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg Med Chem* 25:4805–4816
- Zingales SK, Moore ME (2016) Design and Synthesis of (2-(furanyl) vinyl)-1-tetralone chalcones as anticancer agents. *Der Pharma Chem* 8:40–47
- Tristão TC, Campos-Buzzi F, Cruz RCB, Filho VC, Cruz AB (2012) Antimicrobial and cytotoxicity potential of acetamido, amino and nitrochalcones. *Arzneimittelforschung* 62:590–594

REFERÊNCIAS

ADAN, A.; ALIZADA, G.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y.; NALBANT, A. Flow cytometry: basic principles and applications. **Crit Rev Biotechnol.** v. 37, n. 2, p. 163-176, 2017.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALCARÁZ, L.E. *et al.* Antibacterial activity of flavonoids against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Theor. Biol.**, v. 205, n. 2, p. 231-240, 2000.

ALVAREZ, M. *et al.* Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. **Biocell.** v. 28, p.31-34, 2004.

ARCIUCH, V. G. A.; ELGUERO, M. E.; PODEROO, J. J.; CARREAS, M. C. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation. **Antioxidants & redox signaling.** v. 16, n. 10, 2012.

ASHRAF, R. *et al.* Coumarin-chalcone hybrid instigates DNA damage by minor groove binding and stabilizes p53 through post translational modifications. **Sci. Rep.** v. 7, p. 2017.

BAIG, S.; MOHAMAD, S. J.; MUKHEEM, A.; HURI, H. Z.; KAMARUL, T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? **Cell Death & Disease.** v. 7, e2058, 2016.

BANDGAR, B. P. *et al.* Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agentes. **Bioorg. Med. Chem.** v. 18, n. 3, p. 1364-1370, 2010.

BANDEIRA, P. N. *et al.* Synthesis, structural characterization, and cytotoxic evaluation of chalcone derivatives. **Med. Chem. Res.** v. 28, p. 2037-2049, 2019.

BEDARD, P. L. *et al.* Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. **Lancet.** v. 395, p. 1078-1088, 2020.

BIEBER, L. M. Química orgânica experimental: integração da teoria, experimento e análise. **Quim. Nova**, v. 22, n. 4, p. 605-610, 1999.

BROUGH, R. *et al.* Functional viability profiles of breast cancer. **Cancer Discovery**. v. 1, p. 260-273, 2011.

CALLISTE, C. A. *et al.* Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities. **Anticancer Res.**, v. 21, n. 6, p. 3949-3956, 2001.

CESARIN, D. S.; FERREIRA, J. N.; BRAZ, R. F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. **Quim. Nova**, v. 24, n.5, p. 604-611, 2001.

CHEN, G. *et al.* A natural chalcone induces apoptosis in lung cancer cells: 3D-QSAR, docking and an in vivo/vitro assay. **Sci. Rep.** v. 7, n. 1, 2017.

CHEN, X.; GU, J.; WU, Y.; LIANG, P.; SHEN, M.; XI, J.; QIN, J. Clinical characteristics of colorectal cancer patients and anti-neoplasm activity of genistein. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 124, 2020

CHERNOBROVKIN, A. L.; ZUBAREV, R. A. How well can morphology assess cell death modality? A proteomics study. **Cell Death Discovery**. v. 2, 2016.

COLE, A. L. *et al.* Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents. **Bioorg. Med. Chem.** v. 24, n. 12, p. 2768-2776, 2016.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chem. Rev.** v. 109, p. 3012-3043, 2009.

DAS, M.; MANNA, K. Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium: A Molecular Insight. **Journal of Toxicology**. v. 2016, 2016.

DI CESARE, E.; VERRICO, A.; MIELE, A.; *et al.* Mitotic cell death induction by targeting the mitotic spindle with tubulin-inhibitory indole derivative molecules. **Oncotarget**. v. 8, n. 12, p. 19738-19759, 2017.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**. v. 36, n. 3, 134-138, 2018.

