



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

MARISA PEREIRA DOS REIS

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DA TOXICIDADE DE 2'-
HIDROXICHALCONAS SINTÉTICAS**

FORTALEZA

2025

MARISA PEREIRA DOS REIS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN SILICO* E *IN VITRO* DE 2'-HIDROXICALCONAS
SINTÉTICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula
Pessoa Bezerra de Menezes
Coorientador: Me. Felipe Ramon Cunha da
Silva

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R311a Reis, Marisa Pereira dos.
Avaliação in silico e in vitro da toxicidade de 2'-hidroxichalconas sintéticas / Marisa Pereira dos Reis. –
2025.
71 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.
Coorientação: Prof. Me. Felipe Ramon Cunha da Silva.

1. Chalconas. 2. Citotoxicidade. 3. Toxicidade in silico. I. Título.

CDD 615

MARISA PEREIRA DOS REIS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE IN SILICO E IN VITRO DE 2'-HIDROXICALCONAS
SINTÉTICAS

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao
Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Aprovada em: 22/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Emanuel Paula Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Gracilene e Fernando, e à minha irmã, Beatriz, por todo apoio, motivação e amor, graças a vocês estou finalizando uma etapa importante da minha vida.

Aos meus gatos, Haroldo, Crystal e Kissakudim por encherem meu coração de amor, pela companhia durante às noites em claro e pelos vários "lambeijos" e cabeçadas.

Ao meu querido amigo Arthur, pelas ótimas risadas e longas conversas, por compartilhar momentos comigo e pela conexão especial que nós temos.

Ao meu amigo Magno, por estar ao meu lado durante todos esses anos, dividindo risadas e preocupações e pelo incentivo.

À minha amiga Mylenna, por sempre me ouvir, me compreender e pelas conversas intermináveis. Tive a sorte de te conhecer e espero que nossa amizade seja duradoura.

Ao meu orientador Ramon, pela orientação durante esse trabalho e ao longo da iniciação científica, e pela paciência. Te admiro muito, é um privilégio aprender com você.

Ao meu coorientador Felipe, pelo apoio, pela orientação e por ter caminhado comigo durante a execução deste trabalho.

À professora Alice, pelo acolhimento, pela generosidade, pelo cuidado e respeito que demonstra com seus alunos. Foi uma satisfação ter sido orientada por você e espero que possamos continuar trabalhando juntas.

Ao meu amigo Marcelo, pelo acolhimento no laboratório, por ter me ensinado a cultivar células, pela paciência e pelas boas risadas ao longo do caminho.

A todos do LBFBC e LABTOX, pelos momentos de descontração, pela ajuda, pelos ensinamentos, pelas tardes de bolo, dando risada e falando bobagens e por toda leveza que trazem ao dia a dia do laboratório. É um prazer fazer ciência com vocês.

À banca, pelas contribuições no trabalho.

À UFC e ao Curso de Farmácia, pelo ensino de qualidade e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

As chalconas constituem um grupo de moléculas bioativas com potencial terapêutico promissor. Sua estrutura simples e versátil está associada a diversas atividades biológicas, incluindo efeitos antimicrobianos, antiparasitários, anti-inflamatórios, antioxidantes e antitumorais. Essas propriedades se relacionam, em parte, ao seu sistema α,β -insaturado, capaz de interagir com alvos celulares. No entanto, essa mesma característica estrutural reforça a importância da avaliação do potencial toxicológico dessas moléculas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar toxicidade *in silico* e *in vitro* de uma série de 2'-hidroxichalconas sintéticas visando associar as modificações estruturais ao perfil de toxicidade dessas substâncias. Foram realizadas predições *in silico* dos parâmetros de toxicidade órgão-alvo, desfechos toxicológicos e interação com enzimas do citocromo P450 no servidor Protox 3.0. Ademais, foram realizados ensaios de viabilidade celular em linhagens LLC-MK2, HK2, RAW 264.7, astrócitos, BV2, PC12, L929 e IEC-6 por ensaio de MTT, nas concentrações de 3,9 a 250 μM . As predições *in silico* indicaram baixo risco para cardiotoxicidade e citotoxicidade, mas sugeriram possível imunotoxicidade para algumas moléculas e potencial inibição de enzimas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 e CYP2E1). Os resultados *in vitro* demonstraram que as chalconas 1A, 1C e 1D apresentaram maior toxicidade causando reduções expressivas na viabilidade celular das linhagens HK-2, RAW 264.7, astrócitos, BV2, PC12, L929 e IEC-6 entre as concentrações de 31,2 e 62,5 μM . Em contraste, as chalconas 2C e 3A demonstraram menor efeito citotóxico, com valores de CC_{50} superiores a 250 μM . Os dados obtidos ampliam o conhecimento sobre a relação entre estrutura e toxicidade das 2'-hidroxichalconas, contribuindo para estudos futuros sobre o seu potencial terapêutico e aplicação no desenvolvimento de novos protótipos farmacológicos.

Palavras-chave: chalconas; citotoxicidade; toxicidade *in silico*.

ABSTRACT

Chalcones constitute a group of bioactive molecules with promising therapeutic potential. Their simple and versatile structure is associated with diverse biological activities, including antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor effects. These properties are partly linked to their α,β -unsaturated system, which interacts with cellular targets. However, this same structural feature underscores the importance of evaluating their toxicological potential. In this context, this study aimed to assess the *in silico* and *in vitro* toxicity of a series of synthetic 2'-hydroxychalcones, seeking to associate structural modifications with their toxicity profiles of these substances. *In silico* predictions of organ-specific toxicity endpoints, adverse outcomes, and interactions with cytochrome P450 enzymes were performed using the ProTox 3.0 server. Additionally, cell viability assays were conducted on LLC-MK2, HK2, RAW 264.7, astrocytes, BV2, PC12, L929, and IEC-6 cell lines using the MTT assay, at concentrations ranging from 3.9 to 250 μM . The *in silico* predictions indicated a low risk of cardiotoxicity and cytotoxicity but suggested potential immunotoxicity for some compounds and possible inhibition of specific cytochrome P450 enzymes (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 and CYP2E1). The *in vitro* results showed that chalcones 1A, 1C, and 1D exhibited higher toxicity, causing significant reduction in cell viability in HK-2, RAW 264.7, astrocytes, BV-2, PC-12, L929 and IEC-6 cell lines at concentrations between 31.2 and 62.5 μM . In contrast, chalcones 2C and 3A showed lower cytotoxic effects, with CC_{50} values exceeding 250 μM . These findings advance the understanding of the structure-toxicity relationship of 2'-hydroxychalcones, contributing to future studies on their therapeutic potential and application in the development of novel pharmacological prototypes.

Keywords: chalcones; cytotoxicity; *in silico* toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação estrutural de chalconas.....	4
Figura 2 – Biossíntese de chalconas	6
Figura 3 – Reação de condensação de Claisen-Schmidt	7
Figura 4 – Fotomicrografia das linhagens celulares utilizadas.....	20
Figura 5 - Reação de redução do MTT.....	21
Figura 6 – Efeito das 2'-hidroxichalconas sobre a viabilidade celular das linhagens testadas .	29
Figura 7 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células LLC-MK2 após 24 horas de incubação.	45
Figura 8 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células HK-2 após 24 horas de incubação.....	46
Figura 9 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células L929 após 24 horas de incubação.....	47
Figura 10 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células IEC-6 após 24 horas de incubação.....	48
Figura 11 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células PC12 após 24 horas de incubação.....	49
Figura 12 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre Astrócitos após 24 horas de incubação.....	50
Figura 13 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células BV2 após 24 horas de incubação.....	51
Figura 14 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células RAW 264.7 após 24 horas de incubação.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de CC ₅₀ (μM) das 2'-hidroxichalconas nas linhagens testadas.....	31
Tabela 2 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem LLC-MK2 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).....	53
Tabela 3 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem HK2 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).....	54
Tabela 4 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem L929 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).....	55
Tabela 5 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem IEC-6 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).....	56
Tabela 6 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem PC12 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).....	57
Tabela 7 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem de Astrócitos tratada com as substâncias em estudo.....	58
Tabela 8 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem BV2 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração.	59
Tabela 9 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 tratada com as substâncias em estudo.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Representação das 2'-hidroxichalconas sintéticas testadas	16
Quadro 2 – Características gerais das linhagens celulares utilizadas	18
Quadro 3 – Predições de toxicidade aguda das 2'-hidroxichalconas	23
Quadro 4 – Predições de toxicidade órgão-alvo e de desfechos toxicológicos das 2'-hidroxichalconas	25
Quadro 5 – Predições de potencial de inibição das isoformas do citocromo P450 (CYP) pelas 2'-hidroxichalconas	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1 Chalconas	4
3.2 Biossíntese de chalconas naturais	5
3.3 Obtenção de chalconas sintéticas	6
3.4 Potencial terapêutico das chalconas	7
3.4.1 Efeito anticâncer	8
3.4.2 Efeito antimicrobiano	8
3.4.3 Efeito antiprotozoário	9
3.4.4 Efeito anti-inflamatório	10
3.4.5 Efeito antioxidante	10
3.5 Avaliação de citotoxicidade	11
4 METODOLOGIA	15
4.1 Substâncias em estudo e preparo das soluções de trabalho	15
4.2 Predição <i>in silico</i> da citotoxicidade	17
4.3 Ensaio <i>in vitro</i>	18
4.3.1 Cultivo e manutenção das células	18
4.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade	21
4.4 Análise estatística	22
5 RESULTADOS	23
5.1 Predição <i>in silico</i> da toxicidade	23
5.2 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	27
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A – GRÁFICOS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS CELULARES TRATADA COM AS 2'-HIDROXICHALCONAS	45
APÊNDICE B – TABELAS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS CELULARES TRATADA COM AS 2'-HIDROXICHALCONAS	53

1 INTRODUÇÃO

As chalconas são um grupo de moléculas de ocorrência natural caracterizadas pela estrutura química de 1,3-diaril-2-propen-1-ona com um sistema α,β -insaturado. Essas moléculas são encontradas em diversas espécies de plantas, como as do gênero *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* e *Scutellaria*, onde atuam como metabólitos secundários e precursoras da biossíntese de flavonoides, isoflavonas e de compostos heterocíclicos intermediários (Dhaliwal et al., 2022; Zhuang et al., 2017).

Por conta da estrutura simples e de fácil modificação, essas moléculas podem ser sintetizadas facilmente em laboratório pela reação de condensação de Claisen-Schmidt, que consiste na condensação de um benzaldeído com uma acetofenona na presença de um catalisador em meio ácido ou básico, na presença de um álcool (Amin et al., 2023; Gomes et al., 2017).

Os efeitos biológicos das chalconas descritos na literatura são amplos e despertam o interesse de grupos de pesquisa. Dentre as propriedades farmacológicas já descritas, pode-se citar as atividades tripanocida (Espinoza-Hicks et al., 2019; Magalhães et al., 2022), antileishmania (Borsari et al., 2017; Garcia et al., 2021), antifúngica (Cuartas et al., 2020), antibacteriana (Xu et al., 2019), antimalárica (Cuartas et al., 2020), neuroprotetora (Pérez-González et al., 2022) e antiproliferativa (Ouyang et al., 2021).

O amplo espectro de efeitos biológicos é atribuído à versatilidade estrutural da molécula, permitindo modificações e síntese de análogos de maneira rápida e simplificada (Magalhães et al., 2022). Assim, as chalconas possuem potencial como agentes terapêuticos em diversas áreas da saúde, com avanços na síntese de derivados, no desenvolvimento de novas rotas de síntese, a elucidação de mecanismos de ação e identificação de alvos terapêuticos, essas substâncias são promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos e terapias mais eficazes para tratamento de diversas doenças.

Tendo em vista o exposto, a realização de estudos de toxicidade é essencial no contexto de desenvolvimento de novos fármacos, para determinar se o uso de uma dada substância em certas condições é seguro para a saúde humana (Williams, 2007). Os ensaios de toxicidade *in vitro* são uma etapa essencial na avaliação da citotoxicidade de substâncias e fornecem informações importantes acerca da relação estrutura-atividade de um grupo de moléculas, permitindo a seleção de compostos mais seguros e a compreensão de como essas modificações interferem na citotoxicidade (McGonigle; Williams, 2014).

Dessa forma, este trabalho se propõe a ampliar o conhecimento científico acerca de uma série de chalconas, identificando como as modificações estruturais influenciam na toxicidade para elucidar condições seguras de uso.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial citotóxico de 2'-hidroxichalconas sintéticas *in silico* e *in vitro*, visando associar a relação estrutura-atividade em diferentes linhagens celulares.

2.2 Objetivos específicos

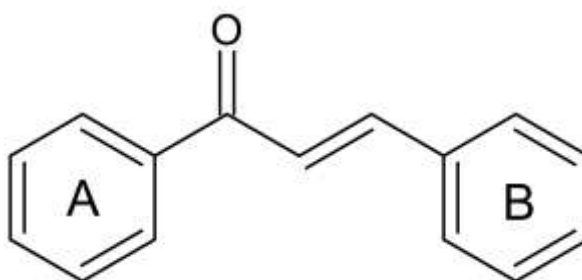
- Estimar a toxicidade *in silico* das substâncias em estudo.
- Determinar o efeito citotóxico das 2'-hidroxichalconas sintéticas sobre diferentes linhagens celulares.
- Estabelecer um estudo preliminar de relação estrutura-atividade acerca da citotoxicidade das 2'-hidroxichalconas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Chalconas

As chalconas são um grupo de moléculas caracterizadas pela estrutura de um grupo carbonila α,β -insaturado de três carbonos ligado a dois anéis aromáticos (A e B) (figura 1). O sistema 1,3-diaril-2-propen-1-ona pode existir como isômeros trans e cis, sendo o isômero trans o mais estável termodinamicamente e, em consequência disso, é a configuração em que as chalconas são encontradas predominantemente. A instabilidade do isômero cis se dá pelo forte efeito estérico entre o grupo carbonila e o anel aromático A (Dhaliwal et al., 2022; Gomes et al., 2017; Zhuang et al., 2017).

Figura 1 – Representação estrutural de chalconas.



Fonte: Adaptado de Zhuang et al., (2017).

Essas moléculas, com ampla diversidade estrutural, podem ser classificadas, em duas categorias: as chalconas simples (ou clássicas) e as chalconas híbridas, e em ambos os casos a estrutura 1,3-diaril-2-propen-1-ona é mantida. Existem também os derivados e estruturas relacionadas, como as bichalconas, que consistem em dois esqueletos chalcônicos na mesma estrutura; as dihidrochalconas, que possuem a ligação dupla α,β reduzida; mímicos de chalconas e chalconas fundidas, que não são chalconas tradicionais, mas possuem mantêm o sistema α,β -insaturado ou possuem anéis fusionados ao núcleo da chalcona, e são formadas em vias biossintéticas especiais (Zhuang et al., 2017).

As chalconas ocorrem naturalmente, podendo ser encontradas em diversas plantas como as do gênero *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* e *Scutellaria*, onde desempenham funções de metabólitos secundários como a atividade antioxidante, antimicrobiana e de defesa contra

insetos e animais. Além disso, são precursoras da biossíntese de flavonoides, isoflavonas e de compostos intermediários heterocíclicos (Dhaliwal et al., 2022).

Há um crescente interesse na obtenção e modificação de estruturas e na identificação de novas aplicações farmacêuticas das chalconas devido ao amplo espectro de efeitos biológicos descritos na literatura como atividade tripanocida (Espinoza-Hicks et al., 2019; Magalhães et al., 2022), antileishmania (Borsari et al., 2017; Garcia et al., 2021), antifúngica (Cuartas et al., 2020), antibacteriana (Xu et al., 2019), antimalárica (Cuartas et al., 2020), neuroprotetora (Pérez-González, 2022) e antiproliferativo (Ouyang et al., 2021).

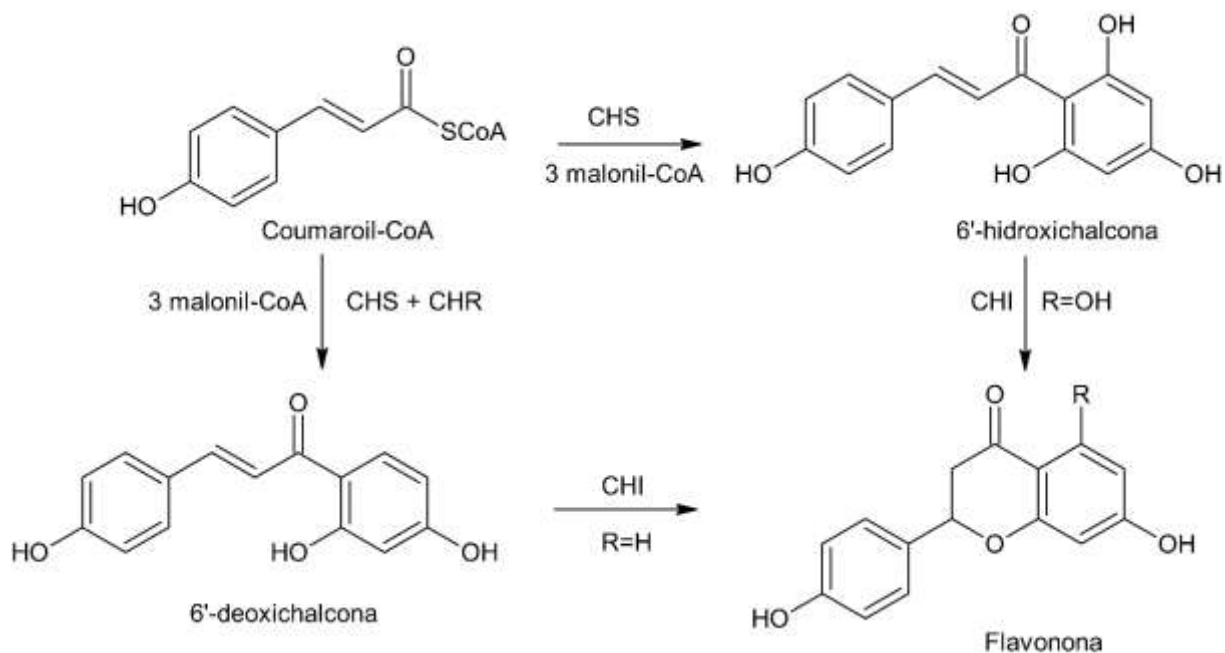
3.2 Biossíntese de chalconas naturais

A biossíntese das chalconas ocorre em plantas por meio de rotas enzimáticas específicas, envolvendo a via do ácido chiquímico e a via do acetato malonato. Na via do ácido chiquímico, a fenilalanina, após passar por três processos enzimáticos é transformada em coumaroil-CoA. E na via do acetato malonato ocorre a formação da malonil-CoA a partir da carboxilação de um acetyl-CoA (Rajendran et al., 2022; Rammohan et al., 2020).

Em seguida, a enzima chalcona sintase (CHS), uma policetídeo sintase do tipo III e principal enzima deste processo de biossíntese, realiza a condensação da coumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA formando um composto intermediário. Esse intermediário passa por um processo de ciclização que pode seguir de duas maneiras gerando dois produtos distintos. Em um, sofre ciclização por ação da CHS formando uma 6'-hidroxichalcona (naringenina). No outro, sofre redução e ciclização por ação das enzimas chalcona redutase (CHR) e chalcona sintase (CHS), formando uma 6'-deoxi chalcona (Rammohan et al., 2020; Rozmer e Perjési, 2016). Esse mecanismo está representado na figura 2.

