

MARIÁ APARECIDA BRAGA ROCHA E OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO DO DERIVADO DE
DIBENZOILMETANO, 1-[(4'-ISO-PROPILO)FENIL]-2-PROPANO-3-FENIL-1,3-
PROPANODIONA (IP₂-DBM), EM LINHAGENS DE MELANOMA, GLIOMA E
ADENOCARCINOMA DO COLORRETAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientadora: Anesia Aparecida dos Santos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48a
2019
Oliveira, Mariá Aparecida Braga Rocha e, 1989-
Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do derivado de
dibenzoilmetano
1-[(4'-Iso-Propil)Fenil]-2-Propano-3-Fenil-1,3-Propanodiona
(IP2-DBM), em linhagens de melanoma, glioma e
adenocarcinoma do colorretal / Mariá Aparecida Braga Rocha e
Oliveira. – Viçosa, MG, 2019.
64 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Anesia Aparecida dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Câncer. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Dibenzoilmetano.
4. Melanoma. 5. Gliomas. 6. Adenocarcinoma. 7. Reto -
Câncer. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 616.994

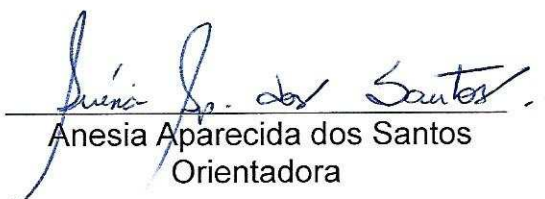
MARIÁ APARECIDA BRAGA ROCHA E OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE DERIVADO DE DIBENZOILMETANO, 1-[(4'-ISO-PROPILO)FENIL]-2-PROPANO-3-FENIL-1,3-PROPANODIONA (IP₂-DBM), EM LINHAGENS DE MELANOMA, GLIOMA E ADENOCARCINOMA DO COLORRETAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2019.


Mariá Aparecida Braga Rocha e Oliveira
Autora


Anesia Aparecida dos Santos
Orientadora

"Estou longe de praticar tudo o que entendo, mas o desejo que tenho de praticar é suficiente para me dar a paz. " (Thérèse de Lisieux)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me fortalecer em cada momento difícil, me ajudando a superá-los.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização deste curso; Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de cursar o mestrado;

Aos meus pais Iêda e Márcio (Bem), que não mediram esforços para que eu pudesse ter as melhores oportunidades. Mãe, obrigada pelas orações constantes e Bem, obrigada por todo cuidado e confiança;

À minha irmã Gabriella, que sempre tinha algo legal pra fazer ou dizer nos momentos mais complicados e, assim, tudo se tornava mais leve;

Ao Viktor, por me lembrar constantemente da minha capacidade, pelos conselhos sempre nos momentos certos e por nunca me deixar faltar amor;

Aos meus amigos da Fraternidade Pequena Via que torceram muito, sorriram e choraram comigo, e souberam me distrair quando eu precisei;

Agradeço de forma carinhosa ao Bionat na pessoa da minha coorientadora professora Marisa, pela dedicação em nos ensinar, pelo apoio, aprendizado e confiança. Também não posso deixar de agradecer ao LAPEM, sem o apoio de vocês os experimentos não teriam sido concluídos;

Ao professor Gaspar e sua equipe, pela paciência e a disponibilidade que contribuíram para a realização de parte desse trabalho.

Ao Lopic-IQ, USP, por ter cedido gentilmente algumas linhagens celulares e à Laís e à Juliana, não só pela ajuda com a pesquisa, mas também pelas conversas e suporte em momentos mais conflitantes;

Aos colegas da Física Biológica sempre acolhedores e disponíveis, à professora Mariana e ao Ray, pela proximidade, companhia e boas conversas.

Aos membros da banca examinadora: professoras Fernanda e Marisa pela disponibilidade e essenciais sugestões;

Aos Professores que tive durante o mestrado, por todo conhecimento compartilhado;

Agradeço imensamente aos colegas do Lab. de Cultura de Células: Amanda, não só pelo aprendizado, mas principalmente pela companhia e presença que me fortaleceram em muitos momentos; Karol, Bella e Gabi, vocês também fazem parte dessa conquista;

Tenho meu coração agradecido principalmente à professora Anésia, minha orientadora, pela sua dedicação à Universidade, exemplo de comprometimento e de luta! Te agradeço muito pelo aprendizado a cada conversa, pela paciência e confiança sem fim e o apoio incondicionais;

Às fontes de fomento que possibilitaram a realização desse trabalho: CAPES, CNPQ, FAPEMIG.