DIMMOCK, J. R. *et al.* Bioactivities of chalcones. **Curr. Med. Chem.**, v. 6, p. 1125-1149, 1999.

DONG, N. *et al.* Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 105, p. 195-203, 2018.

DRUTOVIC, D. *et al.* Benzylidenetetralones, cyclic chalcone analogues, induce cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells. **Tumour Biol**. v. 35, n. 10, p. 9967-9975, 2014.

EDENHARDER, R.; RAUSCHER, R.; PLATT, K. L. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. **Mutat. Res.**, v. 379, n. 1, p. 21-32, 1997.

ESTIMATIVA 2020: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2021.

FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

Fleming, Gabriela Helena Rodrigues. **Avaliação molecular de genes da família das glutatonas S transferases em pacientes com câncer colorretal esporádico**. 2018. 96 f]. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto.

FERLAY, J. S. I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO,

M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017.

FERNANDES, G. M. M.; RUSSO, A.; PROENÇA, M. A.; Gazola NF, Rodrigues GH, Biselli-Chicote PM, et al. *CYP1A1*, *CYP2E1* and *EPHX1* polymorphisms in sporadic colorectal neoplasms. **World J Gastroenterol.** v. 22, p. 9974-9983, 2016.

FONSECA, B. F. et. al. Derricin and derricidin inhibit Wnt/ β -catenin signaling and suppress colon cancer cell growth in vitro. **PLoS One.** v. 10, n. 3, 2015.

FULDA, S. & DEBATIN, K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene.** v. 25, 4798-4811, 2006.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Nature.** v. 25, p. 486-541, 2018.

GONÇALVES, J. de O. **Comparação entre os resultados da expressão gênica da desmina, alfa-actina e TGF-beta1 obtidos a partir dos métodos da reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa e em tempo real (qRT-PCR) no modelo de ligadura.** 2014. Universidade de São Paulo, 2014.

GONZALES, F. J.; COUGHTRIE, M.; TUKEY, R. H. Metabolismo dos fármacos. In: **As bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman.** 12^aed. Rio de Janeiro: AMGH; 2012;135-136.

GORUKMEZ, O.; YAKUT, T.; GORUKMEZ, O.; TOPAK, A.; SAHINTURK, S.; KANAT, O. Glutathione S-transferase T1, M1 and P1 Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Colorectal Cancer in Turkey. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 17, p. 3855-3859, 2016.

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell.** v. 7, n. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 4, 2011.

HASSAN, G. S.; EL-MESSERY, S. M.; ABBAS, A. Synthesis and anticancer activity of new thiazolo[3,2-a]pyrimidines: DNA binding and molecular modeling study. **Bioorganic Chemistry**. v. 74, p. 41-52, 2017.

HATAGIMA A.; COSTA, E. C. B.; MARQUES, C. F. S.; KOIFMAN, R. J.; BOFFETTA, P.; KOIFMAN, S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A case- control study in Rio de Janeiro, Brazil. **Oral Oncol.** v. 44, p. 200-207, 2008.

HERENCIA, F. et al. Nitric Oxide-scavenging properties of some chalcones derivatives. **Nitric Oxide Biol. Chem.**, v. 6, n. 2, p. 242-246, 2002.

HSEU, Y. *et al.* The chalcone flavokawain B induces G2/M cell-cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells through the intracellular ROS generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway. **J Agric Food Chem.** v. 60, n. 9, p. 2385-2397, 2012.

HSIEH, H. K. et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 52, n. 2, p. 163-171, 2000.

HOELDER, S.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. **Molecular Oncology**. v. 6, p. 155-176, 2012.

INGHAM, M.; SCHWARTZ, G. K. Cell-cycle therapeutics come age. **Journal of Clinical Oncology**. v. 35, n. 25, p. 2949-2959, 2017.