As 6'-hidroxichalconas são os produtos gerados na maioria dos casos e são substratos de uma outra enzima, a chalcona isomerase (CHI), para síntese de vários tipos de flavonoides, isoflavonoides, antocianinas e outros compostos polifenólicos. As 6'-deoxi chalconas, por outro lado, são precursoras de 5-deoxi flavonoides e estão presentes principalmente em leguminosas (Rozmer e Perjési, 2016; Rudrapal, 2021).

Figura 2 – Biossíntese de chalconas



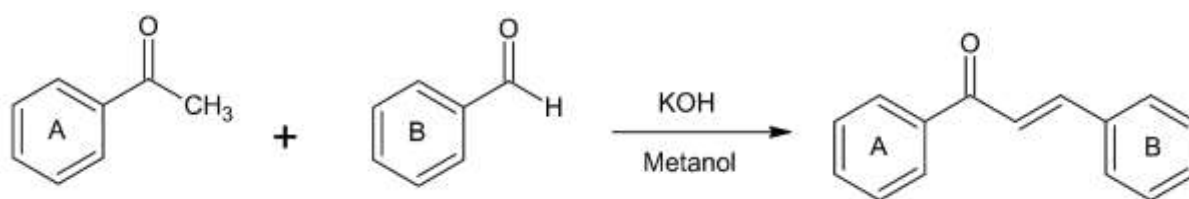
Fonte: Adaptado de Zhuang et al., (2017).

3.3 Obtenção de chalconas sintéticas

As chalconas podem ser facilmente sintetizadas em laboratório. O método mais utilizado é a reação de condensação de Claisen-Schmidt, uma reação bastante conhecida, simples de ser realizada e que permite a formação de uma ligação dupla carbono-carbono de maneira eficiente (Matos et al., 2015).

A reação de condensação de Claisen-Schmidt consiste na condensação de um benzaldeído com uma acetofenona na presença de um catalisador ácido ou básico em temperaturas que variam de 50 a 100 °C (figura 3). Apesar de ser uma reação bastante utilizada na síntese de chalconas, tem como desvantagens a baixa velocidade de reação que pode se estender por dias, formação de subprodutos indesejados, presença de reagente não consumido no produto final e o percentual de rendimento que pode variar muito (10 a quase 100%) a depender dos reagentes e catalisadores empregados (Amin et al., 2023; Gomes et al., 2017).

Figura 3 – Reação de condensação de Claisen-Schmidt



Fonte: Adaptado de Zhuang et al., (2017)

Normalmente, a síntese de chalconas ocorre em meio alcalino; a base promove a formação de um enolato, seguida de uma adição nucleofílica com formação de um produto aldólico por desidratação. Exemplos de catalisadores que podem ser utilizados nesta reação são o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH) dissolvidos em etanol ou metanol. A presença de um grupamento eletrofílico na cetona exige que a reação ocorra em refluxo sob altas temperaturas devido à dificuldade de desidratar o carbono α . Por outro lado, condições moderadas são suficientes quando a cetona possui grupamentos nucleofílicos (Rammohan et al., 2020; Zhuang et al., 2017).

Catalisadores ácidos também podem ser utilizados na síntese; o mecanismo é similar ao que ocorre em meio básico, porém com formação de um enol no início da reação. Exemplos de catalisadores utilizados são o ácido clorídrico (HCl), o tricloreto de alumínio (AlCl₃) e o etereato de trifluoreto de boro (BF₃-Et₂O) (Rammohan et al., 2020; Zhuang et al., 2017).

As reações de Claisen-Schmidt geralmente são realizadas em fase líquida, mas em alguns casos pode ser feita em fase sólida com o uso de uma resina para ligar a acetofenona e em seguida ser tratada com o benzaldeído, a liberação da chalcona formada na resina é feita com ácido trifluoroacético (Rammohan et al., 2020).

Apesar das chalconas serem facilmente sintetizadas por esse método, há um número crescente de novas rotas de síntese sendo desenvolvidas, uma vez que a estrutura dessas moléculas permite uma variedade de modificações, o que tem relação com o amplo espectro de propriedades biológicas descritos na literatura (Amin et al., 2023; Gomes et al., 2017).

3.4 Potencial terapêutico das chalconas

As chalconas têm sido extensivamente investigadas na química medicinal devido à sua ampla diversidade estrutural e à variedade de efeitos biológicos descritos na literatura. A versatilidade desse tipo de molécula é atribuída, em grande parte, à presença do sistema α,β -

insaturado de carbonila que atua como acceptor de Michael favorecendo a interação com biomoléculas em diferentes vias metabólicas. Diversos estudos relatam atividades anticancerígena, anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana, neuroprotetora, entre outras, evidenciando o potencial terapêutico dessas moléculas (Zhuang et al., 2017).

3.4.1 Efeito anticâncer

As chalconas têm se destacado na busca por novos agentes neoplásicos, a versatilidade da estrutura química permite a inclusão de grupos substituintes que favoreçam a interação com diferentes alvos celulares, contribuindo para efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos e de interferência em processos fundamentais para a sobrevivência de células tumorais. Estudos *in vitro* com chalconas sintéticas e naturais demonstram citotoxicidade contra diversas linhagens tumorais como HCT-116 (câncer colorretal), MCF-7 (câncer de mama), H460 (câncer de pulmão), K562 (leucemia), entre outras (Ouyang et al., 2021; Shalaby et al., 2023; Souza et al., 2024).

A atividade anticâncer das chalconas está associada a diversos mecanismos de ação. Dentre eles, destacam-se a inibição da degradação da proteína p53, a indução de estresse oxidativo, parada do ciclo celular, inibição da polimerização da tubulina, inibição da angiogênese e de canais MDR (Ouyang et al., 2021; Shalaby et al., 2023; Souza et al., 2024).

A modificação estrutural de hidroxichalconas com a inserção de grupos como cloro e flúor em posições específicas aumentou a eficácia citotóxica sob linhagens tumorais (Souza et al., 2024). Além disso, a estratégia de hibridização molecular com a incorporação de grupos farmacofóricos como artemisinina, azóis, cumarinas e indóis também tem sido explorada. Essas moléculas apresentaram efeitos contra diversas linhagens tumorais, incluindo àquelas resistentes a múltiplos fármacos (Ouyang et al., 2021).

3.4.2 Efeito antimicrobiano

A resistência bacteriana aos antibióticos tem instigado o interesse pelo desenvolvimento de novas moléculas com ação antibacteriana e as chalconas se destacam nesse cenário. Derivados sintéticos e naturais demonstraram atividade contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). A inserção de halogênios como flúor, cloro e bromo nas posições *orto* e *para* dos anéis aromáticos de chalconas tem sido

eficazes em aumentar a atividade antibacteriana. Há também estudos que apontam o efeito sinérgico de chalconas com outros antibióticos, sendo observado redução do MIC e aumento da capacidade de melhorar a eficácia de antibióticos contra bactérias multirresistentes (Shalaby et al., 2023; Xu et al., 2019).

Adicionalmente, a atividade antifúngica de chalconas tem sido investigada em espécies de fungos patogênicos, como *Candida sp.* e *Cryptococcus sp.* O composto natural isobavachalcona, isolado da planta *Maclura tinctoria*, demonstrou efeito fungicida contra esses microrganismos, sugerindo que a ação antifúngica está relacionada com a capacidade de chalconas de inibir a mitose por meio da interação com a tubulina, além de se ligar a grupos tióis (Rozmer e Perjési, 2016).

Além disso, chalconas também têm sido estudadas pelo potencial de inibir diversos estágios do ciclo de vida viral, como a entrada do vírus na célula, replicação do RNA e síntese de proteínas virais. Derivados naturais e sintéticos apresentaram atividade contra vários vírus humanos, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), herpes simplex (HSV), hepatite C (HCV), dengue, influenza e coronavírus (Shalaby et al., 2023).

3.4.3 Efeito antiprotozoário

A atividade anti-protozoária também tem sido estudada em derivados naturais e sintéticos de chalconas. A licochalcona A, isolada das raízes de *Glycyrrhiza spp.*, demonstrou efeito antileishmania e antimalária. A ação contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania major* e *L. donovani* envolveu inibição de enzimas como a desidrogenase mitocondrial e a fumarato redutase. O efeito em *Plasmodium falciparum* foi observado tanto em cepas suscetíveis como em cepas resistentes à cloroquina, o mecanismo foi associado com a inibição da ubiquinol citocromo C redutase e succinato ubiquinona redutase, que são complexos proteicos essenciais na cadeia respiratória mitocondrial (Rozmer e Perjési, 2016).

Similarmente, chalconas contendo substituintes preniloxi ou geraniloxi foram sintetizadas e avaliadas por Espinoza-Hicks et al. (2019) contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, o composto contendo o grupo preniloxi no anel B se destacou por demonstrar maior inibição metabólica e índice de seletividade superior aos fármacos benznidazol e nifurtimox, os únicos disponíveis atualmente para o tratamento da Doença de Chagas. Ademais, as *p*-aminochalconas sintetizadas por Gomes et al. (2023) foram capazes de reduzir o número de parasitos viáveis nas formas epimastigota e tripomastigota em estudos *in*

vitro; a ação tripanocida se deu por indução de danos à membrana do parasita e acúmulo de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas (ROS) e disfunção mitocondrial.

3.4.4 Efeito anti-inflamatório

Diversas chalconas naturais, como a naringenina, isoliquiritigenina e buteína demonstraram atividade anti-inflamatória significativa em modelos *in vitro*. Esses compostos foram capazes de inibir a expressão de enzimas pró-inflamatórias como a iNOS e a COX-2, além de reduzirem a expressão de óxido nítrico induzida por LPS e IFN- γ em linhagens celulares de macrófagos murinos (Rammohan et al., 2020).

O potencial anti-inflamatório também foi explorado em derivados sintéticos. A incorporação de sistemas heterocíclicos na estrutura da chalcona causou a inibição da expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 em células mononucleares do sangue periférico humano. E as polimetoxichalconas foram descritas pelo seu efeito anti-inflamatório inibindo a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) em queratinócitos humanos (Matos et al., 2015).

3.4.5 Efeito antioxidante

Os radicais livres produzidos em processos biológicos podem causar danos à biomoléculas essenciais como DNA, lipídios e proteínas, estando envolvidos na fisiopatologia de uma série de doenças degenerativas, inflamatórias e neoplásicas. Nesse contexto, o potencial modulador de chalconas naturais e sintéticas sobre alvos biológicos relacionados ao estresse oxidativo, como as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase, tem sido amplamente investigado. Diversos estudos demonstram o efeito antioxidante de chalconas como a dimetil cardamonina, a cardamonina, a isoliquiritina e a licochalcona A, nesses trabalhos foi demonstrado a capacidade dessas substâncias em aumentar a atividade e/ou expressão dessas enzimas (Martins et al., 2021).

Além da ação moduladora sob enzimas antioxidantes, diversas chalconas demonstraram capacidade de neutralizar espécies reativas, reforçando seu potencial antioxidante. Substâncias como as licochalconas B e D apresentaram atividade sequestradora de radicais livres pelo ensaio do DPPH. Outros estudos demonstram a capacidade chalconas naturais em inibir a peroxidação lipídica, induzida por agentes oxidantes como ferro e peróxido de tert-butila (Rozmer e Perjési, 2016).

3.5 Avaliação de citotoxicidade

A avaliação da toxicidade é uma etapa importante no desenvolvimento de novos medicamentos, pois permite identificar os potenciais efeitos tóxicos de uma determinada substância e conhecer suas condições seguras de uso. Dentro os parâmetros analisados, a citotoxicidade se destaca como um dos primeiros a serem investigados, especialmente em estudos *in vitro*, por fornecer informações iniciais sobre os efeitos de uma substância sobre a viabilidade e integridade celular. Esse tipo de análise possibilita a seleção de candidatos promissores e orienta as futuras modificações estruturais (Bácskay et al., 2017; Poteser, 2017).

Citotoxicidade refere-se à capacidade de uma substância induzir dano celular, provocando alterações em funções ou estruturas essenciais à manutenção da integridade e sobrevivência celular. Portanto, um composto é considerado citotóxico quando interfere em processos como adesão celular, reduz a taxa de viabilidade celular ou provoca alterações morfológicas (Méry et al., 2017; Vinken e Blaauboer, 2017).

Dentre os principais mecanismos de citotoxicidade destacam-se a destruição da membrana plasmática, comprometendo a integridade celular; a inibição da síntese de componentes celulares; a ligação irreversível a receptores, prejudicando a sinalização celular; a interferência do alongamento de poli-desoxinucleotídeos, impedindo a replicação do DNA; e a inibição de reações enzimáticas, afetando o metabolismo celular (Aslantürk, 2017).

Esses eventos podem resultar em morte celular, os mecanismos mais comuns são a necrose e a apoptose, porém não se restringem a uma única via. A manifestação desses efeitos depende das condições de exposição e dos mecanismos de citotoxicidade envolvidos (Méry et al., 2017; Niles et al., 2009).

Os ensaios de viabilidade celular e de citotoxicidade são métodos experimentais amplamente utilizados na pesquisa biomédica para avaliar os efeitos de substâncias em modelos celulares. Esses ensaios permitem mensurar o resultado dos efeitos tóxicos produzidos ao expor células a diferentes agentes, sendo os parâmetros avaliados derivados de células viáveis ou danificadas (Khalef et al., 2024; Poteser, 2017).

Esses ensaios são ferramentas importantes na triagem de substâncias com potencial terapêutico, na avaliação de toxicidade de novas moléculas e até mesmo na reavaliação de substâncias com um novo potencial de uso. Por serem rápidos de executar, possuírem uma boa reprodutibilidade, custos relativamente baixos e permitirem o estudo de fenômenos celulares de forma controlada, se tornam adequados para análise de muitas de amostras (Bácskay et al., 2017; Khalef et al., 2024).

Esses métodos se fundamentam em funções celulares como a integridade da membrana plasmática, atividade enzimática, adesão celular, produção de ATP, síntese de coenzimas, atividade metabólica e síntese de DNA. A escolha do método a ser empregado depende de fatores como custo, disponibilidade de equipamentos, tempo de execução, sensibilidade e objetivos específicos do estudo (Khalef et al., 2024).

Existem diferentes categorias de ensaios de viabilidade celular e toxicidade, podendo ser classificados em ensaios de exclusão por corantes (ex.: azul de tripan e vermelho do Congo), ensaios colorimétricos (ex.: MTT, LDH e NRU), ensaios fluorimétricos (ex.: Alamar Blue e CFDA-AM), ensaios luminométricos (ex.: detecção de ATP) e ensaios de citometria de fluxo (Kamiloğlu Beştepe et al., 2020).

Os ensaios de exclusão por corantes são os mais simples de serem executados e consistem na utilização de corantes vitais como azul de tripan, eosina e vermelho do Congo. Esses corantes são excluídos pelas células com membrana plasmática intacta e coram aquelas com a membrana plasmática comprometida. A visualização é feita em microscópio de luz e a quantificação na câmara de Neubauer. Apesar da simplicidade e rapidez, se tornam inviáveis quando o número de amostras a serem analisadas é grande. Além disso, pode ocorrer uma subestimação do dano celular quando o processo de morte celular não envolve desintegração da membrana (Aslantürk, 2017; Khalef et al., 2024).

Os métodos colorimétricos baseiam-se na avaliação da atividade metabólica celular por meio de reagentes que, ao serem reduzidos por enzimas, formam produtos coloridos que podem ser medidos por fotometria. Os sais de tetrazólio como o MTT, XTT, MTS, WST-1 e WST-8 exploram a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzir compostos de tetrazólio em produtos de formazan coloridos, cuja concentração é proporcional a quantidade de células viáveis (Kamiloğlu Beştepe et al., 2020).

Ensaio fluorimétrico, como o da resazurina e do CFDA-AM, são mais sensíveis que os métodos anteriores, além de serem relativamente baratos e possibilitarem a realização conjunta com outros métodos, como o de medição da atividade de caspases. A resazurina e o CFDA-AM são convertidos enzimaticamente em fluorocromos e o sinal fluorescente detectado é proporcional ao número de células viáveis (Aslantürk, 2017).

Nos ensaios luminométricos, um sinal luminoso é produzido quando a luciferina sofre ação da luciferase na presença de oxigênio gerando a oxiluciferina e luz. O sinal luminescente, detectado por um luminômetro, é proporcional à quantidade de ATP produzido pelas células, com isso a viabilidade celular pode ser medida (Khalef et al., 2024).

A citometria de fluxo é uma metodologia que permite a caracterização de células por tamanho, granularidade, apoptose/necrose, viabilidade, proliferação, dentre outros parâmetros funcionais e bioquímicos. Para isso, uma população celular é submetida a um fluxo hidrodinâmico de forma que cada célula seja individualmente incidida por um feixe de laser. A forma como a célula dispersa a luz e emite fluorescência, quando marcada com fluorocromos, permite a análise detalhada de suas características (Kamiloğlu Beştepe et al., 2020).

O uso de células em ensaios de viabilidade e citotoxicidade é fundamental na avaliação de substâncias em sistemas biológicos de forma controlada. As linhagens celulares utilizadas podem ser primárias ou secundárias. As linhagens celulares primárias são obtidas diretamente de tecidos por dissociação mecânica ou enzimática, elas possuem uma maior fidelidade às características fisiológicas das células *in vivo*, incluindo padrões de expressão gênica, metabolismo e morfologia, e por isso geram dados mais representativos. No entanto, são mais sensíveis às condições de cultivo e apresentam crescimento finito, o que limita seu uso em determinados experimentos (Bácskay et al., 2017; Gonçalves e Sobral, 2020).

As linhagens celulares secundárias (ou contínuas) passam por processo de imortalização que confere a elas uma alta capacidade proliferativa, permitindo sua manutenção em cultivo por tempo prolongado. Ambos os tipos de células podem ser adquiridos em bancos de células como o ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*), o ATCC (*American Type Culture Collection*) e o BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro), que garantem a autenticidade das linhagens (Bácskay et al., 2017; Gonçalves e Sobral, 2020)

A combinação de diferentes metodologias e uso de diferentes linhagens celulares contribui para uma avaliação mais abrangente e maior confiabilidade dos dados obtidos (Aslantürk, 2017).

De modo geral, a utilização dos ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade se demonstra vantajosa pelo baixo custo, fácil execução, potencial de automação, permitindo a análise simultânea de muitas de amostras. Além disso, dispensam o uso de animais, contribuindo para a redução do uso de modelos *in vivo* (Aslantürk, 2017).

Por outro lado, uma limitação importante é o fato de modelos celulares *in vitro* não reproduzirem com precisão a complexidade dos tecidos e órgãos. Isso ocorre porque carecem de mecanismos essenciais de certos processos metabólicos, reabsorção, toxicocinética e toxicodinâmica, comprometendo a extrapolação dos resultados para organismos completos. Dessa forma, embora os ensaios de viabilidade e citotoxicidade sejam úteis como indicadores do potencial tóxico de uma substância, seus resultados devem ser interpretados com cautela e,

quando necessário e/ou possível, complementados por outros modelos mais complexos (Poteser, 2017).

Apesar das limitações inerentes, a ampla variedade de ensaios *in vitro* disponíveis permite a detecção e análise de efeitos biológicos induzidos por substâncias de forma eficiente e controlada. E quando combinados com modelos animais e computacionais, é possível obter-se dados mais relevantes e precisos das relações dose-resposta em condições fisiológicas humanas (Poteser, 2017).