Enfim, o meu muito obrigada a todos aqueles que não citei, mas que, de alguma forma, contribuíram para que eu alcançasse meu objetivo.

RESUMO

OLIVEIRA, Mariá Aparecida Braga Rocha e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro do derivado de dibenzoilmetano, 1-[(4'-iso-propil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3-propanodiona (IP₂-DBM), em linhagens de melanoma, glioma e adenocarcinoma do colorretal.** Orientadora: Anesia Aparecida dos Santos.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), câncer é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças que têm como principal característica o crescimento desordenado de células capazes de invadir tecidos e órgãos adjacentes e de se espalhar de forma metastática para outras regiões do corpo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta essa doença como sendo um problema de saúde pública, tendo causado 9,6 milhões de mortes em 2018, e portanto figurando como sendo a segunda principal causa de mortes no mundo. Dentre os diferentes tipos de câncer, destacam-se o câncer de pele do tipo melanoma, o glioma e o câncer colorretal (CCR), estes devido à alta letalidade e baixa taxa de sobrevivência. Um grande desafio no tratamento do câncer é o desenvolvimento de resistência de algumas populações de células tumorais aos quimioterápicos antineoplásicos conhecidos, além da falta de seletividade das drogas, resultando em alta toxicidade às células normais. De fato, os Índices de Seletividade (IS) de drogas atuais com grande potencial quimioterápico são menores ou iguais a 1,0. Por outro lado, dibenzoilmetanos (DBMs) e seus derivados destacam-se por apresentarem atividade antitumoral in vitro e in vivo contra diversos tipos de tumores, possuem diversas propriedades farmacológicas (fotoproteção e atividades anti-inflamatória, antitumoral, antiviral), e pela possibilidade de serem produzidos por meio de síntese orgânica. Assim, no presente trabalho sintetizou-se um derivado inédito do DBM, denominado IP₂-DBM, que foi caracterizado por técnicas espectrométricas como RMN H¹, RMN C¹³ e massas. A fim de avaliar o efeito citotóxico do IP₂-DBM, foram realizados testes in vitro em linhagens de células tumorais B16F10 (melanoma), C6 (glioma) e SW480 (adenocarcinoma colorretal) e em linhagens de células normais Melan-A e VERO. Os resultados do teste de citotoxicidade realizado com MTT, mostrou que as taxas de IC₅₀ (50% da concentração inibitória máxima) foram 9,018 µg/mL, 26,17 µg/mL e 24,04 µg/mL para as células de linhagens de melanoma, glioma e adenocarcinoma colorretal, respectivamente. Enquanto as linhagens normais Melan-A e VERO, apresentaram IC₅₀ de 51,85 µg/mL e 99,89 µg/mL, respectivamente. Em relação a Melan-A, o IS (índice de seletividade) foi de

5,74 para melanoma e 2,15 para glioma, e em relação a VERO, os IS foram de 11,06, 3,81 e 4,15, para melanoma, glioma e adenocarcinoma do colorretal, respectivamente. Os dados obtidos indicam que o composto IP₂-DBM é um potencial medicamento para o tratamento do câncer. Estudos complementares e testes in vivo são necessários para avaliar a toxicidade, o mecanismo de ação e a farmacocinética do composto.

Palavras-chave: Câncer. Agentes antineoplásicos. Dibenzilmetano. Melanoma. Gliomas. Adenocarcinoma.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Mariá Aparecida Braga Rocha e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Evaluation of the antitumor activity of the dibenzoylmethane derivative, 1-[(4'-iso-propyl)phenyl]-2-propane-3-phenyl -1,3- propanedione (IP₂-DBM), in melanoma, glioma and colorectal adenocarcinoma.** Adviser: Anesia Aparecida dos Santos.