INAMORI, Y. et al. Antibacterial activity of two chalcones, xantroangelol and 4 - hydroxydericin, isolated from the root of *Angelica keiskei* KOIDZUMI. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39, n. 6, p. 1604-1605, 1991.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. O que é câncer?. Acessado em: <http://www2.inca.gov.br/>. 2020.

ISHITSUKA, H. et al. Antipicornavirus flavone Ro 09-0179. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 22, n. 4, p. 611-616, 1982

IWATA, S. et al. Antitumorigenic activities of chalcones. I. Inhibitory effects of chalcone derivatives on ^{32}P i-incorporation into phospholipids of HeLa cells promoted by 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate (TPA). **Biol Pharm Bull.**, v. 18, n.12, p. 1710-1713, 1995.

JANDIAL, D. D. *et al.* Induction of G2M Arrest by Flavokawain A, a Kava Chalcone, Increases the Responsiveness of HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells to Herceptin. **Molecules.** v. 22, n. 3, 2017.

JEON, K. H. et. al. Synthesis and topoisomerases inhibitory activity of heteroaromatic chalcones. **Bioorg. Med. Chem.** v. 24, n. 22, p. 5921-5928, 2016.

JURCSAK, N. W.; ZAMINI, H. Employing NMR Spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4-substituted chalcones. **J. Chem. Ed.**, v.76, n.5, p. 653-654, 1999.

KANES, A. B.; KUMAR, V. Patologia Nutricional e Ambiental. In: ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Bases Patológicas das Doenças.** 7^aed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016;433-90.

KARTHIKEYAN, C.; NARAYANA, S. H.; MOORTHY, N.; RAMASAMY. S.; VANAM, U.; MANIVANNAN, E.; KARUNAGARAN, D.; TRIVEDI, P. Advances in Chalcones with Anticancer Activities. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, 2015, 10, 97-115.

KEUM, N.; GIOVANUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, p. 713-732, 2019.

KLUSEK, J.; GŁUSZEK, S.; KLUSEK, J. GST gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer development. **Contemp Oncol**. v. 18, p. 219-221, 2014.

KO, H. H. et al. Structure-activity relationship studies on chalcones derivatives, the potent inhibition of chemical mediators release. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, n. 1, p. 105-111, 2003.

KO, H. H. et al. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives: potent inhibition of platelet aggregation. **Pharm Pharmacol**, v. 56, p. 1333-1337, 2004.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**. v. 13, n. 6, p. 472-482, 2008.

KUETE, V. et. al. Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine**. v. 22, n. 12, p. 1096-1102, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia Básica**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2013.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 8, n. 7, p. 547-566, 2009.

LÉON-GONZALEZ, A. J. et. al. Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. **Curr. Med. Chem.**, v. 22, n. 30, p. 3407-3425, 2015.

LIANG, P. S.; CHEN, T. Y.; GIOVANUCCI, E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. **Int J Cancer**. v. 124, p. 2406-2415, 2009.

LIANG, Q.; CHIU, J.; CHEN, Y.; HUANG, Y.; HIGASHIMORI, A.; et al. Fecal bacteria act as novel biomarkers for non invasive diagnosis of colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 23, n. 8, 2017.

LINDAMULAGE K, VU H-Y, KARTHIKEYAN C, KNOCKLEBY J, LEE Y-F, TRIVEDI P, LEE H. Novel quinolone chalcones targeting colchicine-binding pocket kill multidrug-resistant cancer cells by inhibiting tubulin activity and MRP1 function. **Scientific Reports**. v. 7, 2017.

LUNARDI. et al. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 4, p. 1449-1451, 2003.

LUO J, SOLIMINI NL, ELLEDGE SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**. v. 136, n. 5, p. 823-837, 2009.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 98, p. 69-114, 2015.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**. v. 9, p. 153-166, 2009.