Com o avanço das ferramentas computacionais aplicadas à toxicologia, tornou-se possível prever os efeitos tóxicos de substâncias antes da realização de testes *in vitro*. Dessa forma, os métodos *in silico* vêm ganhando destaque na pesquisa científica como uma estratégia eficiente e acessível para análise, simulação, visualização e predição de toxicidade nos estágios iniciais do desenvolvimento de substâncias bioativas (Raies e Bajic, 2016).

Os métodos computacionais baseiam-se fundamentalmente na relação entre a estrutura química de uma substância e a sua atividade biológica e a partir disso, deriva-se o “princípio da similaridade molecular” que pode ser aplicado de diversas formas nas diferentes metodologias *in silico* (Hemmerich e Ecker, 2020).

Essas metodologias possuem uma aplicabilidade diversa incluindo a identificação de risco toxicológico para seres humanos e meio ambiente, otimização de compostos líderes, previsão de propriedades ADME/T (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) e desenho de moléculas de baixa toxicidade (Hemmerich e Ecker, 2020; Wang et al., 2015).

A integração dos métodos *in silico* e *in vitro* permitem que os dados obtidos nos testes *in vitro* sejam usados para treinamento e validação dos modelos *in silico*, enquanto que os resultados *in silico* orientam o design experimental e a interpretação de dados *in vitro*, acelerando o processo de descoberta e desenvolvimento de substâncias mais seguras (Rim, 2020).

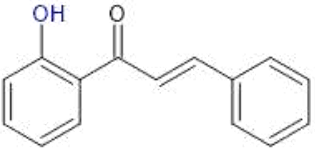
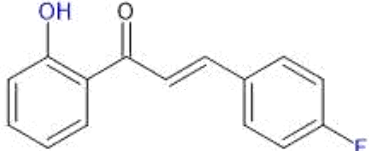
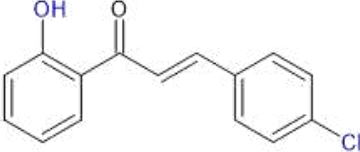
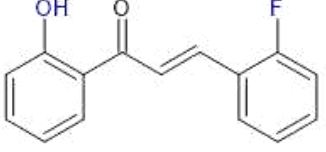
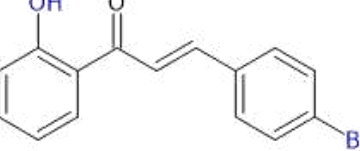
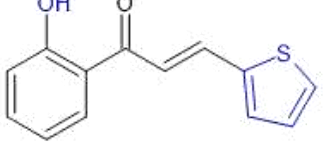
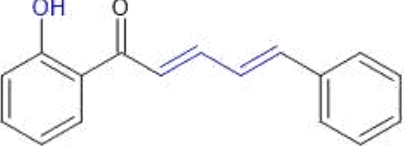
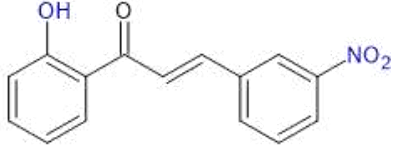
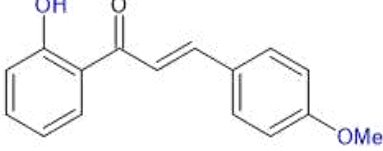
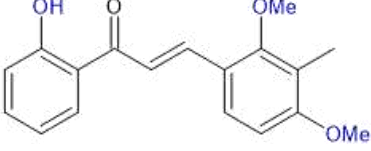
4 METODOLOGIA

4.1 Substâncias em estudo e preparo das soluções de trabalho

As chalconas utilizadas nesse trabalho foram sintetizadas e caracterizadas pelo Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (Ceará). Ao todo, foram testadas as 10 moléculas descritas no quadro 1.

Foram preparadas soluções-estoque (0,05 M) das chalconas em DMSO estéril. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição das soluções-estoque em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, pH 7,4, ou em meio de cultura, de forma que a concentração final de DMSO não exceda 0,5% nos experimentos.

Quadro 1 – Representação das 2'-hidroxichalconas sintéticas testadas

Sigla	Estrutura/Nome IUPAC	Sigla	Estrutura/Nome IUPAC
REF	 (2E)-1-(2-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	1A	 (2E)-3-(4-fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona
1C	 (2E)-3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	1D	 (2E)-3-(fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona
1E	 (2E)-3-(4-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	2B	 (2E)-1-(hidroxifenil)-3-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona
2C	 (2E, 4E)-1-(2-hidroxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona	3A	 (2E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
4A	 (2E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona	4B	 (2E)-3-(2,4-dimetoxi-3-metilfenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Predição *in silico* da citotoxicidade

A predição de parâmetros toxicológicos das 2'-hidroxichalconas foi realizada por meio da plataforma online Protox 3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/>), um servidor web gratuito desenvolvido para prever a toxicidade de substâncias com base em similaridade estrutural e modelos de aprendizado de máquina treinados com dados toxicológicos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Banerjee et al., 2024).

Para isso, foram obtidas as notações SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) das estruturas moleculares das chalconas avaliadas por meio do programa ChemSketch® (ACD/Labs). As notações SMILES foram inseridas no Protox 3.0 e os seguintes parâmetros para predição da toxicidade foram avaliados:

- Toxicidade aguda
- Hepatotoxicidade
- Nefrotoxicidade
- Neurotoxicidade
- Toxicidade respiratória
- Cardiotoxicidade
- Imunotoxicidade
- Citotoxicidade
- Potencial de inibição de enzimas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 e CYP2E1)

Cada predição foi apresentada como ativa ou inativa, acompanhada de um percentual de probabilidade que representa a confiança do modelo em relação à classificação atribuída (Banerjee et al., 2024).

O Protox 3.0 utiliza uma abordagem baseada na semelhança de fragmentos moleculares combinada a métodos estatísticos e algoritmos de aprendizado de máquina, permitindo a avaliação do potencial toxicológico de moléculas novas ou ainda não testadas experimentalmente. Os resultados obtidos foram utilizados como dados complementares para a comparação com os achados *in vitro*.

4.3 Ensaios *in vitro*

4.3.1 Cultivo e manutenção das células

A citotoxicidade das chalconas foi avaliada em células LLC-MK2, HK2, Astrócitos, IEC-6, RAW 264.7, L929, BV2 e PC12, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (figura 4). O quadro a seguir apresenta características gerais acerca de cada linhagem celular:

Quadro 2 – Características gerais das linhagens celulares utilizadas

Linhagem celular	Código (ATCC/BCRJ)	Tecido de origem	Meio de cultivo
LLC-MK2	BCRJ 0146	Tubulo proximal de rim de <i>Macaca mulata</i>	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , pH 7,4) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e antibióticos (penicilina - 200 UI/mL e estreptomicina - 130 mg/L)
HK-2	ATCC CRL-2190	Túbulo proximal de rim humano	
Astrócitos	ATCC CRL-2541	Cerebelo de camundongo da espécie <i>Mus musculus</i>	
IEC-6	BCRJ 0117	Intestino delgado de rato da espécie <i>Rattus norvegicus</i>	
RAW 264.7	BCRJ 0212	Macrófagos de <i>Mus musculus</i> (camundongo)	
L929	ATCC CCI-1	Tecido conjuntivo subcutâneo de rato da espécie <i>Rattus norvegicus</i>	DMEM low glucose pH 7,4 suplementado com 10% de SBF, antibióticos (penicilina - 200 UI/mL e estreptomicina - 130 mg/L)
BV-2	BCRJ 0356	Cérebro de camundongo da espécie <i>Mus musculus</i>	RPMI 1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , pH 7,4) suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos (penicilina - 200 UI/mL e estreptomicina - 130 mg/L)
PC-12	BCRJ 0203	Feocromocitoma de rato da espécie <i>Rattus norvegicus</i>	

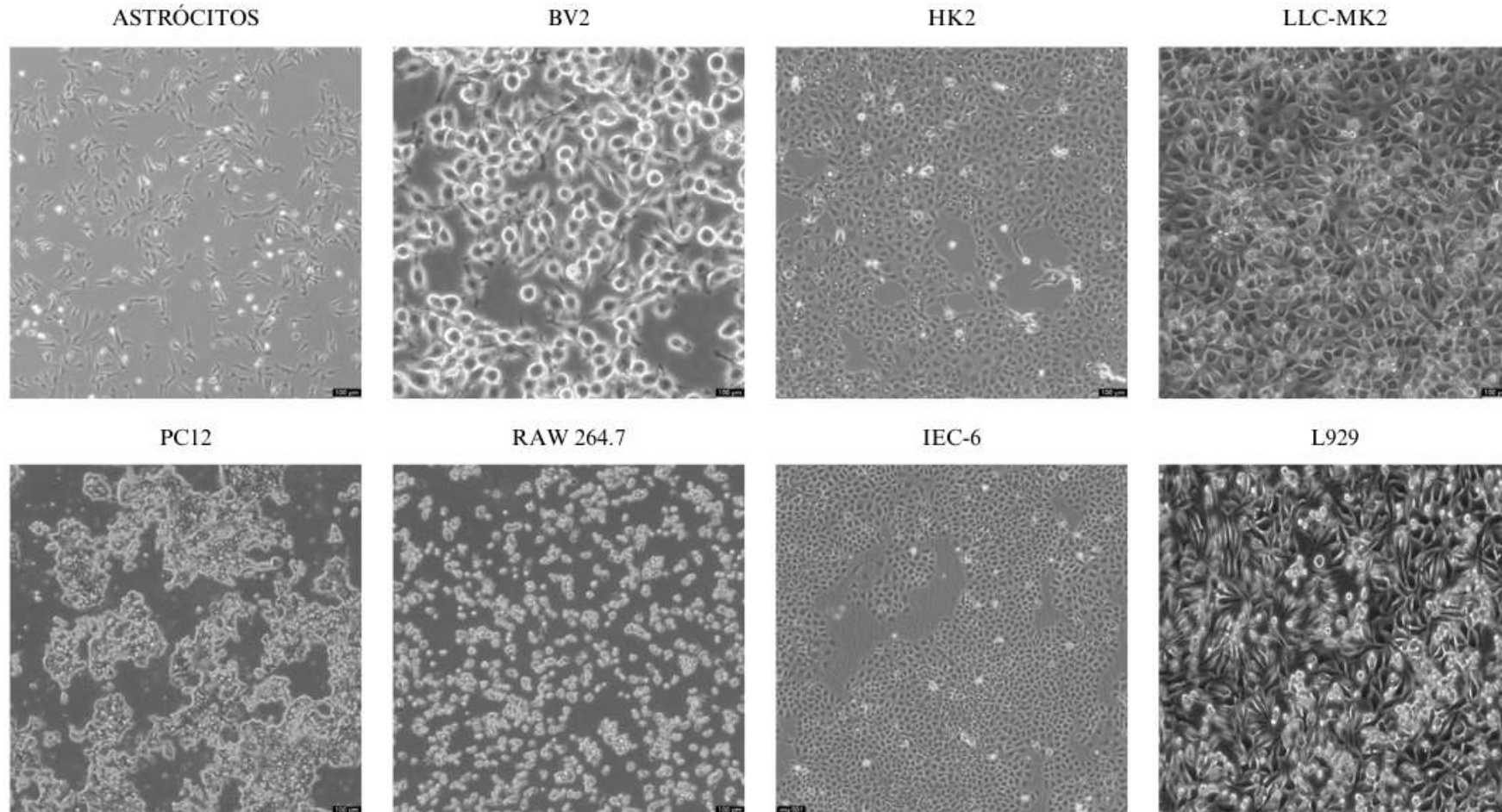
Fonte: Adaptado de Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Disponível em: <https://bcrlj.org.br/>. Acesso em 01 de agosto de 2025; adaptado de *American Type Culture Collection* (ATCC). Disponível em: <https://www.atcc.org/>. Acesso em 01 de julho de 2025.

Todas as células foram mantidas em ambiente a 37 °C e 5% de CO₂. O crescimento das células foi acompanhado diariamente através da observação por microscópio invertido. Ao atingirem a confluência as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, deslocadas com 1 mL de tripsina/EDTA (0,25%) por 5 a 15 minutos a 37 °C e inativadas com 2 mL de meio de cultura contendo SBF (meio completo).

As suspensões foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL do meio de cultura. A suspensão obtida foi usada para manutenção da cultura por meio da transferência de alíquotas para novas garrafas de cultivo; para

congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (em criotubos estéreis contendo solução com 95 % de SBF e 5 % de DMSO); ou ainda para realização de experimentos de avaliação de citotoxicidade *in vitro*.

Figura 4 – Fotomicrografia das linhagens celulares utilizadas

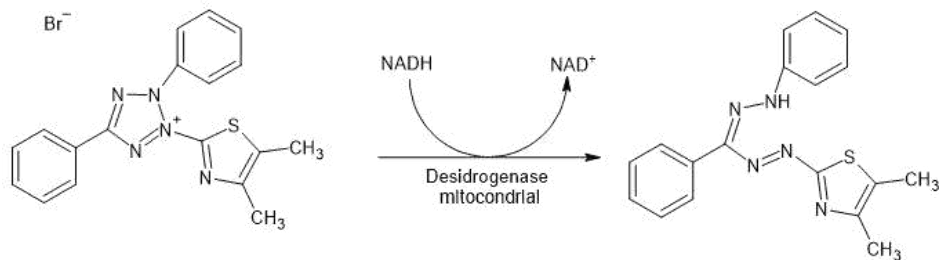


Fonte: Adaptado de Cytion. Disponível em: <https://www.cytion.com/>. Acesso em 01 de julho de 2025.

4.3.2 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade das chalconas foi feita pelo ensaio redução do MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) descrito por Mosmann (1983). O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarelada que, ao ser reduzido por enzimas desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em células viáveis, é convertido em um sal de formazan insolúvel de cor arroxeadada (figura 5). Os cristais de formazan produzidos são solubilizados por agentes surfactantes, como o DMSO (dimetilsulfóxido) e o SDS (dodecil sulfato de sódio). A quantidade de formazan gerada é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis e pode ser medida por leitura da absorbância em comprimento de onda de 570 nm.

Figura 5 - Reação de redução do MTT



Fonte: Adaptado de Bácskay et. Al. (2017)

A partir da suspensão de células, obtida conforme descrito anteriormente, foi determinada a concentração celular por contagem na câmara de Neubauer utilizando o corante vital Azul de Trypan. As células foram incubadas na concentração de 10^5 células/mL em placas de 96 poços estéreis (200 μ L/poço). Após a incubação *overnight* (37 °C, 5% de CO₂), foi realizado o tratamento com diferentes concentrações das chalconas. O grupo controle negativo correspondeu às células não tratadas e o branco, aos poços contendo somente meio de cultura. Além disso, um grupo de células foi tratado com DMSO 0,5% para avaliação da citotoxicidade do veículo usado para diluição das substâncias.

Decorridas as 24 horas de tratamento, o conteúdo dos poços foi removido e as células lavadas com 150 μ L de PBS. Em seguida, foram adicionados nos poços 100 μ L de MTT (0,25 mg/mL) e as placas foram incubadas (37 °C, 5% de CO₂) por 3 horas. Após a incubação, as placas foram centrifugadas nas especificações correspondentes de cada célula, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μ L de DMSO nos poços. As placas foram

mantidas em agitação por 30 minutos para solubilização dos cristais de formazan e, finalmente, submetidas à leitura fotométrica no comprimento de onda de 570 nm em leitora de microplacas.

A concentração de formazan produzido, medido por fotometria, é diretamente proporcional ao percentual de células viáveis (Mosmann, 1983), determinado pela equação abaixo.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_T - Abs_B}{Abs_{CT} - Abs_B} \times 100$$

Onde:

- Abs_T é a absorbância do grupo teste
- Abs_B é a absorbância do branco
- Abs_{CT} é a absorbância do grupo controle

O percentual de viabilidade celular foi utilizado para estimar, por regressão não-linear, a CC_{50} (concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular).

4.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, com $n = 3$. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, para aplicação de testes estatísticos paramétricos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), com análise estatística feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet e $p < 0,05$ como critério de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Predição *in silico* da toxicidade

As predições *in silico* da toxicidade aguda das 2'-hidroxichalconas, realizadas no Protox 3.0, estão apresentadas no quadro 3, com seus respectivos valores de dose letal média (DL₅₀) e classificação de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), além dos percentuais de probabilidade preditiva. Os valores de DL₅₀ variaram entre 1000 e 3600 mg/kg, categorizando as chalconas testadas na classe IV (DL₅₀ entre 300 e 2000 mg/kg) e classe V (DL₅₀ entre 2000 e 5000 mg/kg). As chalconas 2C, 4A e 4B apresentaram os menores valores de DL₅₀ (1000 mg/kg) com probabilidade preditiva de 63,81%, 79,87% e 80,99%, respectivamente. Enquanto que os maiores valores de DL₅₀ foram observados para as chalconas 1E (3600 mg/kg) e 2B (3600 mg/kg).

Quadro 3 – Predições de toxicidade aguda das 2'-hidroxichalconas

Substância	DL₅₀ predita	Probabilidade preditiva	Classe de toxicidade aguda
1A	1048 mg/kg	69,26%	Classe 4
1C	1048 mg/kg	69,26%	Classe 4
1D	1048 mg/kg	68,27%	Classe 4
1E	3600 mg/kg	69,26%	Classe 5
2B	3600 mg/kg	67,38%	Classe 5
2C	1000 mg/kg	63,81%	Classe 4
REF	1048 mg/kg	70,97%	Classe 4
3A	3000 mg/kg	70,69%	Classe 5
4A	1000 mg/kg	79,87%	Classe 4
4B	1000 mg/kg	80,99%	Classe 4

Fonte: Elaborada pela autora.

As predições toxicológicas *in silico* de toxicidade órgão-alvo, desfechos toxicológicos e potencial de inibição das enzimas do citocromo P450 estão apresentadas nos

quadros 3 e 4, de forma categórica (ativo/inativo) acompanhados dos respectivos percentuais de probabilidade preditiva, com destaque para os percentuais elevados ($\geq 70\%$):

As predições de cardiotoxicidade e citotoxicidade foram classificadas como inativas, acompanhadas de percentuais de probabilidade preditiva superiores a 70%, indicando maior confiabilidade dos resultados. Os demais resultados apresentaram baixos percentuais de probabilidade preditiva, em torno de 50%; a maioria das substâncias foi classificada como inativa para neurotoxicidade e toxicidade respiratória. Em relação à hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, os resultados variaram entre ativos e inativos, com probabilidade preditiva abaixo de 70%.

Em relação às predições de potencial de inibição de enzimas do citocromo P450 observou-se que a maioria das substâncias foram classificadas como ativa para as isoformas CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9, com probabilidades preditivas acima de 70%, indicando uma possível interferência metabólica nessas vias. Por outro lado, para as isoformas CYP3A4 e CYP2E1, as moléculas foram, em geral, classificadas como inativas, também com alta probabilidade preditiva. As exceções foram a substância 4B, classificada como ativa para ambas as isoformas, e a substância 2B, que apresentou potencial de inibição para a enzima CYP3A4. Com relação à isoforma CYP2D6, a maior parte das substâncias foi classificada como inativa, sendo que apenas 3A e 2B apresentaram probabilidade preditiva superior a 70%.