According to Instituto Nacional de Câncer (INCA), cancer is the name given to a group of more than 100 diseases, that have as a common feature the uncontrolled growth of cells capable of invading neighboring tissues and organs, and to metastatically spread to other body regions. The World Health Organization (WHO) presents this disease as a public health problem, which has caused 9.6 million deaths in 2018, being considered the second main cause of death in the world. Among the different types of cancer, melanoma skin cancer, glioma and colorectal cancer (CCR) stand out due to their high lethality and low survival rate. A great challenge for treating cancer is the development of resistance to known antineoplastic chemotherapeutic drugs by some cell populations, besides the low selectivity of the drugs, resulting in high toxicity to healthy cells. Indeed, the Selectivity Index (SI) of current drugs with good chemotherapeutic potential are smaller or equal to 1.0. On the other hand, dibenzoylmethanes (DBM) are notorious compounds for their antitumor activity in vitro and in vivo against several types of tumor, due to their diverse pharmacological properties (photoprotection and anti-inflammatory, antitumor and antiviral activities), and for the possibility of being produced through organic synthesis. Therefore, in the present work, a new DBM derivative, named IP₂-DBM, was synthesized and characterized by RMN H¹, RMN C¹³ e massas. In vivo assays were performed in the tumor cell lines B16F10 (melanoma), C6 (Glial) and SW480 (colorectal adenocarcinoma) and in the normal cell lines Melan-A and VERO. The synthesis was successfully concluded and the identification of the compound was confirmed. After the cytotoxicity assay with MTT, the rates IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) were 9.018 µg/mL, 26.17 µg/mL and 24.04 µg/mL for the cell lines melanoma, glioma and CCR, respectively, while the normal cell lines Melan-A and Vero presented IC₅₀ of 51.85 µg/mL and 99.89 µg/mL, respectively. For Melan-A, the SI was 5.74 and 2.15 for melanoma and glioma, respectively. For VERO, the SI rates were 11.06, 3.81, and 4.15 for melanoma, glioma and colorectal

adenocarcinoma, respectively. The data obtained suggest that the compound IP₂-DBM is a potential drug for cancer treatment. Further complementary studies and in vivo assays are necessary to guarantee the safety regarding the toxicity and to verify the mechanism of action and pharmacokinetics of the compound.

Key words: Cancer. Antineoplastic agents. Dibenzoylmethano. Melanoma. Glioma. Adenocarcinoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	19
Figura 2 - Eventos Biológicos na Progressão do Melanoma.....	21
Figura 3 – Estruturas químicas da Cisplatina (I), Doxorrubicina (II) e Dacarbazina (III).	24
Figura 4 – Estrutura química do DBM.	25
Figura 5 – Estrutura geral das β -dicetonas.	26
Figura 6 – Derivado de DBM mais potente contra linhagens de células Câncer de Ovário (1A9) e câncer de osso (HOS).....	27
Figura 7 – Estruturas química do Eusolex® 8020 (I) e o Parsol® 1789 (II).....	27
Figura 8 – Cromatografia de camada delgada (CCD) da primeira etapa da síntese (alquilação do dibenzoilmetano).....	32
Figura 9 - Perfil do padrão contendo IP ₂ -DBM concentração 1,00 mg/mL (área vs. tempo de retenção em s.).....	34
Figura 10 - Espectro de massas do composto IP ₂ -DBM, na concentração de 1,00 mg/mL.	34
Figura 11 - Proposta de fragmentação do composto IP ₂ -DBM. Fragmentos e suas respectivas massas: m/z 77, m/z 91, m/z 105, m/z 105, m/z 266 e m/z 293.....	35
Figura 12 – Estrutura química do 1-[(4'-iso-propil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3 propanodiona (IP ₂ -DBM).	36
Figura 13 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) do composto IP ₂ -DBM com supressão do sinal da H ₂ O.....	38
Figura 14 - Ampliação da região de 8.0 a 6.0 ppm do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) com supressão do sinal da H ₂ O do composto IP ₂ -DBM.	39
Figura 15 – Ampliação da região de 3.0 a 1.0 ppm do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) com supressão do sinal da H ₂ O do composto IP ₂ -DBM (extensão B).	40
Figura 16 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) do composto IP ₂ -DBM.	41