MARTEL-FRACHET, V.; KERAMIDAS, M.; NURISSO, A. *et al.* IPP51, a chalcone acting as a microtubule inhibitor with in vivo antitumor activity against bladder carcinoma. **Oncotarget**. v. 10, n. 6, p. 14669-14686, 2015.

MATEEVA, N. et. al. Functional evaluation of synthetic flavonoids and chalcones for potential antiviral and anticancer properties. **Bioorg. Med. Chem. Lett**. v. 27, n. 11, n. 2350-2356, 2017.

MENEZES, C. C. S.; FERREIRA, D. B. B.; FARO, F. B. A.; BOMFIM, M. S.; TRINDADE, L. M. D. F. Câncer colorretal na população brasileira: taxa de mortalidade no período de 2005-2015. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. v. 29, n. 2, p. 172-179. 2016.

MIELCKE, T. R. et. al. Mechanisms underlying the antiproliferative effects of a series of quinoxaline-derived chalcones. **Scientific Reports**. n. 7, 2017.

MODZELEWSKA, A. et. al. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v. 14, n. 10, p. 3491-3495, 2006.

MORENO-LONDOÑO, A. P. et. al. Isoliquiritigenin pretreatment attenuates cisplatin induced proximal tubular cells (LLC-PK1) death and enhances the toxicity induced by this drug in bladder cancer T24 cell line. **Food. Chem. Toxicol.** v. 109, p. 143-154, 2017.

MORI, M. *et al.* Identification of a novel chalcone derivative that inhibits Notch signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Scientific Reports**. v. 7, n. 2213, 2017.

MORIDIKIA, A.; MIRZAEI, H.; SHABKAR, A.; SALIMIAN, J. MicroRNAs: potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer. **Journal of Cellular Physiology**. v. 233, n. 2, p. 901-913, 2018.

MORISSEAU, C. et al. Mechanism of mammalian soluble epoxide hydrolase inhibition by chalcone oxide derivatives. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 356, n. 2, p. 214-228, 1998.

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

NATURE EDUCATION. Essentials of Cell Biology. Unit 5: How Do Cells Know When to Divide? Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122997629/>. Acessado em 22 de janeiro de 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMANN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1216-1238, 2004.

NG, H. L. et. al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Coupled Bioactive Scaffolds as Potential Anticancer Agents for Dual Targeting of Dihydrofolate Reductase and Thioredoxin Reductase. **J Med Chem**. v. 60, n. 5, p. 1734-1745, 2017.

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 8, p. 271-280, 2004.

OTTO, T. SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 17, p. 93-115, 2017.

PANDE, A. N. 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 J**. v. 16, p. 448-463, 2017.

PATHAK, A.; TANWAR, S.; KUMAR, V., BANARJEE, B. D. Present and Future Prospect of Small Molecule & Related Targeted Therapy Against Human Cancer. **Vivechan Int J Res**. v. 9, n. 1, p. 36-49, 2018.

PELUCCHI, C.; TRAMACERE, I.; BOFFETTA, P.; NEGRI, E. Alcohol consumption and cancer risk. **Nutr Cancer**. v. 63, p. 983-990, 2011.

PEREIRA, U. A.; MOREIRA, T. A.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; BOMFIM, I. S.; MARANHÃO, S. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; BARROS-NEPOMUCENO, F. W. A. Rubrolide analogues and their derived lactams as potential anticancer agents. **Med. Chem. Commun**. v. 7, p. 345–352, 2016.

PHRUTIVORAPONGKUL, A. et al. Studies on the Chemical Constituents of Stem Bark of *Millettialeucantha*: Isolation of New Chalcones with Cytotoxic, Anti-herpes Simplex Virus and Anti-inflammatory Activities. **Chem. Pharm. Bull.**, v.51, p. 187-190, 2003.

RAMIREZ-TAGLE, R. *et al.* Chalcone-Induced Apoptosis through Caspase-Dependent Intrinsic Pathways in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. **Int J Mol Sci.** v. 17, n. 2, 2016.

RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZEN G, Y. M. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorg Med. Chem.**, v. 15, p. 2679-2686, 2004.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, p. 1-13, 2003.

ROJAS, J. *et al.* The synthesis and effect of fluorinated chalcone derivatives on nitric oxide production. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 12, n. 15, p. 1951-1954, 2002.

SAIRAFIANPOUR, M. *et al.* Leishmanicidal and antiplasmodial activity of constituents of *Smirnowia iranica*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 12, p. 1754-1758, 2002.

SAYDAM, G. *et al.* Cytotoxic and inhibitory effects of 4, 4'-dihydroxy chalcones (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. **Leuk. Res.**, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2003.

SCHECTER, R. L. *et al.* Glutathione S-transferase in chemotherapy resistance and in carcinogenesis. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 70, n. 5, p. 349-343, 1992.

SCHWARTSMANN, G.; WORKMAN, P. Anticancer drug screening and discovery in the 1990s: a European perspective. **Eur. J. Cancer**, v. 29, p. 3-14, 1993.

SEMAAN, J. *et al.* Resistance to 3-HTMC-Induced Apoptosis Through Activation of PI3K/Akt, MEK/ERK, and p38/COX-2/PGE2 Pathways in Human HT-29 and HCT116 Colorectal Cancer Cells. **J Cell Biochem.** v. 117, n. 12, p. 2875-2885, 2016.

SENAPATI, S.; MAHANTA, A. K.; KUMAR, S.; MAITI, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 7, 2018.

SHANKARAI AH N, NEKKANTI S, BRAHMA U R, KUMAR N P, DESHPANDE N, PRASANNA D, SENWAR K R, LAKSHMI U J. Synthesis of diferente heterocycles-linked chalcone conjugates as cytotoxic agents and tubulin polymerization inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.**, v. 25, p. 4805-4816, 2017.

SHEN, K. H. et. al. Chalcone arrests cell cycle progression and induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor kappa B signalling in human bladder cancer cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.** v. 4, n. 101, p. 254-261, 2007.

SHI, Y. et. al. Isobavachalcone inhibits the proliferation and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells. **Oncol. Lett.** v. 14, n. 3, 2852-2858, 2017.

SHIN, S. Y. et. al. p53-dependent and -independent mechanisms are involved in (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(2-methoxynaphthalen-1-yl)prop-2-en-1-one (HMP)-induced apoptosis in HCT116 colon cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 479, n. 4., p. 913-919, 2016.

SHIBATA, S. Anti-tumorigenic chalcones. **Stem Cells**, v. 12, n. 1, p. 44-52, 1994.

Silva M & Errante PG. Câncer colorretal: Fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa.** v. 13, p. 133-140, 2016.

SILVA, G.; MARTINS, M.; FACHIN, A. L.; LEE, S.; BAEK, S. J. Anti-cancer activity of trans-chalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53. **Mol Carcinog.** v. 55, n. 10, p. 1438-1448, 2016.

SILVEIRA, M. N. **Avaliação do cálcio sérico como fator prognóstico em pacientes com câncer colorretal.** 2018. Tese de doutorado. Universidade de Campinas.

SIMON, K. Colorectal câncer development and advances in screening. **Clin Interv Aging.** v. 11, p. 967-976, 2016.

SVILAAS T, LEFRANDT JD, GIETEMA JA, KAMPHUISEN PW. Long-term arterial complications of chemotherapy in patients with cancer. **Thromb Res.** v. 140, p. 109-118, 2016.

Strachan T & Read A. **Genética Molecular Humana.** 4^a ed. Porto Alegre: Artmed;2013.

TANG, D. et. al. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research.** v. 29, 347-364, 2019.