Quadro 4 – Predições de toxicidade órgão-alvo e de desfechos toxicológicos das 2'-hidroxichalconas

Substância	Hepatotoxicidade	Neurotoxicidade	Nefrotoxicidade	Toxicidade respiratória	Cardiotoxicidade	Citotoxicidade	Imunotoxicidade
1A	Inativo (55%)	Ativo (51%)	Ativo (52%)	Inativo (57%)	Inativo (75%)	Inativo (64%)	Ativo (90%)
1C	Ativo (55%)	Inativo (50%)	Ativo (52%)	Inativo (51%)	Inativo (64%)	Inativo (52%)	Ativo (84%)
1D	Ativo (55%)	Inativo (50%)	Ativo (52%)	Inativo (51%)	Inativo (64%)	Inativo (52%)	Ativo (65%)
1E	Ativo (55%)	Ativo (52%)	Ativo (52%)	Inativo (57%)	Inativo (60%)	Inativo (70%)	Ativo (89%)
3A	Ativo (57%)	Inativo (85%)	Inativo (52%)	Inativo (58%)	Inativo (79%)	Inativo (84%)	Ativo (93%)
REF	Inativo (55%)	Inativo (52%)	Inativo (56%)	Inativo (67%)	Inativo (72%)	Inativo (73%)	Ativo (52%)
2B	Ativo (56%)	Inativo (63%)	Inativo (52%)	Inativo (50%)	Inativo (73%)	Inativo (77%)	Inativo (86%)
2C	Inativo (55%)	Inativo (52%)	Inativo (56%)	Inativo (67%)	Inativo (72%)	Inativo (73%)	Ativo (73%)
4A	Inativo (52%)	Inativo (57%)	Ativo (56%)	Inativo (71%)	Inativo (83%)	Inativo (61%)	Ativo (95%)
4B	Inativo (52%)	Inativo (63%)	Ativo (56%)	Inativo (70%)	Inativo (83%)	Inativo (73%)	Ativo (97%)

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Predições *in silico* realizadas no Protox 3.0 com parâmetros “*Organ Toxicity*” (Toxicidade órgão-alvo) e “*Toxicity Endpoints*” (desfechos toxicológicos), para cada molécula avaliada. Resultados classificados como “ativos” com probabilidade preditiva $\geq 70\%$ estão destacados em vermelho. Resultados classificados como “inativos” com probabilidade preditiva $\geq 70\%$ estão destacados em verde.

Quadro 5 – Predições de potencial de inibição das isoformas do citocromo P450 (CYP) pelas 2'-hidroxichalconas

Substância	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	CYP2E1
1A	Ativo (75%)	Ativo (82%)	Ativo (93%)	Inativo (63%)	Inativo (84%)	Inativo (100%)
1C	Ativo (71%)	Ativo (82%)	Ativo (93%)	Inativo (66%)	Inativo (88%)	Inativo (100%)
1D	Ativo (75%)	Ativo (82%)	Ativo (93%)	Inativo (63%)	Inativo (84%)	Inativo (100%)
1E	Ativo (76%)	Ativo (83%)	Ativo (94%)	Inativo (60%)	Inativo (87%)	Inativo (100%)
3A	Inativo (55%)	Inativo (68%)	Ativo (68%)	Inativo (71%)	Inativo (57%)	Inativo (99%)
REF	Ativo (75%)	Ativo (70%)	Ativo (81%)	Inativo (68%)	Inativo (80%)	Inativo (100%)
2B	Inativo (54%)	Ativo (50%)	Ativo (72%)	Inativo (70%)	Inativo (78%)	Inativo (94%)
2C	Ativo (75%)	Ativo (70%)	Ativo (81%)	Inativo (68%)	Inativo (80%)	Inativo (100%)
4A	Ativo (83%)	Ativo (95%)	Ativo (68%)	Ativo (67%)	Inativo (84%)	Inativo (99%)
4B	Ativo (82%)	Ativo (62%)	Ativo (68%)	Ativo (51%)	Ativo (81%)	Ativo (100%)

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Predições *in silico* realizadas no Prottox 3.0 para avaliação do potencial de inibição das principais isoformas do citocromo P450. Resultados classificados como “ativos” com probabilidade preditiva $\geq 70\%$ estão destacados em vermelho. Resultados classificados como “inativos” com probabilidade preditiva $\geq 70\%$ estão destacados em verde.

5.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A avaliação de citotoxicidade das 2'-hidroxichalconas evidenciou diferenças no perfil de toxicidade das substâncias testadas, assim como variações relevantes na resposta das diferentes linhagens celulares. Os resultados de viabilidade nas diferentes concentrações utilizadas estão representados na figura 5, na seção de apêndice estão organizados os gráficos e tabelas de viabilidade celular para consulta mais detalhada.

A linhagem celular renal LLC-MK2 demonstrou menor suscetibilidade ao efeito citotóxico das 2'-hidroxichalconas avaliadas. Embora reduções significativas de viabilidade tenham sido observadas já nas menores concentrações, a diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração foi mais discreta em comparação às demais linhagens. Essa foi, inclusive, a única linhagem a manter percentuais de viabilidade superiores a 50% na maior concentração testada (250 μ M). Dentre as chalconas analisadas, 1E destacou-se como a mais citotóxica nessa linhagem, com viabilidade de 46,34% na concentração de 250 μ M enquanto 1C apresentou menor o efeito citotóxico com viabilidade de 73,46% na mesma concentração.

A linhagem celular renal HK2 apresentou sensibilidade moderada às 2'-hidroxichalconas, com citotoxicidade significativa sendo observada principalmente a partir de 125 μ M. As reduções de viabilidade foram mais acentuadas e ocorreu uma diminuição expressiva da viabilidade na concentração de 250 μ M, com valores inferiores a 30% para a maioria das moléculas. O efeito citotóxico mais pronunciado foi observado para as chalconas REF e 1D, que apresentaram nessa concentração, percentuais de viabilidade de 4,04% e 4,98%, respectivamente. Em contrapartida, as substâncias 2C e 3A apresentaram menor toxicidade na concentração mais elevada, mantendo percentuais de viabilidade celular entre de 70,15 e 73,86%, respectivamente.

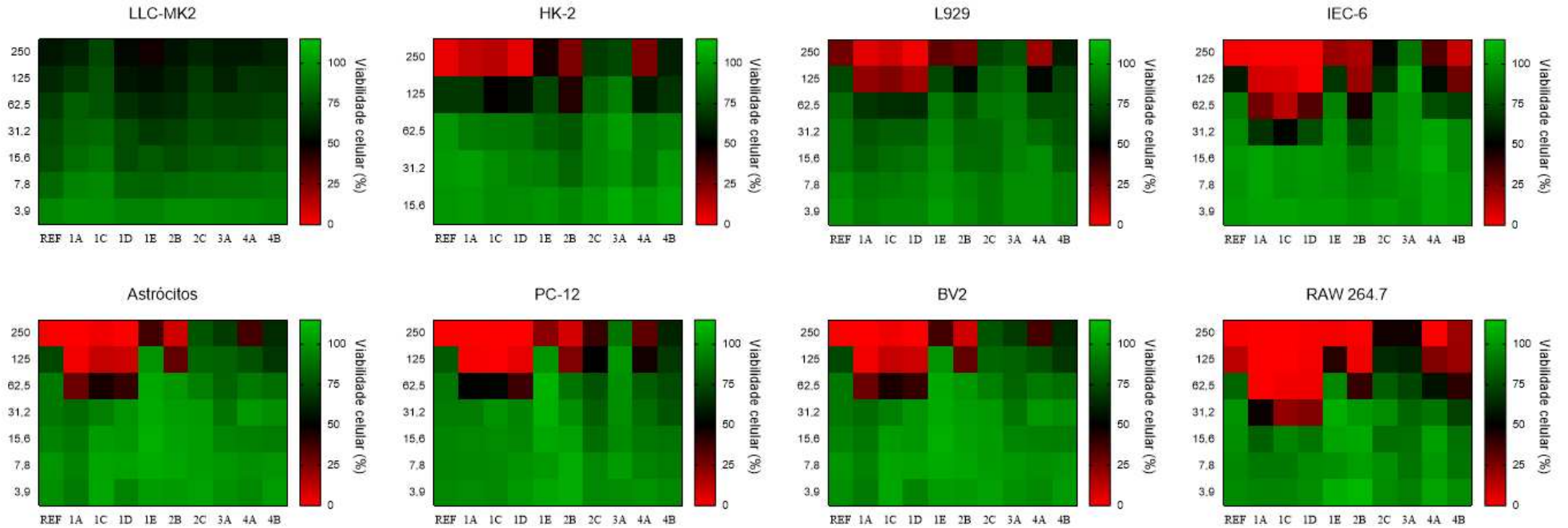
Também foi observado uma sensibilidade moderada nas linhagens L929, IEC-6, astrócitos, PC12 e BV2, com um aumento progressivo da suscetibilidade ao efeito citotóxico ao longo dessas linhagens, sendo as pré-neuronais e microgliais (PC12 e BV2) as mais sensíveis dentro desse grupo. Nessas células, as reduções significativas de viabilidade ocorreram predominantemente na faixa de 15,6 a 62,5 μ M e, ainda que as reduções de viabilidade tenham ocorrido de forma relativamente controlada, foram mais acentuadas em comparação à linhagem LLC-MK2, demonstrando o perfil de sensibilidade intermediário dessas linhagens.

A linhagem RAW 264.7 apresentou maior suscetibilidade aos efeitos citotóxicos das 2'-hidroxichalconas, com reduções expressivas na viabilidade celular. As chalconas 1A, 1C e 1D, destacaram-se pelo efeito citotóxico pronunciado, reduzindo a viabilidade para valores

inferiores a 3% na concentração 62,5 μM . E na concentração mais elevada, a maioria das substâncias apresentou viabilidade próxima de zero, com exceção das chalconas 2C e 3A, que mantiveram percentuais de 46%.

No geral, as chalconas 1A, 1C e 1D exerceram um efeito citotóxico mais pronunciado, com reduções acentuadas de viabilidade celular nas concentrações de 31,2 a 62,5 μM . Nessa faixa, a queda ocorreu de forma abrupta, e na maior concentração testada, os percentuais de viabilidade aproximaram-se de zero, evidenciando a maior toxicidade dessas moléculas frente às linhagens avaliadas. Em contraste, a maioria das linhagens manteve percentuais de viabilidade acima de 50% quando tratadas com 2C ou 3A, mesmo na concentração de 250 μM , indicando menor toxicidade dessas substâncias para as linhagens testadas.

Figura 6 – Efeito das 2'-hidroxichalconas sobre a viabilidade celular das linhagens testadas



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Heatmaps representando os percentuais de viabilidade celular obtidos para cada linhagem testada após exposição às 2'-hidroxichalconas testadas em diferentes concentrações (3,9 a 250 µM).

A citotoxicidade das 2'-hidroxichalconas também foi avaliada pelos valores CC_{50} (tabela 1), que indicam a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%. De modo geral, as chalconas halogenadas apresentaram os menores valores de CC_{50} , demonstrando maior capacidade de induzir reduções significativas na viabilidade celular. No entanto, para as linhagens LLC-MK2 e HK-2, ambas de origem renal, foram observados valores de CC_{50} moderados a elevados, o que sugere uma maior resistência dessas células aos efeitos citotóxicos desse grupo de moléculas.

A 2'-hidroxichalcona bromada 1E apresentou um comportamento distinto das demais chalconas halogenadas, com valores de CC_{50} consideravelmente mais elevados, variando entre de 105 e 229 μM , o que sugere que o tipo de substituinte influencia no efeito citotóxico exercido. Isso foi observado de forma mais evidente com a chalcona 3A, substituída com grupo nitro, e que demonstrou potencial citotóxico reduzido, apresentando valores de CC_{50} superiores a 250 μM em diversas linhagens celulares, indicando baixa toxicidade mesmo em altas concentrações.

Em relação às chalconas REF, 2B e 2C, observou-se que modificações estruturais como a substituição do anel aromático por um heterocíclico (anel tiofeno, em 2B) e a alongação da cadeia alifática (em 2C) resultaram em diferenças importantes no perfil de citotoxicidade, conforme demonstrado pelos valores de CC_{50} . E de maneira semelhante à chalcona 3A, a 2C também demonstrou potencial citotóxico reduzido, evidenciado pelos elevados valores de CC_{50} nas diferentes linhagens celulares.

Por fim, pode-se dizer que as chalconas 2B, REF, 4A e 4B apresentaram um perfil de citotoxicidade intermediário, tendendo a uma menor citotoxicidade em comparação ao grupo de chalconas halogenadas. Embora os resultados de CC_{50} e percentuais de viabilidade celular indiquem um efeito citotóxico mais pronunciado em relação às substâncias 3A e 2C, é possível sugerir um comportamento citotóxico mais próximo ao dessas moléculas, ainda que com diferenças perceptíveis.

Tabela 1 – Valores de CC₅₀ (μM) das 2'-hidroxichalconas nas linhagens testadas

	LLC-MK2	HK2	L929	IEC-6	Astrócitos	PC12	BV2	RAW 264.7
REF	192,50 ± 47,10	142,60 ± 9,60	174,8 ± 7,8	131,5 ± 7,8	144 ± 15,2	147,4 ± 24,6	96,4 ± 10,27	86,81 ± 8,37
1A	> 250	149,70 ± 8,30	70,88 ± 9,52	38,59 ± 1,72	44,11 ± 2,61	62,25 ± 3,85	44,76 ± 4,46	27,19 ± 2,45
1C	> 250	148,90 ± 17,20	74,88 ± 9,29	31,93 ± 1,42	78,48 ± 6,93	63,12 ± 2,6	41,78 ± 3,12	25,11 ± 2,06
1D	154,00 ± 39,70	141,20 ± 10,60	70,97 ± 5,74	46,49 ± 2,13	57,98 ± 4,1	56,52 ± 4,22	72,70 ± 8,26	24,58 ± 1,59
1E	125,30 ± 24,20	229,00 ± 35,20	179,0 ± 14,0	155,3 ± 11,1	237,2 ± 84,2	224,0 ± 165,41	105,4 ± 11,28	117,8 ± 6,9
3A	193,90 ± 35,50	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	197,7 ± 47,6	158,6 ± 46,0
2B	162,10 ± 33,90	162,90 ± 26,70	138,0 ± 14,0	58,38 ± 4,74	112,4 ± 14,55	126,6 ± 11,7	75,62 ± 5,38	60,41 ± 31,07
2C	250,10 ± 49,30	> 250	> 250	249,2 ± 37,8	> 250	151,9 ± 21,8	168,9 ± 15,8	173,9 ± 30,8
4A	216,80 ± 47,30	169,30 ± 24,00	120,4	132,8 ± 11,3	201,3 ± 27,6	124,9 ± 12,4	98,24 ± 4,84	72,66 ± 10,39
4B	249,60 ± 61,30	> 250	> 250	88,34 ± 5,84	> 250	> 250	86,23 ± 9,64	63,94 ± 7,71

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet.

6 DISCUSSÃO

Os resultados de preditivos de toxicidade aguda obtidas por meio da ferramenta Protox 3.0 indicaram valores de DL_{50} entre 1000 e 3600 mg/kg, classificando-as nas categorias IV e V do GHS. A toxicidade aguda refere-se aos efeitos adversos observados após uma única ou múltiplas exposições a uma substância em um curto período, sendo geralmente expressa pela DL_{50} , a quantidade estimada (em mg/kg) necessária para causar a morte em 50% dos indivíduos expostos (Ballabio et al., 2019). As categorias IV e V do GHS representam as faixas de menor toxicidade no critério de exposição por via oral, indicando que as chalconas testadas possuem baixo potencial de toxicidade aguda.

As predições para toxicidade órgão-alvo e desfechos toxicológicos revelaram que a maioria das chalconas foi classificada como inativa para cardiotoxicidade e citotoxicidade, sugerindo um baixo risco de indução de efeitos adversos cardíacos. Por outro lado, o modelo indicou potencial imunotoxicidade para diversas moléculas 1A, 1C, 3A e 2C. Esse resultado sugere que moléculas podem interagir com alvos do sistema imunológico, resultando em efeitos adversos de imunossupressão ou imunoestimulação (Schrey et al., 2017). De maneira complementar a essas predições, foi observada uma maior suscetibilidade da linhagem RAW 264.7 às chalconas testadas, com reduções acentuadas de viabilidade celular, demonstrando uma correspondência entre o perfil imunotóxico predito *in silico* e os efeitos *in vitro* observados. No entanto, é importante ressaltar a necessidade de realização de estudos experimentais adicionais para confirmar a relevância biológica desses dados.

Os demais parâmetros apresentaram valores preditivos inferiores a 70%, o que indica uma baixa confiabilidade das predições para essas moléculas. Isso pode estar relacionado à qualidade e abrangência da base de dados utilizada pelo modelo, que possivelmente contém poucas substâncias estruturalmente similares às chalconas avaliadas.

Em relação às predições do potencial de inibição das isoformas do citocromo P450 (CYP) pelas 2'-hidroxichalconas, a maioria dos resultados foram classificados como ativos para inibição das isoformas CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9 com probabilidade superior a 70%. A inibição dessas enzimas pode prejudicar a biotransformação ou a eliminação de medicamentos (e de outros xenobióticos) ocasionando aumento dos níveis plasmáticos e, conseqüentemente, comprometer a terapêutica e aumentar o risco de reações adversas (Zhao et al., 2021). Para a CYP2D6, somente as chalconas 3A e 2C foram classificadas como inativas e a maioria das chalconas foi classificada como inativa para inibição das isoformas CYP3A4 e CYP2E1, exceto pela 4B que foi classificada como ativa em ambos os casos.

As enzimas CYP450 representam o principal sistema enzimático envolvido na biotransformação de fármacos, sendo responsáveis por aproximadamente 75% do metabolismo de medicamentos. Além disso, essas enzimas também são responsáveis pela metabolização de diversas substâncias endógenas, incluindo esteroides, ácidos biliares, lipídeos insaturados, prostaglandinas e leucotrienos, desempenhando um papel importante na manutenção da homeostase. Considerando sua relevância, é desejável que novos candidatos a fármacos não atuem como inibidores das isoformas P450, a fim de evitar interações medicamentosas indesejadas, redução da eficácia terapêutica ou acúmulo de metabólitos tóxicos, contribuindo para um perfil de segurança mais favorável (Manikandan e Nagini, 2018; Zhao et al., 2021).

Em alguns casos, a inibição de enzimas do citocromo P450 pode ser explorada com fins terapêuticos. Um exemplo é o ritonavir, um inibidor de protease utilizado no tratamento da infecção por HIV, que também atua como inibidor da isoforma CYP3A4. Essa inibição é utilizada para aumentar a biodisponibilidade de outros antirretrovirais coadministrados, aumentando a eficácia terapêutica. No entanto, o uso concomitante do ritonavir com outros fármacos como estatinas, antiarrítmicos e antifúngicos requer precaução, devido ao risco de interações medicamentosas mediadas por essa via metabólica (Loos; Beijnen; Schinkel, 2022).

Os diversos efeitos biológicos atribuídos às chalconas estão relacionados à presença de um sistema carbonila α,β -insaturado, que as caracteriza como aceptores de Michael. Essa estrutura torna essas moléculas suscetíveis à reação de adição de Michael, que consiste na adição de um nucleófilo (doador de Michael) ao carbono β insaturado, em um processo catalisado por uma base. Em condições fisiológicas, os nucleófilos potenciais doadores de Michael incluem os tióis e aminas, os quais são encontrados principalmente em moléculas pequenas e nas proteínas (Liang et al., 2022).