Figura 17 – Ampliação da região de 12 a 56 ppm do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) do composto IP ₂ -DBM.....	42
Figura 18 – Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) do composto IP ₂ -DBM.....	43
Figura 19 – Espectro de DEPT (100 MHz, DMSO-d ₆) do composto IP ₂ -DBM.....	44
Figura 20 - Ampliação da região de 12 a 56 ppm do espectro de DEPT (100 MHz, DMSO-d ₆) do composto IP ₂ -DBM.....	45
Figura 21 - Taxa de mortalidade celular em função da concentração do composto IP ₂ -DBM para as linhagens celulares normais indicadas nas legendas, após exposição de 60 horas.	47
Figura 22 - Taxa de mortalidade celular em função da concentração do composto IP ₂ -DBM para as linhagens celulares tumorais, após exposição de 60 horas	48
Figura 23 – Comparação do efeito citotóxico do IP ₂ -DBM com o efeito das demais drogas para as linhagens estudadas.....	54
Figura Complementar 1: Efeito citotóxico em função da concentração de Dacarbazina para as linhagens celulares Melan-A e B16F10, após exposição de 60 horas.	63
Figura Complementar 2: Efeito citotóxico das linhagens celulares estudadas em função da concentração de Cisplatina, após exposição de 60 horas	63
Figura Complementar 3: Efeito citotóxico das linhagens celulares estudadas em função da concentração de Doxorrubicina, após exposição de 60 horas.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações letais do composto IP ₂ -DBM para cada linhagem tratada.	50
Tabela 2 – IC ₅₀ das linhagens de melanoma e normal após tratamento com Dacarbazina.	51
Tabela 3 - Comparação dos IC ₅₀ e Índice de Seletividade da linhagem de melanoma após tratamento com IP ₂ -DBM e dacarbazina.	51
Tabela 4 - Valores de IC ₅₀ e Índice de Seletividade das diferentes linhagens após tratamento com os compostos tradicionais.	53
Tabela 5 - Comparação dos Índices de Seletividade do IP ₂ -DBM com relação aos demais quimioterápicos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

IP ₂ -DBM	1-[(4'-iso-propil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3-propanodiona
6-4 PP	6-4 pirimidina-pirimidona
CCD	Cromatografia em camada delgada.
CCR	Câncer do Colorretal
CPD	Ciclobutano pirimidina
DBM	1,3-Difenilpropano-1,3-diona
DBM	Dibenzoilmetano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
GBM	Glioblastoma
IC ₁₀	Concentração inibitória de 10%
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IC ₉₀	Concentração inibitória de 90%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
MC	Meio Completo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão fosfato salino
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SUS	Sistema Único de Saúde
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. O Câncer: neoplasia maligna ou tumor maligno.....	17
2.2. Melanoma.....	19
2.3. Glioma.....	21
2.4. Adenocarcinoma do Colorretal.....	22
2.5. Quimioterapia antineoplásica e busca de novos fármacos	23
2.6. As β -dicetonas	25
3. METODOLOGIA	28
3.1. Crescimento das células in vitro (cultivo celular).....	28
3.2. Síntese e caracterização do composto IP ₂ -DBM.....	29
3.2.1. Alquilação	29
3.2.2. Espectrometria de Massas	30
3.2.3. Ressonância magnética nuclear.....	30
3.3. Atividade citotóxica do composto medida pelo ensaio do MTT	30
3.3.1. Cálculo da concentração inibitória de 50% das células (IC ₅₀)	31
3.3.2. Índice de Seletividade.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Síntese e caracterização do composto	32
4.1.1. Rendimento da reação	33
4.1.2. Espectrometria de Massas.....	33
4.1.3. Espectrometria de Hidrogênio e Carbono	36
4.2. Ensaio de citotoxicidade in vitro e índice de seletividade (IS)	46
5. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	63

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados levantados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), somente para o biênio 2018-2019, foi estimada a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer no Brasil, dos quais os mais prevalentes são o câncer de pele não melanoma, de próstata, pulmão, mama feminina e cólon (INCA, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS), apresenta o câncer como sendo um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento. Nestes, é esperada a ocorrência de 80% do total dos mais de 20 milhões de casos novos estimados mundialmente até 2025. O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e é responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis óbitos são relacionadas à doença (ONU, 2018).