TAKAC, P.; KELLO, M.; PILATOVA, M.; B.; KUDLICKOVA, Z.; VILKOVA, M.; SLEPICKOVA, P.; PETIK, P.; MOJZIS, J. New chalcone derivative exhibits antiproliferative potential by inducing G2/M cell cycle arrest, mitochondrial-mediated apoptosis and modulation of MAPK signalling pathway. **Chemico-Biological Interactions.** v. 292, p. 37-49, 2018.

TEFAS LR, SYLVESTER B, TOMUTA I, SESARMAN A, LICARETE E, BANCIU M, PORFIRE A. Development of antiproliferative long-circulating liposomes co-encapsulating doxorubicin and curcumin, through the use of a quality-by-design approach. **Drug Design, Development and Therapy** 2017;11 1605–1621.

THANIGAIMANI, K. et. al. A new chalcone structure of (E)-1-(4-Bromophenyl)-3-(naphthalen-2-yl)prop-2-en-1-one: Synthesis, structural characterizations, quantum chemical investigations and biological evaluations. **Spectrochim Acta A Mol BiomolSpectrosc.** v. 149, p. 90-102, 2015.

VAN DER ZANDEN, S. Y. LUIJSTRA, J.; NEEFJES, J.; BORST, J.; OVAA, H. Opportunities for small molecules in cancer immunotherapy. **Trends in Immunology.** v. 41, n. 6, p. 493-511, 2020.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation in basic and clinical sciences.** v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

VLAYKOVA, T.; GULUBOVA, M.; VLAYKOVA, D.; CIROVSKI, G.; YOVCHEV, Y.; DIMOV, D. et al. Possible Influence of GSTM1 and GSTT1 Null Genotype on the Risk for Development of Sporadic Colorectal Cancer. **Biotechnol Biotechnol Equip.** v. 23, p. 1084-1089, 2009.

VOGEL, S. et. al. Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. **Eur. J. Med. Chem.** v. 45, n. 6, p. 2206-2213, 2010.

WAGNER-DÖBLER, I.; BEIL, W.; LANG, S.; MEINERS, M.; LAATSCH, H. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 74, p. 207-238, 2002.

WU, L. T. et. al. Design, synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole-2-substituted phenyl or pyridine propyl ketene derivatives as antitumour agents. **Eur J Med Chem.** v. 114, p. 328-336, 2016.

WU, W. *et al.* Millepachine, a novel chalcone, induces G2/M arrest by inhibiting CDK1 activity and causing apoptosis via ROS-mitochondrial apoptotic pathway in human hepatocarcinoma cells in vitro and in vivo. **Carcinogenesis.** v. 34, n. 7, p. 1636-1643, 2013.

XU, Y.; WANG, G.; CHEN, Q.; LIN, T.; ZENG, Z.; LUO, Q.; LIU, J.; SUN, C. Intrinsic apoptotic pathway and G2/M cell cycle arrest involved in tubeimoside I-induced EC109 cell death. **Chinese Journal of Cancer Research.** v. 25, n. 3, p. 312-321, 2013.

XUE, W.; WARSHAWSK, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 206, p. 73-93, 2005.

YE, Z.; SONG, H.; HIGGINS, J. P.; PHAROAH, P.; DONESH, J. Five Glutathione transferase gene variant in 23, 452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. **Plos Med.** v. 7, n. 91, 2006.

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**. n. 7, 2017.

ZENGER, K. et. al. In vitro structure-toxicity relationship of chalcones in human hepatic stellate cells. **Toxicology**. v. 336, p. 25-33, 2015.

ZHANG, S. et. al. A novel chalcone derivative S17 induces apoptosis through ROS dependent DR5 up-regulation in gastric cancer cells. **Scientific Reports**. n. 7, 2017.

ZHU, H. et. al. Synthesis of Chalcone Derivatives: Inducing Apoptosis of HepG2 Cells via Regulating Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. **Frontiers in Pharmacology**. v. 10, n. 1341, 2019.