A reatividade dos aceptores de Michael em reações de adição de Michael depende do seu padrão de substituição. Substituintes com forte efeito retirador de elétrons (via efeito indutivo e de ressonância) aumentam a eletrofilicidade do carbono β da insaturação, facilitando o ataque por nucleófilos. Essa reatividade favorece a formação de adutos com biomoléculas, como proteínas e enzimas, o que pode levar a alterações fisiológicas importantes. Essa interação com alvos biológicos é frequentemente considerada um “evento molecular iniciador” (*molecular initiating event*, MIE) para diversos desfechos toxicológicos, ao mesmo tempo que está relacionada ao potencial farmacológico dessas moléculas (Andrés et al., 2024; Enoch et al., 2011; Maydt et al., 2013).

A toxicidade acentuada observada para as 2'-hidroxichalconas halogenadas (1A, 1C e 1D) pode estar relacionada ao efeito retirador de elétrons dos seus substituintes, que

contribuem para o aumento da eletrofilicidade da molécula e, conseqüentemente, ao seu caráter de aceptor de Michael. No estudo de Kupcewicz et al., (2014), chalconas contendo halogênios no anel B, como cloro e bromo - e que, interessantemente, correspondem às chalconas 1C e 1E avaliadas no presente trabalho -, apresentaram elevada atividade citotóxica sobre as linhagens tumorais HL-60 (leucemia promielocítica humana) e NALM-6 (leucemia linfoblástica humana). Essa maior citotoxicidade foi associada a parâmetros eletrônicos como redução da energia do LUMO, aumento da eletrofilicidade (ω) e da maciez química (σ), obtidos por cálculo de DFT. Tais características propiciam a formação de adutos do tipo Michael com nucleófilos celulares, especialmente com resíduos de cisteína em proteínas, conforme foi proposto.

No entanto, discordâncias foram observadas entre os resultados experimentais não sendo concordantes com o que se espera em relação à eletronegatividade dos substituintes. As chalconas 1E (Br no C4 do anel B) e 3A (NO₂ no C3 do anel B), embora contenham grupos eletronegativos e tenham demonstrado elevada toxicidade no estudo de Kupcewicz et al., (2014.), apresentaram um perfil menos citotóxico nas linhagens utilizadas neste trabalho. Essa divergência pode estar relacionada ao tipo de linhagem utilizada e à suscetibilidade dessas linhagens à essas substâncias.

O estudo de Al-Rifai et al., (2013) traz resultados adicionais, ao avaliar uma série de chalconas α -substituídas por ensaio de reatividade química com cisteamina, um nucleófilo referência, e por ensaios *in vitro* em células de macrófagos murinos RAW 264.7. Dentre as substituições, estão grupos NO₂ e CN e os autores observaram que, apesar da alta reatividade dessas chalconas com a cisteamina, os efeitos citotóxicos na linhagem utilizada foram limitados.

Esses resultados demonstram que, embora os estudos *in chemico* e *in silico* ofereçam dados relevantes para a predição e compreensão dos efeitos biológicos observados, discordâncias entre as previsões e os resultados experimentais podem ocorrer. Essas divergências evidenciam que a resposta biológica de uma célula ou organismo é multifatorial, envolvendo outros aspectos como metabolismo, afinidade por alvos biológicos, permeabilidade celular, além da sensibilidade intrínseca de cada linhagem. Considerando essa complexidade, é notável a importância de se utilizar abordagens complementares para uma avaliação toxicológica abrangente e robusta.

Diversos estudos relatam os efeitos da halogenação em chalconas e exploram o seu potencial citotóxico. No trabalho de Burmaoglu et al., (2022), foi sintetizada uma série de chalconas fluoradas no anel B com o objetivo de avaliar sua atividade antitumoral. As moléculas que apresentaram um potente efeito antiproliferativo sobre a linhagem tumoral renal humana

A498, com valores de CC_{50} variando entre 0,030 e 0,274 μM , também apresentaram seletividade tumoral como foi observado pelos valores de CC_{50} para a linhagem normal renal HEK-293, que variaram entre 0,598 e 1,711 μM .

Em comparação a esses resultados, as chalconas 1A e 1D contendo átomos de flúor no anel B apresentaram CC_{50} superiores a 250 μM em LLC-MK2 e em torno de 150 μM em HK-2. Essas diferenças representam uma redução de mais de 500 vezes na citotoxicidade em relação aos compostos fluorados mais ativos avaliados por Burmaoglu et al., (2022). Essa diferença pode estar relacionada a fatores como diferenças estruturais entre as moléculas, especialmente em relação ao caráter e posição dos substitutos, além da natureza das linhagens celulares utilizadas.

Em um estudo conduzido por Barreto et al., (2025), foi avaliada a citotoxicidade de uma série de chalconas bromadas em fibroblastos L929. Foi relatado que, na concentração de 100 μM , a chalcona CH_8, contendo bromo na posição 3 do anel A, manteve viabilidade celular acima de 60%. Neste trabalho, a chalcona 1E, com bromo na posição 4 do anel B, apresentou viabilidade de 74% na concentração de 125 μM na mesma linhagem celular. Essa comparação aponta para a influência que a posição do átomo de bromo exerce na citotoxicidade de chalconas.

A 2'-hidroxichalcona 3A, contendo um grupo nitro na posição *meta* do anel B, apresentou uma baixa citotoxicidade em comparação às demais chalconas e, como mencionado anteriormente, esse resultado contrasta com a alta reatividade esperada para substituintes com esse grupo fortemente eletronegativo. No trabalho de Borlot et al., (2023), foram avaliadas chalconas nitro-substituídas e observou-se esse substituinte não necessariamente resultou em uma elevada toxicidade, evidenciado pelos valores de CC_{50} superiores aos análogos halogenados e hidroxilados para linhagem RAW 264.7.

A chalcona referência (REF) apresentou efeito citotóxico moderado, com valores de CC_{50} variando entre 86,81 e 192,50 μM . No estudo de Kupcewicz et al., (2014), os autores sugerem que chalconas com maior densidade eletrônica no anel A, especialmente aquelas contendo substituintes doadores de elétrons como hidroxilas e metoxilas, tendem a apresentar uma maior atividade citotóxica, sobretudo quando o anel B permanece sem substituições. Indicando que a posição da substituição e o caráter do substituinte interfere na densidade eletrônica da ligação C=C, influenciando o poder eletrofílico da chalcona. De fato, esse comportamento foi observado pelos autores, sobretudo nas chalconas di-hidroxiladas no anel A, que apresentaram atividade citotóxica comparável aos seus análogos halogenados e nitro-substituídos. Por outro lado, também se constatou uma toxicidade moderada da 2'-

hidroxichalcona nas linhagens tumorais testadas, em comparação às chalconas substituídas com grupos metoxila, cloro e nitro.

No estudo de Amslinger et al., (2013), a presença do grupo 2'-hidroxila no anel A foi associada a um aumento na reatividade química, medida pela taxa de reação com cisteamina ($k_2 = 5,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) em comparação à chalcona sem substituintes ($k_2 = 3,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Essa reatividade foi atribuída à capacidade do grupo hidroxila em formar uma ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila, favorecendo a ativação do sistema α,β -insaturado para reações do tipo adição de Michael com nucleófilos com grupos tiol. Este comportamento pode ser observado no trabalho de Mai et al., (2014), no qual a 2'-hidroxichalcona apresentou maior citotoxicidade em relação à chalcona não substituída em várias linhagens tumorais. Nesse estudo, os valores de CC_{50} da chalcona sem substituições variaram entre 70 e maior que 100 μM , sendo este último valor observado para a maioria das linhagens testadas. Por outro lado, a 2'-hidroxichalcona apresentou CC_{50} entre 18 e maior que 100 μM , com o valor superior a 100 μM ocorrendo em apenas uma linhagem, o que reforça a influência do grupo 2'-OH na citotoxicidade.

O efeito citotóxico reduzido observado na substância 2C pode estar relacionado ao alongamento da cadeia alifática, essa modificação possivelmente aumentou da conjugação do sistema α,β -insaturado, reduzindo a eletrofilicidade do carbono β e, conseqüentemente, a suscetibilidade da molécula a ataques nucleofílicos nessa posição. Um resultado semelhante foi reportado por Gomes et al., (2023), que observou um aumento de aproximadamente 13 vezes no valor de CC_{50} de uma *p*-aminochalcona com cadeia alifática alongada em comparação a sua análoga sem essa modificação.

Um resultado semelhante foi relatado por Ribeiro et al., (2024) que observou uma redução da toxicidade de quase seis vezes de uma chalcona com cadeia alifática alongada (CPNC) em relação à molécula estruturalmente análoga (chalcona 1) avaliada por Magalhães et al., (2022).

No estudo de Abu Bakar et al., (2018), a presença de grupos doadores de elétrons no anel B, como o substituinte metoxila, foi associada a um efeito citotóxico reduzido em uma série de derivados da chalcona natural FKB. Provavelmente por reduzir a eletrofilicidade do sistema α,β -insaturado e, dessa forma, a reatividade em reações de adição de Michael. Além disso, os resultados observados nas chalconas metoxiladas apontam que a posição e o padrão de substituição dos grupos metoxila no anel B influenciam na citotoxicidade dessas moléculas.

Em diferentes estudos analisados, foi possível observar que a presença de grupos metoxila na posição 2 do anel B esteve associada a valores mais elevados de CC_{50} , sugerindo

um menor efeito citotóxico. No trabalho de Abu Bakar et al., (2018), as chalconas com ao menos um grupo metoxila na posição 2 apresentaram CC_{50} entre 25 e > 30 μM , enquanto aquelas com substituições em outras posições apresentaram valores mais baixos (entre 8 e 9 μM). De forma semelhante, Romagna et al., (2024), relataram CC_{50} maior para chalconas mono ou dimetoxiladas na posição 2 em comparação à substituição exclusiva na posição 4, que apresentou maior toxicidade. Adicionalmente, os estudos de González et al., (2020) e de Mai et al., (2014) também destacam a influência da proximidade dos grupos metoxila no aumento da toxicidade dessas moléculas, possivelmente por efeitos estéricos que podem afetar a reatividade da molécula.

Em relação às 2'-hidroxichalconas, foi possível observar uma tendência que se assemelha parcialmente ao que foi observado nos estudos citados. A chalcona 4B, com grupos metoxila nas posições 2 e 4 e um grupo metila na posição 3, apresentou valores de CC_{50} superiores, na maioria das linhagens, à chalcona 4A, com grupo metoxila na posição 4. Isso sugere que a introdução do grupo metoxila na posição 2 contribuiu para um perfil menos tóxico, embora o efeito da proximidade dos substituintes não tenha reduzido a CC_{50} como foi observado em outros estudos. Essa diferença pode ter ocorrido pelo fato de a metila ter um tamanho menor que a metoxila. Esses resultados reforçam a participação da posição, tipo e proximidade dos substituintes na citotoxicidade observada.

A chalcona 2B, contendo um anel de tiofeno na posição correspondente ao anel B apresentou toxicidade intermediária no geral, sendo mais tóxica que a molécula referência na maioria das linhagens. Esse dado sugere que a introdução do tiofeno pode estar relacionada a um aumento da atividade citotóxica, ainda que de forma moderada. Esse tipo de modificação na estrutura de chalconas tem sido explorada especialmente em estudos sobre propriedades anticâncer, antimicrobiana, neuroprotetora. Nos trabalhos de Helmy et al., (2022), Ibrahim et al., (2024) e Zengin Kurt et al., (2025) foi demonstrado que a incorporação do tiofeno pode conferir maior atividade em células tumorais MCF-7, HepG2 e A549, com efeitos citotóxicos muito baixos em linhagens normais. No entanto, esse efeito antiproliferativo não foi observado nas cumarinas-chalconas híbridas com grupo tiofeno avaliadas por Badreddinn et al., (2023) em linhagens tumorais MCF-7, HepG2 e PC-3.

Em resumo, as 2'-hidroxichalconas avaliadas apresentaram perfis de toxicidade distintos, sendo possível correlacionar parte desse efeito aos grupos substituintes e alterações estruturais. As chalconas com átomos de flúor e cloro na sua estrutura demonstraram citotoxicidade mais acentuada, enquanto as substituições com átomos de bromo e grupo nitro foram associadas a uma menor toxicidade celular. Os resultados *in silico* forneceram

informações importantes acerca do potencial toxicológico dessas moléculas. Todavia é necessário considerar que os ensaios se limitaram a uma metodologia específica não abordando outros mecanismos de citotoxicidade. Portanto, é recomendável que estudos futuros explorem outras vias de dano celular e alvos farmacológicos a fim de complementar o conhecimento relativo à segurança e ao potencial terapêutico dessas moléculas.

7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos a partir das predições de toxicidade *in silico* foi possível concluir que a série 2'-hidroxichalconas sintéticas possuem um perfil preditivo de baixa toxicidade geral, especialmente em relação à cardiotoxicidade e citotoxicidade. No entanto, também possuem potencial para imunotoxicidade e inibição de enzimas do citocromo P450. Os dados da avaliação de toxicidade *in vitro* demonstraram que as chalconas halogenadas 1A, 1C e 1D exerceram maior efeito citotóxico sobre as linhagens testadas, indicando que a presença de átomos de flúor e cloro contribuiu para o aumento da reatividade dessas moléculas com alvos celulares resultando em dano celular acentuado. Em contrapartida, as modificações na cadeia alifática (2C) e nitro-substituições (3A) resultaram em menor citotoxicidade no geral.

O presente trabalho contribuiu para a compreensão da relação entre estrutura química e toxicidade dos derivados de 2'-hidroxichalconas. A combinação de métodos *in silico* e *in vitro* permitiu avaliar de forma mais integrada o potencial toxicológico dessas moléculas. Dessa forma, esses resultados poderão subsidiar pesquisas futuras envolvendo chalconas, tanto no estudo de efeitos biológicos, quanto no planejamento de derivados mais seguros com potencial terapêutico, servindo como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABU BAKAR, Addila *et al.* Design, Synthesis and Docking Studies of Flavokawain B Type Chalcones and Their Cytotoxic Effects on MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 616, 8 mar. 2018.
- AL-RIFAI, Nafisah; RÜCKER, Hannelore; AMSLINGER, Sabine. Opening or closing the lock? When reactivity is the key to biological activity. **Chemistry—A European Journal**, v. 19, n. 45, p. 15384–15395, 2013.
- AMIN, Mohamed M. *et al.* Recent Updates on Synthetic Strategies of Chalcone Scaffold and their Heterocyclic Derivatives. **Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 124–132, 2023.
- AMSLINGER, Sabine; AL-RIFAI, Nafisah; WINTER, Katrin; WÖRMANN, Kilian; SCHOLZ, Rebekka; BAUMEISTER, Paul; WILD, Martin. Reactivity assessment of chalcones by a kinetic thiol assay. *Org. Biomol. Chem.*, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 549–554, 2013.
- ANDRÉS, Celia María Curieses *et al.* Michael Acceptors as Anti-Cancer Compounds: Coincidence or Causality? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 6099, 1 jun. 2024.
- ASLANTÜRK, Özlem Sultan. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *In: Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World. [S.l.]*: IntechOpen, 2017.
- BÁCSKAY, Ildikó *et al.* Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development. *In: Cytotoxicity. [S.l.]*: IntechOpen, 2017.
- BADREDDIN MUSATAT, Ahmad; KILIÇCIOĞLU, İlker; KURMAN, Yener; DÜLGER, Görkem; ALPAY, Merve; YAĞCI, Ravza; ATAHAN, Alparslan; DURMUŞ, Sefa. Antimicrobial, Antiproliferative Effects and Docking Studies of Methoxy Group Enriched Coumarin-Chalcone Hybrids. *Chemistry & Biodiversity*, [s. l.], v. 20, n. 3, mar. 2023.
- BALLABIO, Davide *et al.* Integrated QSAR Models to Predict Acute Oral Systemic Toxicity. **Molecular Informatics**, v. 38, n. 8–9, p. 1800124, ago. 2019.
- BANERJEE, Priyanka *et al.* ProTox 3.0: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W513–W520, 5 jul. 2024.
- BARRETO, Tayssa S.A.; SANTOS, Tamiris A.C.; SILVA, Audrey R.S.T.; COSTA, Emmanoel V.; PINHEIRO, Liciane A.; FERNANDES, Roberta P.M.; SCHER, Ricardo; ALVES, Péricles B. Brominated chalcones as promising antileishmanial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, [s. l.], v. 116, p. 130042, fev. 2025.
- BORSARI, Chiara *et al.* Methoxylated 2'-hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 1129–1135, 2017.
- BORLOT, Jessica Rodrigues Pereira de Oliveira; SCHLITTLER, Luna dos Santos; SCHWARZT, Guilherme José Sampaio; SANTOS, Augusto Borges; RODRIGUES, Ricardo

Pereira; GONÇALVES, Rita de Cássia Ribeiro; BEZERRA, Reginaldo dos Santos; KITAGAWA, Rodrigo Rezende. Synthesis, Docking Studies and Evaluation of Chalcones as Anti-Helicobacter pylori and antitumoral Agents. *Chemistry & Biodiversity*, [s. l.], v. 20, n. 10, out. 2023.

BURMAOGLU, Serdar; AKTAS ANIL, Derya; GOBEK, Arzu; KILIC, Deryanur; YETKIN, Derya; DURAN, Nizami; ALGUL, Oztekin. Design, synthesis and antiproliferative activity evaluation of fluorine-containing chalcone derivatives. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 3525–3550, 2022.

DHALIWAL, Jagjit Singh *et al.* Pharmacotherapeutics applications and chemistry of chalcone derivatives. *Molecules*, v. 27, n. 20, p. 7062, 2022.

ENOCH, S. J. *et al.* A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent protein binding relevant to toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 41, n. 9, p. 783–802, out. 2011.

ESPINOZA-HICKS, José C. *et al.* Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: design, synthesis and evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 167, p. 402–413, 2019.

GARCIA, Andreza R. *et al.* Identification of chalcone derivatives as inhibitors of *Leishmania infantum* arginase and promising antileishmanial agents. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, p. 624678, 2021.

GOMES, Naiara Dutra Barroso; MAGALHÃES, Emanuel Paula; RIBEIRO, Lyanna Rodrigues; CAVALCANTE, John Washington; MAIA, Marcelo Morais Gomes; DA SILVA, Felipe Ramon Cunha; ALI, Arif; MARINHO, Márcia Machado; MARINHO, Emmanuel Silva; DOS SANTOS, Hécio Silva. Trypanocidal potential of synthetic p-aminochalcones: In silico and in vitro evaluation. *Bioorganic Chemistry*, [s. l.], v. 141, p. 106931, 2023.

GOMES, Marcelo N. *et al.* Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 22, n. 8, 25 jul. 2017.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos; SOBRAL, Marianna Vieira. Cultivo de células: da teoria à bancada. *Cultivo de células: da teoria à bancada*, 2020.

GONZÁLEZ, Luis A.; UPEGUI, Yulieth A.; RIVAS, Luis; ECHEVERRI, Fernando; ESCOBAR, Gustavo; ROBLEDO, Sara M.; QUIÑONES, Wiston. Effect of substituents in the A and B rings of chalcones on antiparasite activity. *Archiv der Pharmazie*, [s. l.], v. 353, n. 12, dez. 2020.

HELMY, Mirna T.; SROOR, Farid M.; MAHROUS, Karima F.; MAHMOUD, Khaled; HASSANEEN, Hamdi M.; SALEH, Fatma M.; ABDELHAMID, Ismail A.; MOHAMED TELEB, Mohamed A. Anticancer activity of novel 3-(furan-2-yl)pyrazolyl and 3-(thiophen-2-yl)pyrazolyl hybrid chalcones: Synthesis and in vitro studies. *Archiv der Pharmazie*, [s. l.], v. 355, n. 3, mar. 2022.

HEMMERICH, Jennifer; ECKER, Gerhard F. In silico toxicology: From structure–activity relationships towards deep learning and adverse outcome pathways. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, v. 10, n. 4, p. e1475, 2020.

IBRAHIM, Nada S.; SAYED, Hager Ahmed; SHARAKY, Marwa; DIAB, Hadeer M.;

ELWAHY, Ahmed H. M.; ABDELHAMID, Ismail A. Synthesis, cytotoxicity, anti-inflammatory, anti-metastatic and anti-oxidant activities of novel chalcones incorporating 2-phenoxy-N-arylacetamide and thiophene moieties: induction of apoptosis in MCF7 and HEP2 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, [s. l.], v. 397, n. 12, p. 10091–10107, dez. 2024.

KAMILOĞLU BEŞTEPE, Senem *et al.* Guidelines for cell viability assays. **FOOD FRONTIERS**, v. 1, n. 3, 2020.

KHALEF, Lefsih *et al.* Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. **Cell Biochemistry and Function**, v. 42, n. 3, p. e4007, abr. 2024.

KUPCEWICZ, Bogumiła; JARZEŃKI, Andrzej A.; MAŁECKA, Magdalena; KRAJEWSKA, Urszula; ROZALSKI, Marek. Cytotoxic activity of substituted chalcones in terms of molecular electronic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, [s. l.], v. 24, n. 17, p. 4260–4265, set. 2014.

LIANG, Song-Ting *et al.* Michael acceptor molecules in natural products and their mechanism of action. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 1033003, 2022.

LOOS, Nancy H. C.; BEIJNEN, Jos H.; SCHINKEL, Alfred H. The Mechanism-Based Inactivation of CYP3A4 by Ritonavir: What Mechanism? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9866, 30 ago. 2022.

MAGALHÃES, Emanuel Paula *et al.* Chloride substitution on 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenylchalcones improves in vitro selectivity on *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Chemico-Biological Interactions**, v. 361, p. 109920, 2022.

MAI, Chun Wai; YAEGHOABI, Marzieh; ABD-RAHMAN, Noorsaadah; KANG, Yew Beng; PICHKA, Mallikarjuna Rao. Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure–activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 77, p. 378–387, abr. 2014.

MANIKANDAN, Palrasu; NAGINI, Siddavaram. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 1, 5 jan. 2018.

MARTINS, Thaise; FONSECA, Bruno M.; REBELO, Irene. Antioxidant effects of chalcones during the inflammatory response: an overall review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 37, p. 7658–7713, 2021.

MATOS, Maria João *et al.* Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011 – 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 3, p. 351–366, 4 mar. 2015.

MAYDT, Daniela *et al.* Chemical reactivity and biological activity of chalcones and other α,β -unsaturated carbonyl compounds. **Xenobiotica**, v. 43, n. 8, p. 711–718, ago. 2013.

MCGONIGLE, Paul; WILLIAMS, M. Preclinical Pharmacology and Toxicology - Contributions to the Translational Interface. *In: Reference Module in Biomedical Sciences*. [S.l.: S.n.].

MÉRY, Benoite *et al.* In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. **Journal of Cell Death**, v. 10, p. 1179670717691251, 1 jan. 2017.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NILES, Andrew L.; MORAVEC, Richard A.; RISS, Terry L. In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. **Current Chemical Genomics**, v. 3, p. 33–41, 11 jun. 2009.

OUYANG, Yang *et al.* Chalcone derivatives: role in anticancer therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 894, 2021.

PÉREZ-GONZÁLEZ, Adriana *et al.* Chalcone derivatives with a high potential as multifunctional antioxidant neuroprotectors. **ACS omega**, v. 7, n. 43, p. 38254–38268, 2022.

POTESER, Michael. Cell-based in vitro models in environmental toxicology: a review. **Biomonitoring**, v. 4, n. 1, 26 out. 2017.

RAIES, Arwa B.; BAJIC, Vladimir B. *In silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 6, n. 2, p. 147–172, mar. 2016.

RAJENDRAN, Gayathri *et al.* Chalcone: a promising bioactive scaffold in medicinal chemistry. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 10, p. 1250, 2022.

RAMMOHAN, Aluru *et al.* Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 2, p. 433–458, mar. 2020.

RIBEIRO, Lyanna Rodrigues; MAGALHÃES, Emanuel Paula; BARROSO GOMES, Naiara Dutra; CAVALCANTE, John Washington; GOMES MAIA, Marcelo Moraes; MARINHO, Márcia Machado; DOS SANTOS, Hércio Silva; MARINHO, Emmanuel Silva; SAMPAIO, Tiago Lima; COSTA MARTINS, Alice Maria; PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES, Ramon Róseo. Elongation on Aliphatic Chain Improves Selectivity of 2-Hydroxy-3,4,6-Trimethoxyphenyl Chalcone on *Trypanosoma Cruzi*. *Future Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 11–26, jan. 2024.

RIM, Kyung-Taek. In silico prediction of toxicity and its applications for chemicals at work. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 12, n. 3, p. 191–202, set. 2020.

ROMAGNA, Rodrigo de Almeida; DOS SANTOS, Reginaldo Bezerra; GONÇALVES, Rita de Cássia Ribeiro; KITAGAWA, Rodrigo Rezende. Synthesis of Chalcones, Screening In silico and In vitro and Evaluation of *Helicobacter pylori* Adhesion by Molecular Docking. *Current Pharmaceutical Design*, [s. l.], v. 30, n. 42, p. 3350–3366, dez. 2024.

ROZMER, Zsuzsanna; PERJÉSI, Pál. Naturally occurring chalcones and their biological activities. **Phytochemistry reviews**, v. 15, p. 87–120, 2016.

RUDRAPAL, Mithun *et al.* Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 23, 26 nov. 2021.

SCHREY, Anna K. *et al.* Computational prediction of immune cell cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 150–166, set. 2017.

SHALABY, Mona A.; RIZK, Sameh A.; FAHIM, Asmaa M. Synthesis, reactions and application of chalcones: A systematic review. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 21, n. 26, p. 5317–5346, 2023.

SOUZA, Jéssica Maria Teles *et al.* Uncovering the Potential of Chalcone-Sulfonamide Hybrids: A Systematic Review on Their Anticancer Activity and Mechanisms of Action. **Cell Biochemistry and Function**, v. 42, n. 7, p. e70001, 2024.

UNITED NATIONS (Org.). **Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)**. Tenth revised edition. New York and Geneva: United Nations, 2023.

VINKEN, Mathieu; BLAAUBOER, Bas J. In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. **Toxicology in vitro**, v. 39, p. 104–110, 2017.

WANG, Yulan *et al.* *In silico*ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 48, n. 4, p. 488–515, nov. 2015.

WILLIAMS, Michael. Preclinical Pharmacology and Toxicology. *In*: ENNA, S. J.; BYLUND, David B. (Orgs.). **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. New York: Elsevier, 2007. p. 1–5.

XU, Man *et al.* Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, p. 103133, 2019.

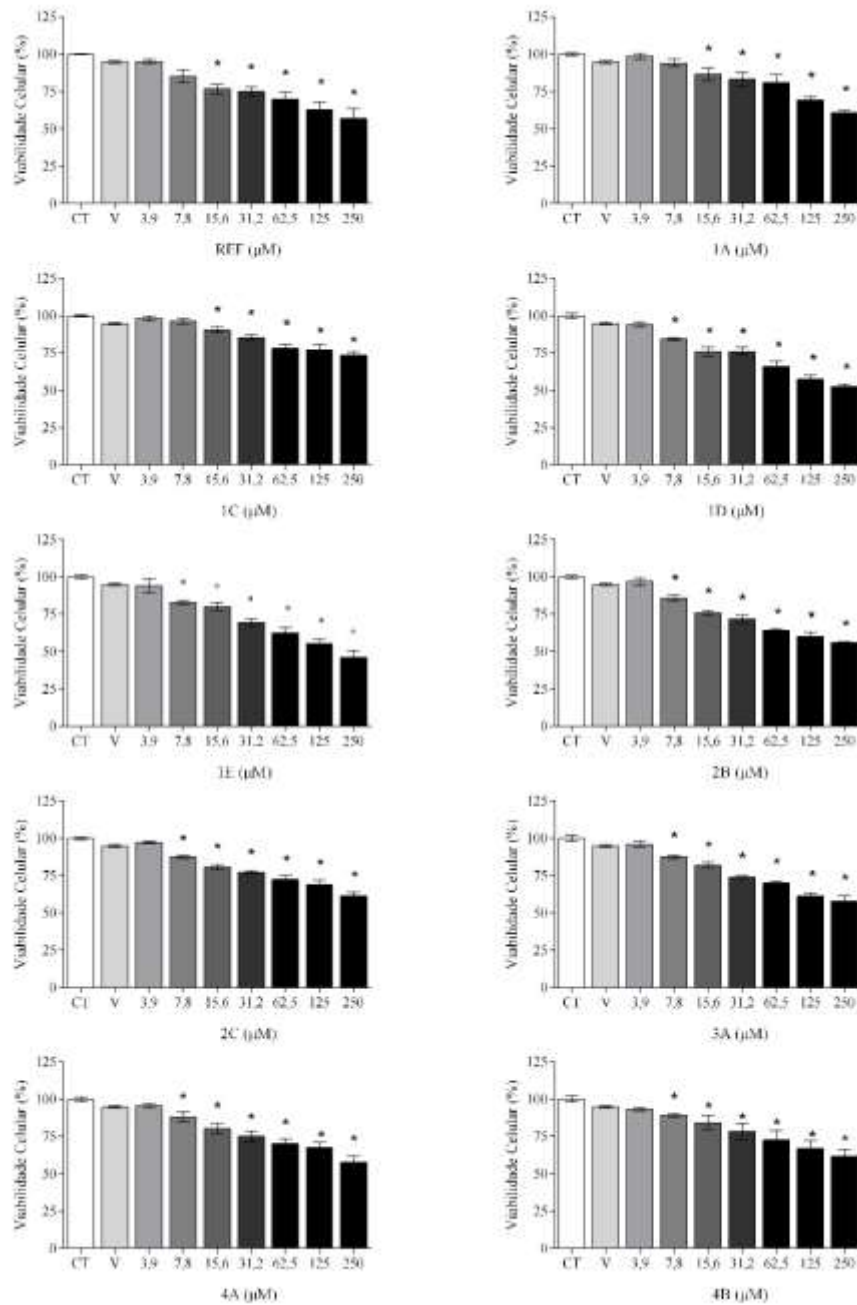
ZENGİN KURT, Belma; ÖZTÜRK CİVELEK, Dilek; ŞAHİN BEKTAY, Hümeýra; ÖZBİLGE ULUEREN, Ayşegül; KOLCUOĞLU, Yakup; AKDEMİR, Atilla; ŞAHİN, Ahmet Fatih; DURUKAN, Zeynep; SÖNMEZ, Fatih. Discovery and evaluation of novel pyrrole/thiophene chalcone urea EGFR inhibitors via biological and docking studies. *Future Medicinal Chemistry*, [s. l.], p. 1–16, 30 jun. 2025.

ZHAO, Mingzhe *et al.* Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12808, 26 nov. 2021.

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

APÊNDICE A – GRÁFICOS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS CELULARES TRATADA COM AS 2'-HIDROXICALCONAS

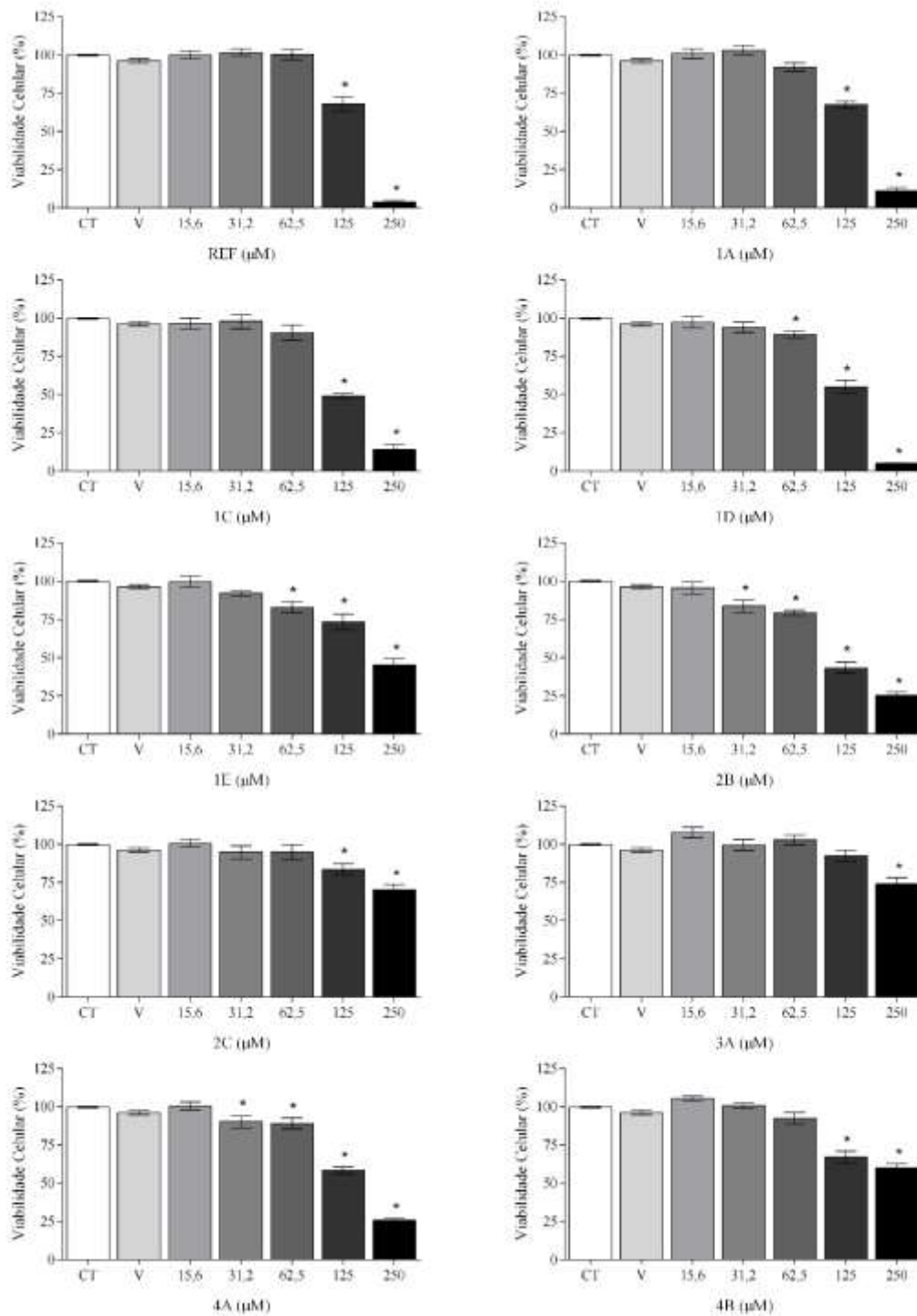
Figura 7 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células LLC-MK2 após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média ± EPM de três experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * p < 0,05 em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

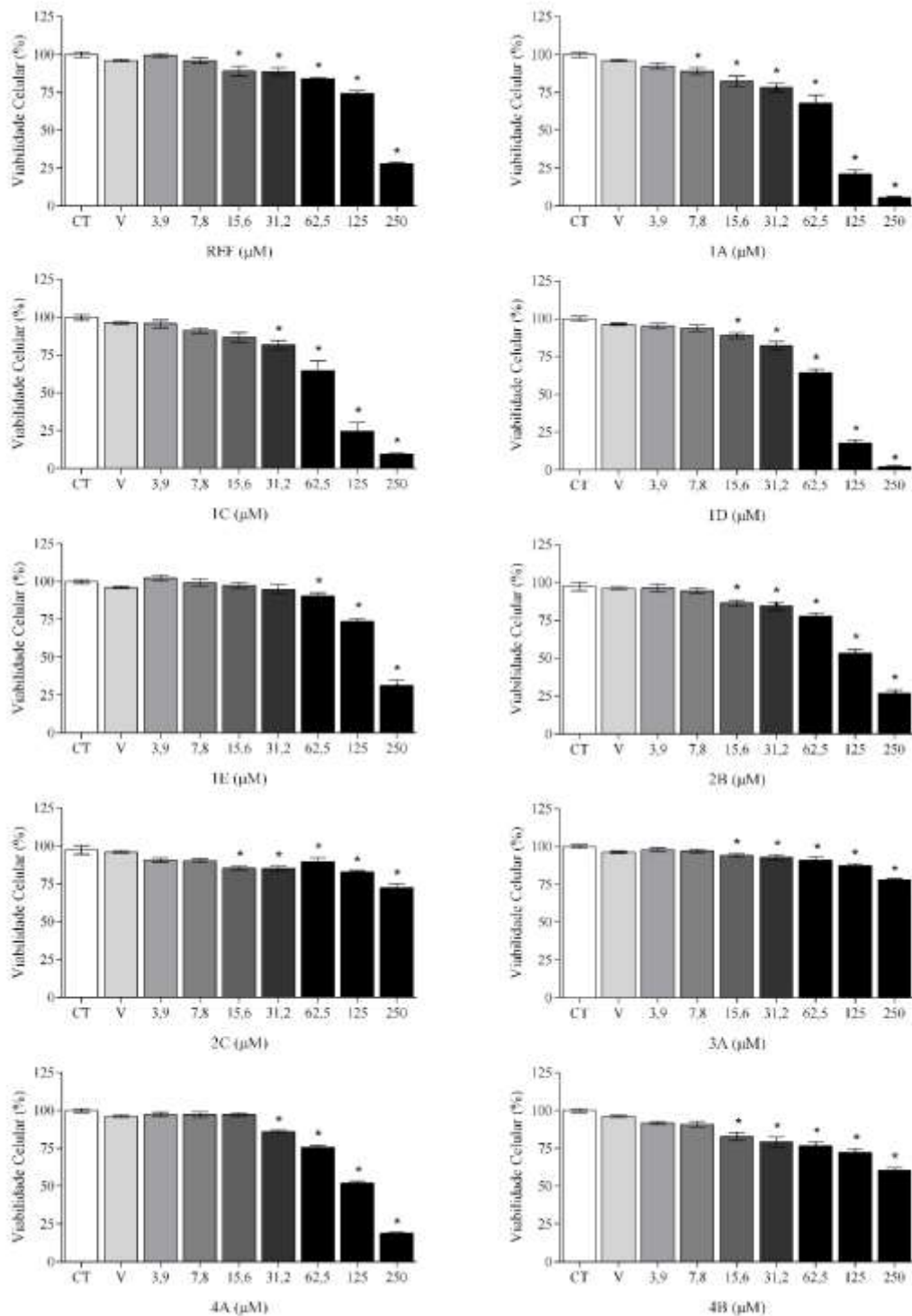
Figura 8 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células HK-2 após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

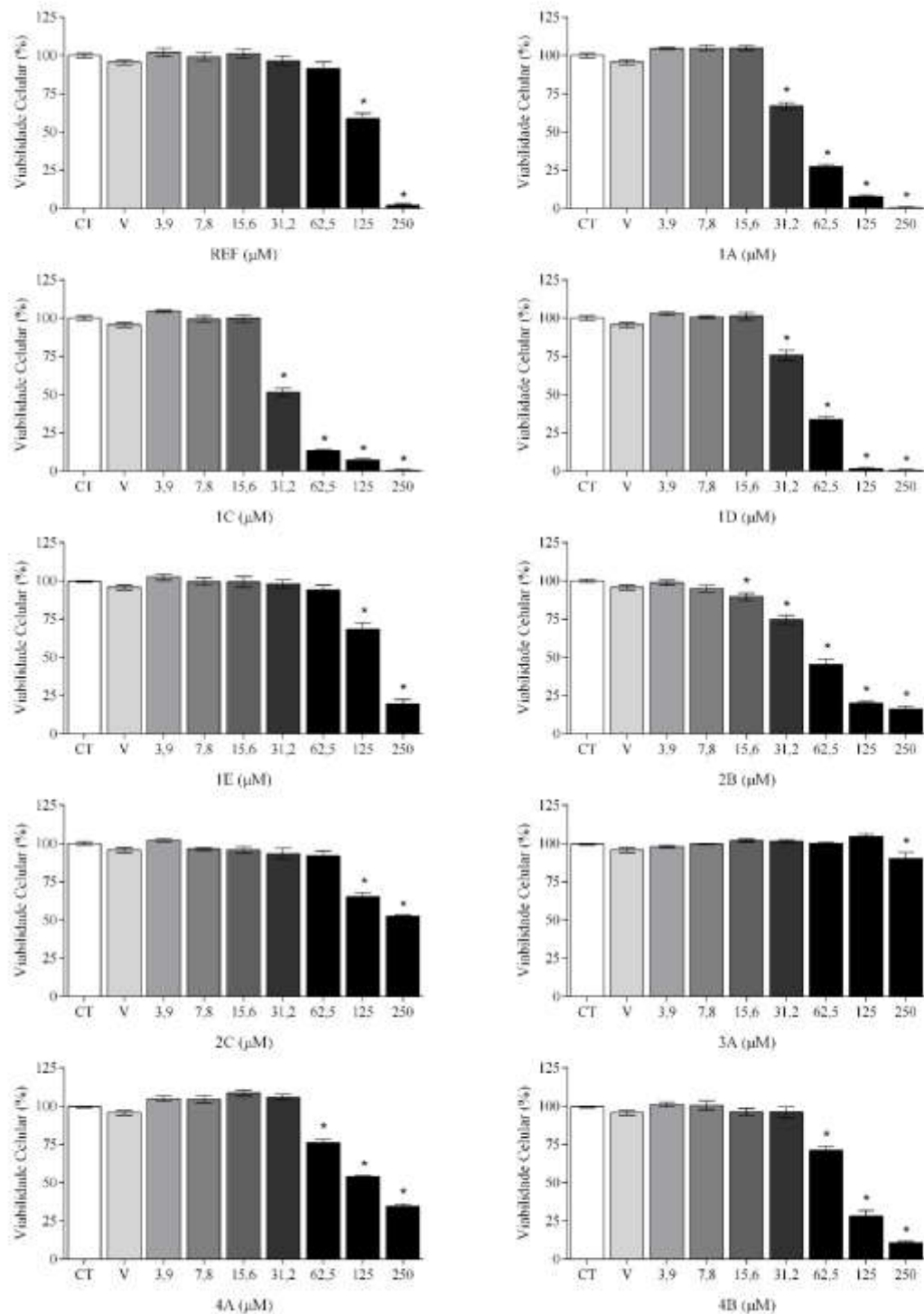
Figura 9 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células L929 após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

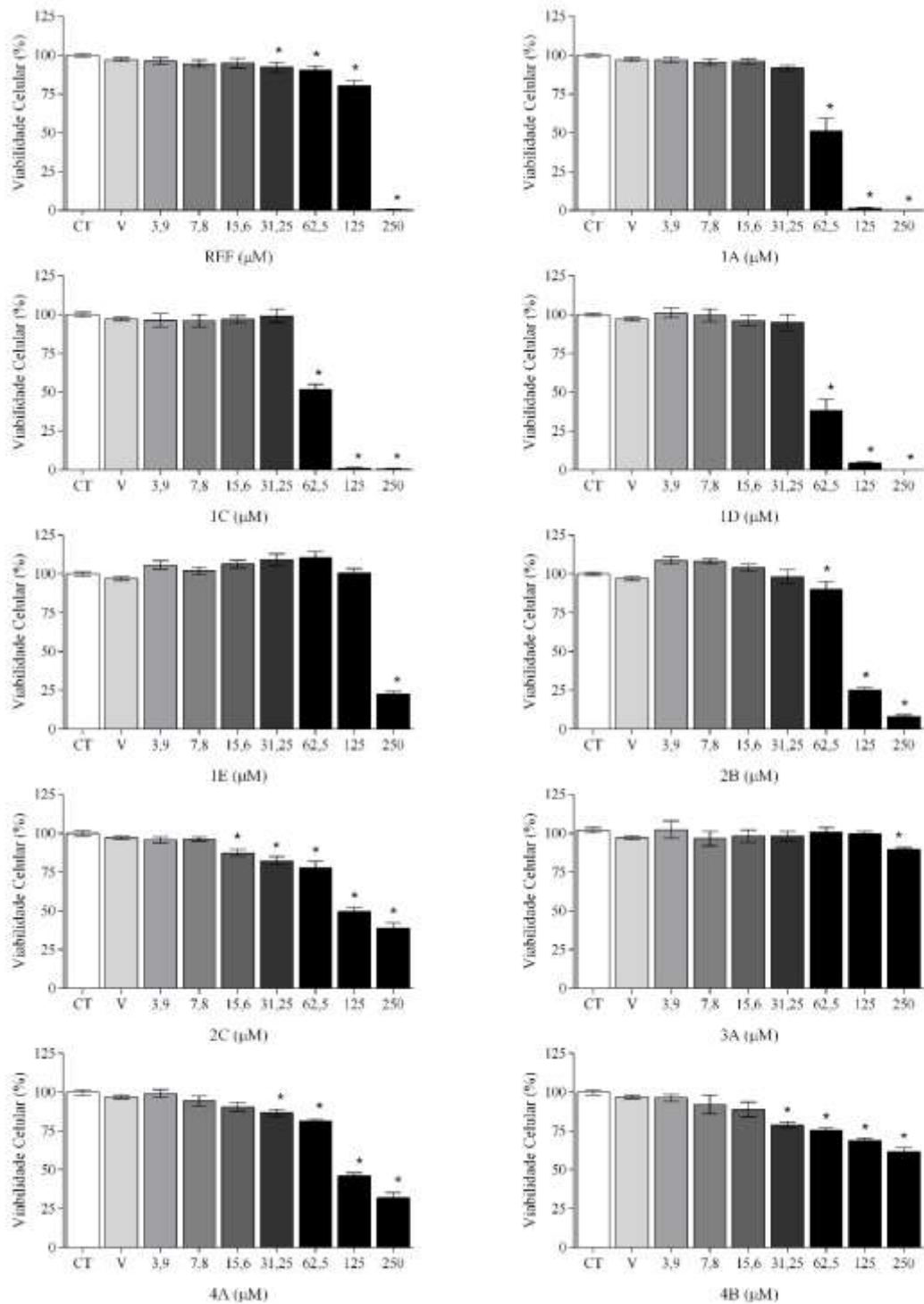
Figura 10 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células IEC-6 após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

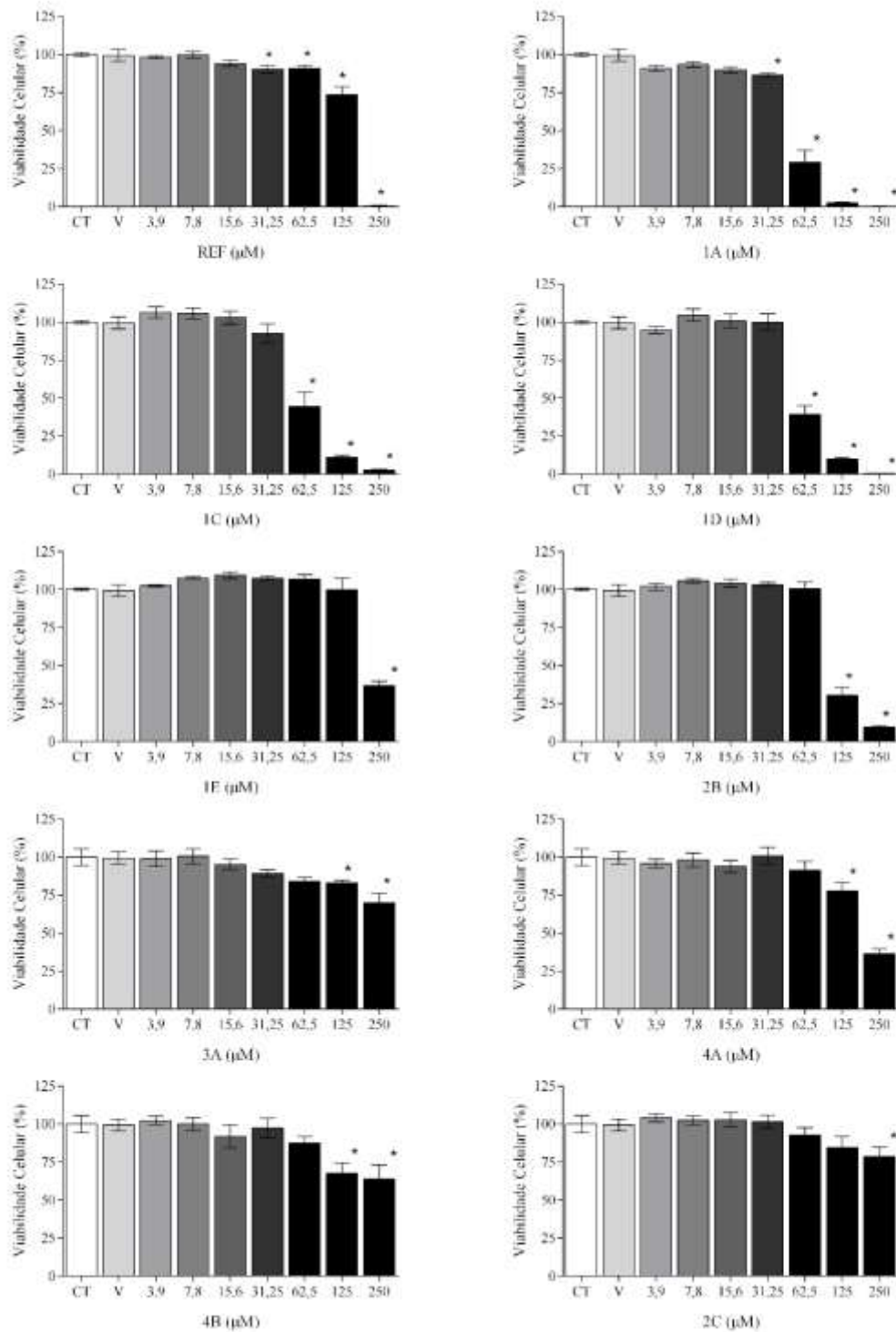
Figura 11 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células PC12 após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

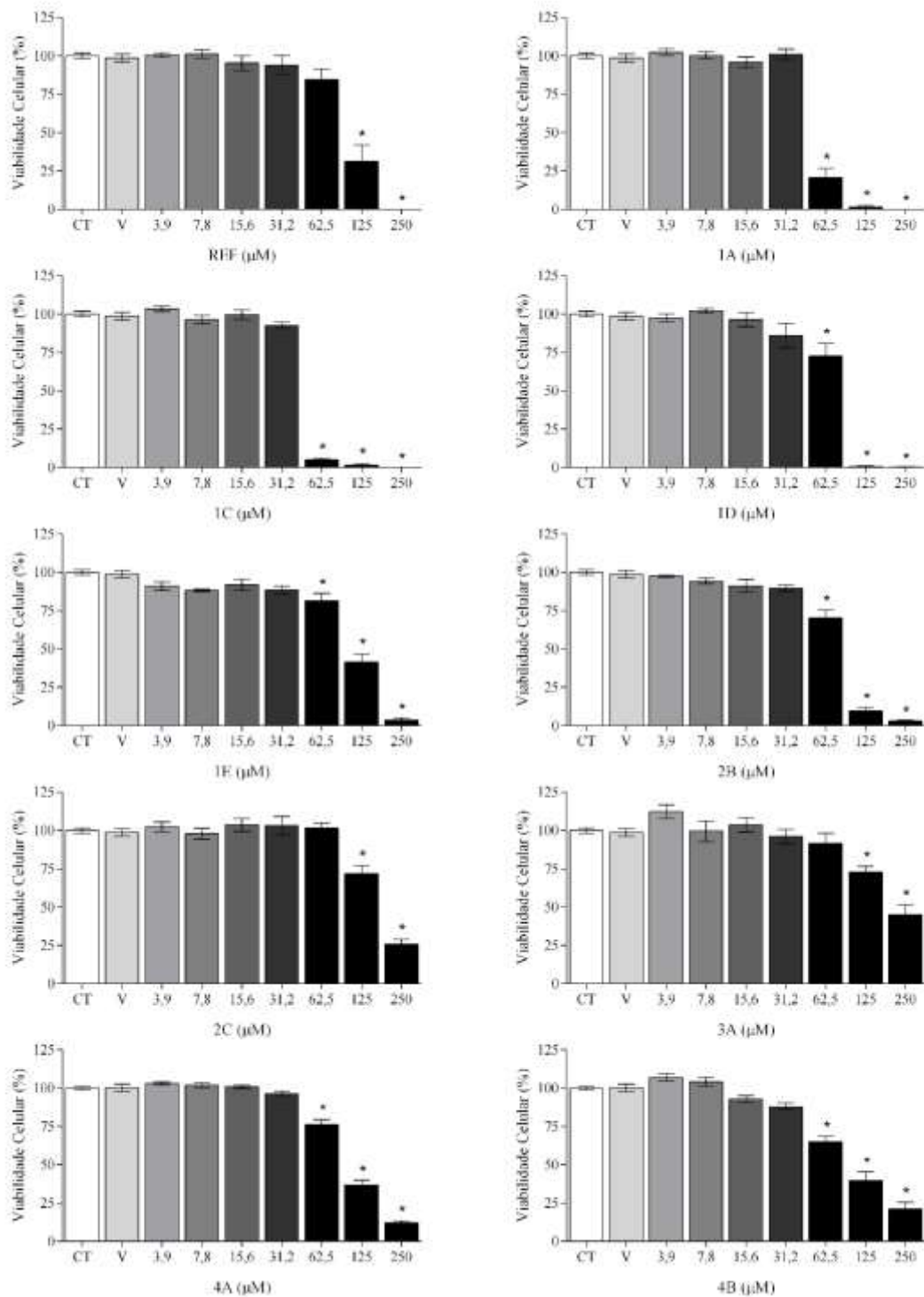
Figura 12 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre Astrócitos após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

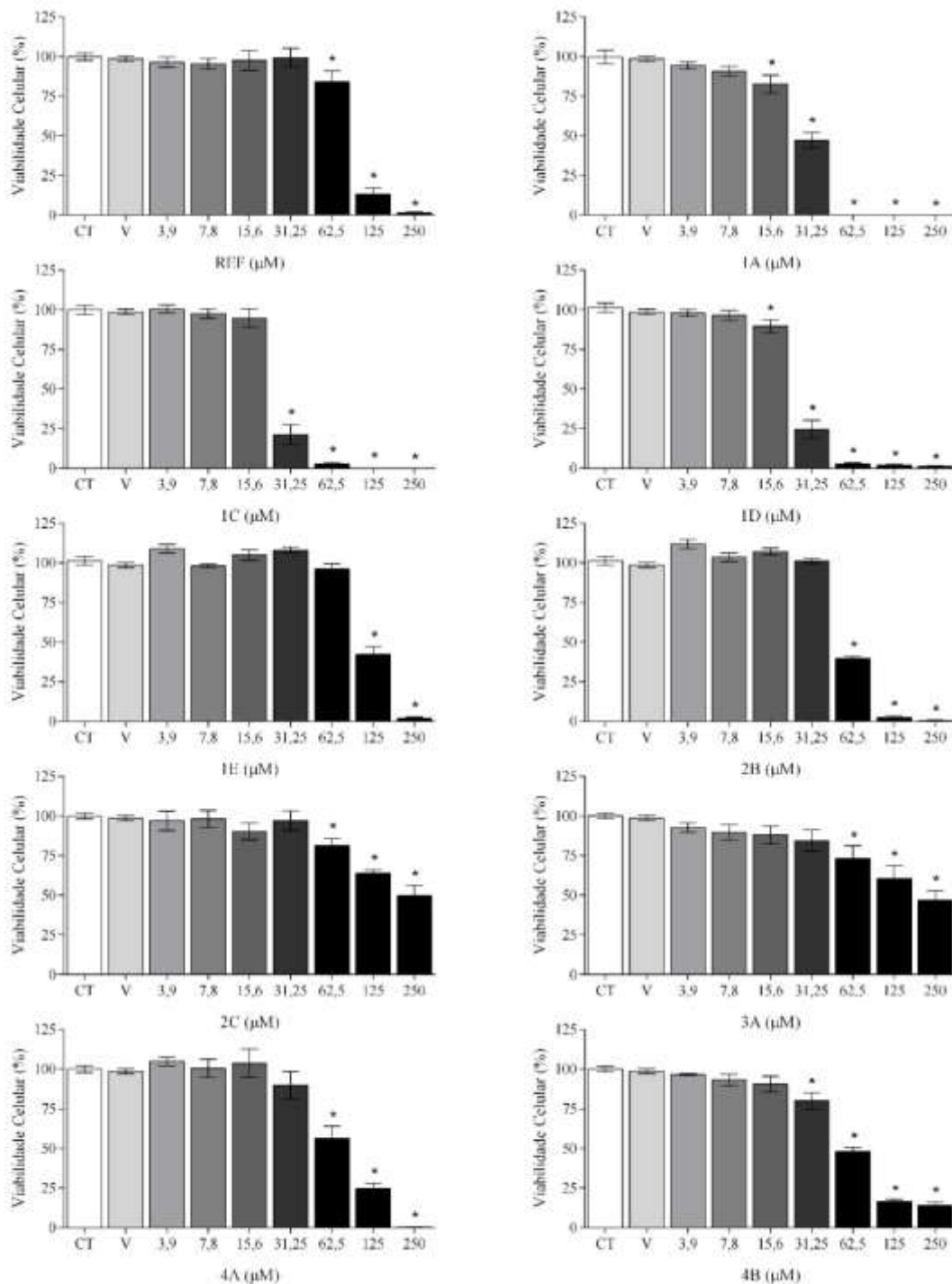
Figura 13 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células BV2 após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

Figura 14 – Gráfico representativo do efeito das 2'-hidroxichalconas sobre células RAW 264.7 após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

**APÊNDICE B – TABELAS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS CELULARES TRATADA COM AS 2'-
HIDROXICALCONAS**

Tabela 2 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem LLC-MK2 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).

	REF	1A	1C	1D	1E	2B	2C	3A	4A	4B
CT	100,00 \pm 0,37	99,91 \pm 0,99	99,95 \pm 0,64	99,97 \pm 1,54	99,95 \pm 1,36	99,97 \pm 1,42	99,92 \pm 0,88	100,00 \pm 2,09	99,96 \pm 1,45	100,10 \pm 1,79
V	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89	94,80 \pm 0,89
250	56,88 \pm 6,59*	60,88 \pm 1,61*	73,46 \pm 2,32*	52,47 \pm 1,81*	46,34 \pm 4,34*	56,11 \pm 0,25*	61,57 \pm 2,35*	58,01 \pm 3,49*	57,84 \pm 3,84*	61,90 \pm 4,50*
125	63,04 \pm 5,11*	69,54 \pm 1,84*	77,02 \pm 3,35*	57,35 \pm 2,79*	55,19 \pm 2,98*	60,13 \pm 2,75*	68,99 \pm 2,91*	61,06 \pm 1,87*	67,64 \pm 3,66*	67,00 \pm 5,27*
62,5	70,07 \pm 6,63*	81,25 \pm 5,00*	77,96 \pm 2,81*	65,97 \pm 3,55*	62,45 \pm 3,74*	64,27 \pm 1,08*	72,37 \pm 2,41*	69,95 \pm 1,26*	70,14 \pm 3,44*	72,61 \pm 6,38*
31,2	75,14 \pm 3,00*	83,18 \pm 4,54*	85,28 \pm 1,48*	75,95 \pm 2,68*	69,61 \pm 2,42*	71,71 \pm 2,44*	77,26 \pm 1,29*	73,90 \pm 0,86*	75,08 \pm 3,68*	78,41 \pm 5,38*
15,6	76,75 \pm 3,05*	86,60 \pm 4,59*	90,35 \pm 1,75*	75,70 \pm 2,90*	80,26 \pm 2,75*	75,89 \pm 1,80*	80,72 \pm 1,58*	82,02 \pm 1,91*	80,11 \pm 3,22*	84,18 \pm 4,75*
7,8	85,26 \pm 4,52	94,08 \pm 2,60	96,32 \pm 1,98	84,30 \pm 1,10*	83,11 \pm 1,26*	85,77 \pm 1,94*	87,56 \pm 0,95*	87,77 \pm 1,25*	88,20 \pm 3,45*	89,31 \pm 1,39
3,9	95,25 \pm 1,35	98,56 \pm 1,97	98,31 \pm 1,69	94,03 \pm 1,96	94,06 \pm 4,85	96,85 \pm 2,55	97,31 \pm 0,95	95,88 \pm 1,97	95,49 \pm 1,49	93,34 \pm 1,22

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

Tabela 3 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem HK2 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).

	REF	1A	1C	1D	1E	2B	2C	3A	4A	4B
CT	99,89 \pm 0,43	99,89 \pm 0,43	99,89 \pm 0,43	99,97 \pm 1,54	99,95 \pm 1,36	99,97 \pm 1,42	99,92 \pm 0,88	100,00 \pm 2,09	99,96 \pm 1,45	100,10 \pm 1,79
V	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39	96,20 \pm 1,39
250	4,04 \pm 1,04*	11,27 \pm 2,14*	13,88 \pm 3,46*	4,98 \pm 0,43*	45,38 \pm 3,82*	25,45 \pm 2,14*	70,15 \pm 3,28*	73,86 \pm 4,37*	25,73 \pm 1,38*	60,02 \pm 2,62*
125	68,08 \pm 4,68*	67,70 \pm 2,03*	48,88 \pm 1,88*	55,00 \pm 4,29*	73,27 \pm 5,27*	43,33 \pm 3,67*	83,38 \pm 3,60*	92,43 \pm 3,53	58,60 \pm 2,32*	67,01 \pm 3,82*
62,5	100,40 \pm 3,34	92,07 \pm 2,89	90,52 \pm 5,06	89,43 \pm 2,10*	82,80 \pm 3,51*	79,30 \pm 1,69*	94,78 \pm 4,91	102,80 \pm 3,18	89,03 \pm 3,62*	92,50 \pm 3,76
31,2	101,80 \pm 2,34	103,20 \pm 2,89	97,82 \pm 4,67	94,00 \pm 3,34	91,98 \pm 1,86	83,65 \pm 4,01*	94,70 \pm 4,28	99,48 \pm 3,67	90,13 \pm 3,94*	100,70 \pm 1,52
15,6	100,10 \pm 2,68	100,90 \pm 3,27	96,50 \pm 3,53	97,21 \pm 3,67	99,49 \pm 3,62	95,58 \pm 3,81	100,50 \pm 2,26	107,60 \pm 3,48	100,50 \pm 2,61	105,40 \pm 1,49

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

Tabela 4 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem L929 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM)

	REF	1A	1C	1D	1E	2B	2C	3A	4A	4B
CT	100,00 \pm 1,71	100,00 \pm 1,71	100,00 \pm 1,71	100,00 \pm 1,71	99,97 \pm 1,19	97,44 \pm 2,83	97,44 \pm 2,83	99,97 \pm 1,19	99,97 \pm 1,19	99,97 \pm 1,19
V	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78	96,23 \pm 0,78
250	27,95 \pm 0,70*	5,53 \pm 0,80*	9,52 \pm 0,66*	2,23 \pm 0,97*	31,35 \pm 3,78*	26,72 \pm 2,38*	72,42 \pm 2,56*	78,09 \pm 0,67*	18,83 \pm 0,72*	60,48 \pm 1,81*
125	74,32 \pm 2,00*	21,07 \pm 2,72*	24,68 \pm 5,71*	17,65 \pm 2,24*	73,78 \pm 1,98*	53,33 \pm 2,49*	82,90 \pm 0,94*	87,52 \pm 1,07*	52,07 \pm 1,51*	72,28 \pm 2,31*
62,5	84,23 \pm 0,89*	67,83 \pm 5,55*	64,62 \pm 6,54*	64,25 \pm 2,52*	90,52 \pm 2,05*	77,65 \pm 2,15*	89,53 \pm 2,85*	91,04 \pm 2,10*	75,75 \pm 1,23*	76,72 \pm 2,67*
31,2	88,88 \pm 2,44*	78,28 \pm 2,82*	81,85 \pm 2,91*	81,92 \pm 2,71*	94,82 \pm 3,18	84,42 \pm 2,68*	85,22 \pm 1,47*	92,90 \pm 1,92*	86,12 \pm 1,02*	79,10 \pm 3,50*
15,6	89,13 \pm 3,21*	82,35 \pm 3,56*	86,60 \pm 3,19	88,77 \pm 1,80*	97,45 \pm 2,18	86,45 \pm 1,92*	85,42 \pm 1,20*	94,18 \pm 0,95*	97,38 \pm 1,30	82,81 \pm 2,53*
7,8	96,12 \pm 1,88	89,00 \pm 2,31	91,17 \pm 1,74	93,72 \pm 2,11	99,35 \pm 2,42	94,68 \pm 1,90	90,30 \pm 1,18	97,01 \pm 1,22	97,30 \pm 1,70	91,01 \pm 1,71
3,9	99,40 \pm 1,37	92,27 \pm 2,11	95,63 \pm 2,59	95,05 \pm 1,76	102,40 \pm 1,79	96,32 \pm 2,55	90,92 \pm 1,50	97,80 \pm 1,28	97,43 \pm 1,35	91,81 \pm 1,27

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

Tabela 5 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem IEC-6 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).

	REF	1A	1C	1D	1E	2B	2C	3A	4A	4B
CT	99,90 \pm 1,48	99,90 \pm 1,48	99,90 \pm 1,48	99,90 \pm 1,48	99,58 \pm 0,48	100,10 \pm 1,10	100,10 \pm 1,10	99,58 \pm 0,48	99,58 \pm 0,48	99,58 \pm 0,48
V	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57	95,70 \pm 1,57
250	2,05 \pm 0,94*	0,62 \pm 0,28*	0,72 \pm 0,26*	0,65 \pm 0,43*	19,58 \pm 2,89*	16,23 \pm 1,93*	52,47 \pm 0,83*	90,28 \pm 4,04*	34,62 \pm 1,48*	10,83 \pm 0,76*
125	58,55 \pm 3,62*	7,82 \pm 0,92*	7,20 \pm 0,95*	1,57 \pm 0,62*	68,28 \pm 4,30*	19,90 \pm 1,08*	65,17 \pm 2,92*	104,70 \pm 1,32	53,87 \pm 0,51*	28,20 \pm 3,53*
62,5	91,50 \pm 4,21	27,35 \pm 1,48*	13,33 \pm 0,79*	33,70 \pm 1,83*	94,00 \pm 3,26	45,55 \pm 3,48*	91,93 \pm 3,07	100,20 \pm 0,70	76,07 \pm 2,35*	71,20 \pm 2,29*
31,2	96,45 \pm 3,10	66,93 \pm 2,22*	51,50 \pm 2,56*	75,65 \pm 3,20*	97,95 \pm 2,57	74,57 \pm 3,00*	93,22 \pm 3,60	101,40 \pm 0,95	105,90 \pm 1,71	96,07 \pm 3,47
15,6	101,10 \pm 3,23	104,90 \pm 1,37	99,85 \pm 2,16	101,30 \pm 2,39	99,27 \pm 3,57	89,58 \pm 2,28*	95,83 \pm 2,27	101,80 \pm 1,04	108,50 \pm 2,07	96,33 \pm 2,41
7,8	99,13 \pm 2,56	104,90 \pm 1,85	99,35 \pm 1,94	100,50 \pm 0,85	99,33 \pm 2,51	94,90 \pm 2,04	96,47 \pm 0,97	99,68 \pm 0,38	104,40 \pm 2,14	100,70 \pm 3,06
3,9	102,00 \pm 2,75	104,50 \pm 0,87	104,60 \pm 0,70	103,10 \pm 1,24	102,60 \pm 2,30	98,77 \pm 1,55	102,10 \pm 0,85	98,08 \pm 0,81	104,80 \pm 1,73	101,10 \pm 1,70

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

Tabela 6 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem PC12 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração (μM).

	REF	1A	1C	1D	1E	2B	2C	3A	4A	4B
CT	100,10 \pm 1,05	100,10 \pm 1,05	100,00 \pm 1,36	100,10 \pm 1,06	100,00 \pm 1,36	100,10 \pm 1,06	99,93 \pm 1,81	101,90 \pm 1,74	99,93 \pm 1,81	99,93 \pm 1,81
V	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12	97,05 \pm 1,12
250	0,50 \pm 0,32*	0,00 \pm 0,00*	0,56 \pm 0,45*	0,07 \pm 0,07*	22,62 \pm 1,78*	8,14 \pm 1,15*	38,87 \pm 3,59*	89,51 \pm 1,50*	31,94 \pm 3,43*	61,62 \pm 2,65*
125	80,27 \pm 3,63*	1,43 \pm 0,50*	0,98 \pm 0,39*	4,20 \pm 0,65*	100,50 \pm 3,06	25,02 \pm 1,58*	49,73 \pm 2,57*	100,60 \pm 2,99	46,21 \pm 1,91*	68,93 \pm 1,25*
62,5	90,17 \pm 2,65*	50,95 \pm 8,30*	51,64 \pm 3,38*	38,05 \pm 7,10*	110,40 \pm 3,91	89,90 \pm 5,22*	77,87 \pm 4,04*	98,23 \pm 3,08	81,23 \pm 1,36*	75,53 \pm 1,34*
31,2	92,23 \pm 3,32*	91,65 \pm 1,62	99,09 \pm 4,27	94,93 \pm 5,27	109,30 \pm 3,67	98,26 \pm 4,45	82,27 \pm 2,64*	98,23 \pm 3,86	86,84 \pm 2,26*	78,78 \pm 1,92*
15,6	94,90 \pm 3,17	95,97 \pm 1,65	96,88 \pm 2,38	95,96 \pm 3,54	106,40 \pm 2,54	104,00 \pm 2,36	87,38 \pm 2,35*	96,63 \pm 4,59	90,61 \pm 2,78	88,95 \pm 4,70
7,8	94,47 \pm 2,24	95,38 \pm 1,92	96,10 \pm 4,04	99,42 \pm 3,96	102,00 \pm 2,27	108,00 \pm 1,48	96,30 \pm 1,39	102,50 \pm 5,59	94,28 \pm 3,19	92,15 \pm 5,98
3,9	96,10 \pm 2,10	96,88 \pm 1,56	96,32 \pm 4,16	100,90 \pm 3,08	105,70 \pm 2,76	108,50 \pm 2,45	95,83 \pm 1,95	97,05 \pm 1,12	99,13 \pm 2,73	96,38 \pm 2,30

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

Tabela 7 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem de Astrócitos tratada com as substâncias em estudo

	REF	1A	1C	1D	1E	2B	2C	3A	4A	4B
CT	100,00 ± 1,2	100,00 ± 1,2	99,94 ± 0,97	99,94 ± 0,97	99,94 ± 0,97	99,94 ± 0,97	100,10 ± 5,54	100,10 ± 5,54	100,10 ± 5,54	100,10 ± 5,54
V	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96	99,42 ± 3,96
250	0,60 ± 0,27*	0,14 ± 0,14*	2,66 ± 0,39*	0,32 ± 0,17*	36,80 ± 2,88*	9,47 ± 1,00*	78,87 ± 5,99*	69,97 ± 6,45*	36,62 ± 2,90*	63,77 ± 9,45*
125	73,8 ± 4,99*	2,38 ± 0,61*	11,02 ± 1,34*	9,70 ± 1,10*	99,85 ± 7,40	30,25 ± 5,45*	84,62 ± 7,38	83,15 ± 1,67*	77,65 ± 5,54*	67,53 ± 6,94*
62,5	90,8 ± 2,12*	29,0 ± 8,07*	44,55 ± 9,27*	39,08 ± 5,94*	106,90 ± 2,93	100,80 ± 4,00	92,67 ± 5,08	84,13 ± 2,49	91,20 ± 5,92	87,48 ± 4,34
31,2	90,33 ± 2,26*	86,5 ± 1,20*	92,78 ± 6,25	100,10 ± 5,38	107,60 ± 1,38	103,40 ± 1,27	101,50 ± 4,49	89,42 ± 2,19	100,80 ± 5,63	97,45 ± 6,33
15,6	94,23 ± 2,04	90,03 ± 1,94	103,00 ± 4,43	100,70 ± 4,28	109,40 ± 2,26	104,30 ± 2,74	102,80 ± 4,66	95,17 ± 3,39	93,96 ± 3,88	92,03 ± 7,55
7,8	99,78 ± 2,18	93,38 ± 1,62	105,60 ± 3,57	104,70 ± 4,05	107,60 ± 0,75	105,70 ± 1,42	102,60 ± 2,94	100,60 ± 5,07	98,13 ± 4,57	100,10 ± 4,10
3,9	98,30 ± 1,15	90,98 ± 2,25	106,4 ± 3,73	94,68 ± 2,27	102,60 ± 0,73	102,10 ± 2,39	104,20 ± 2,70	99,03 ± 5,05	95,81 ± 2,72	102,40 ± 2,79

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * p < 0,05 em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

Tabela 8 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem BV2 tratada com as substâncias em estudo em cada concentração.

	REF	1A	1C	1D	1E	2B	2C	3A	4A	4B
CT	99,99 ± 1,89	99,99 ± 1,89	99,99 ± 1,89	99,99 ± 1,89	99,93 ± 1,89	99,93 ± 1,89	99,93 ± 1,89	99,93 ± 1,89	99,94 ± 1,02	99,94 ± 1,02
V	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50	98,82 ± 2,50
250	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00*	0,31 ± 0,26*	3,63 ± 1,38*	3,00 ± 0,54*	25,82 ± 3,05*	45,17 ± 6,99*	12,12 ± 1,38*	21,19 ± 4,15*
125	31,20 ± 10,72*	1,40 ± 1,22*	1,58 ± 0,97*	0,72 ± 0,36*	41,55 ± 5,17*	9,40 ± 2,20*	71,80 ± 5,30*	72,80 ± 3,79*	36,98 ± 3,03*	39,86 ± 5,67*
62,5	84,76 ± 6,82	20,68 ± 6,12*	4,90 ± 1,08*	72,65 ± 8,30*	81,27 ± 5,01*	70,18 ± 5,18*	101,50 ± 3,47	91,75 ± 6,60	76,37 ± 3,10*	65,12 ± 3,31*
31,2	94,08 ± 6,14	101,00 ± 3,53	92,73 ± 1,73	86,11 ± 7,96	88,35 ± 2,50	89,72 ± 1,99	103,20 ± 5,88	96,12 ± 4,66	96,44 ± 1,58	87,90 ± 2,23
15,6	95,36 ± 4,71	96,03 ± 3,44	99,70 ± 2,93	96,43 ± 4,61	91,85 ± 3,84	91,17 ± 4,18	103,70 ± 4,23	103,70 ± 4,66	100,70 ± 1,12	92,90 ± 2,13
7,8	101,30 ± 2,71	100,40 ± 2,23	96,50 ± 2,72	102,30 ± 1,51	88,13 ± 0,74	94,18 ± 1,84	97,95 ± 3,60	99,53 ± 6,92	102,10 ± 1,51	104,20 ± 2,75
3,9	100,60 ± 1,41	102,40 ± 2,37	103,30 ± 1,82	97,75 ± 2,52	90,87 ± 2,55	97,43 ± 0,89	102,30 ± 3,25	112,20 ± 4,50	103,20 ± 1,06	107,00 ± 2,44

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * p < 0,05 em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.

Tabela 9 – Percentuais de viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 tratada com as substâncias em estudo

	REF	1A	1C	1D	1E	2B	2C	3A	4A	4B
CT	99,97 ± 2,98	99,74 ± 4,30	99,98 ± 2,92	101,30 ± 2,74	101,30 ± 2,74	101,30 ± 2,74	100,10 ± 1,78	100,10 ± 1,73	100,10 ± 2,10	100,10 ± 1,78
V	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61	98,67 ± 1,61
250	1,52 ± 0,62*	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00*	1,09 ± 0,55*	1,80 ± 0,96*	0,45 ± 0,36*	46,25 ± 6,83*	46,84 ± 6,13*	0,22 ± 0,22*	19,16 ± 2,69*
125	13,44 ± 3,62*	0,00 ± 0,00*	0,06 ± 0,06*	2,06 ± 0,89*	42,27 ± 4,82*	2,61 ± 0,91*	63,78 ± 2,19*	60,63 ± 8,27*	24,62 ± 3,41*	19,95 ± 3,48*
62,5	84,23 ± 6,62*	0,06 ± 0,04*	2,54 ± 1,17*	2,56 ± 1,08*	96,06 ± 3,45	39,62 ± 1,34*	81,40 ± 4,47*	73,43 ± 7,84*	56,42 ± 7,45*	41,74 ± 3,76*
31,2	99,43 ± 5,94	47,19 ± 4,87*	21,27 ± 6,35*	24,61 ± 5,67*	108,10 ± 1,80	101,40 ± 1,34	97,13 ± 6,27	84,50 ± 6,72	89,85 ± 8,62	71,80 ± 5,69*
15,6	97,53 ± 6,16	82,80 ± 5,63*	94,69 ± 5,83	89,59 ± 4,25*	104,90 ± 3,41	107,10 ± 2,15	87,26 ± 5,35	88,24 ± 5,58	103,80 ± 8,88	87,63 ± 5,78
7,8	95,46 ± 3,53	90,76 ± 3,11	97,50 ± 2,93	96,40 ± 3,19	98,09 ± 1,37	103,60 ± 2,68	98,19 ± 5,39	89,75 ± 4,77	100,50 ± 5,71	89,55 ± 3,88
3,9	96,55 ± 3,25	94,31 ± 2,25	100,50 ± 2,68	97,95 ± 2,23	108,90 ± 2,69	112,00 ± 2,81	97,11 ± 6,1	92,66 ± 2,77	104,90 ± 2,67	96,77 ± 1,03

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. CT = controle; V = veículo.