Dentre os diferentes tipos de câncer destaca-se o câncer de pele do tipo melanoma, um dos cânceres mais agressivos, caracterizado por alta propensão a formação de metástase, além da resistência à terapia, resultando assim alto índice de mortalidade (LEBSA et al., 2007; RATHORE et al., 2019). Também se sobressaem o glioma, no qual os pacientes apresentam taxas de sobrevivência baixas, com tempo médio de sobrevida menor que 18 meses (LIU et al., 2019) e o câncer de colorretal (CCR), considerado no Brasil a terceira neoplasia maligna mais comum em homens e a segunda mais comum em mulheres, com taxa de sobrevida de 5 anos em 63% dos casos em geral e 10% quando o diagnóstico é realizado com a constatação de formação de metástases (DENIPOTEI et al., 2010).

Um grande problema no tratamento do câncer é o desenvolvimento de resistência de algumas populações de células tumorais aos quimioterápicos antineoplásicos conhecidos. Isso ocorre devido às características intrínsecas da terapia que, além de eliminar células tumorais, podem vir a selecionar algumas células cancerosas, que poderão se tornar linhagens progressivamente mais agressivas. Uma desvantagem perigosa devido ao risco de recidiva, pois tais células se tornam não responsivas ao tratamento (SAITO, 2014).

Desde a descoberta da cisplatina várias tentativas têm sido feitas com o objetivo de desenvolver novos quimioterápicos com menor toxicidade e efeitos colaterais minimizados para tratar o câncer. Ademais, problemas fundamentais relacionados a quimioterapia permanecem não solucionados tais como a resistência,

conforme já citado, e a falta de seletividade das drogas que possuem alta toxicidade às células normais (ISHAQ et al., 2014). Além da Cisplatina, drogas com grande potencial quimioterápico, como Doxorubicina e Dacarbazina, vem sendo utilizadas pelo Sistema Único de Saúde, SUS. Entretanto, seus Índices de Seletividade (IS) são menores ou próximos a 1,0. (OLIVEIRA, 2015). O uso de tais fármacos em terapias ocorre principalmente devido ao baixo custo, mesmo apresentando uma resposta terapêutica muito baixa (FAGHFURI et al., 2015; ATKINS et al., 1999).

Inúmeros compostos naturais ou sintéticos farmacologicamente ativos contra os diversos tipos de tumores têm sido descritos, embora a grande maioria não se torne um fármaco com capacidade clínica, estudos de modificações moleculares na estrutura de compostos com atividade antitumoral, com o intuito de minimizar os efeitos adversos encontrados nos quimioterápicos, possibilita o avanço da produção de agentes de potencial utilização na quimioterapia (QUIRINO et al., 2006).

Entre as diversas classes de compostos descritas na literatura que apresentam atividade antitumoral, *in vitro* e *in vivo*, encontram-se os dibenzoilmetanos - 1,3-difenilpropano-1,3-diona, DBM. Tratam-se compostos pertencentes a uma família de flavonoides muito estudada como potente agente farmacológico devido a capacidade, demonstrada por ela e seus derivados, formarem um grupo raro de pequenas β -dicetonas (Figura 5) que apresentam diversas propriedades farmacológicas, (fotoproteção, atividades antiinflamatória, antitumoral, antiviral) (Quirino et al., 2006). Essas substâncias são encontradas em um grande número de plantas (Annonaceas, Astraceas, Menispermaceae, Rosaceae, Salicaceae e, especialmente, Leguminoseae) (BLATT et al., 2002). Ademais, o DBM e seus derivados também podem ser obtidos por meio de síntese orgânica (MAGALHÃES et al., 1997).

Diante das evidências mencionadas, faz-se necessária a descoberta de medicamentos mais específicos, que dificultem o aparecimento de resistência a drogas e que sejam mais seletivos para o câncer. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento da síntese de um derivado inédito do DBM, denominado IP₂-DBM e a avaliação do efeito antitumoral em melanoma, glioma e adenocarcinoma do colorretal, bem como a comparação de sua eficiência *in vitro* com drogas de uso clínico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Câncer: neoplasia maligna ou tumor maligno

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) câncer é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças, tendo como principal característica comum o crescimento desordenado de células capazes de invadir tecidos e órgãos adjacentes, e de se espalharem de forma metastática para outras regiões do corpo. São consideradas doenças de ocorrência multifatorial, causadas principalmente por alterações genéticas, fatores ambientais e estilo de vida.

Em condições normais, as células do corpo crescem e se reproduzem através de processo controlado e bem definido, conhecido como ciclo celular, no qual uma célula se divide e originando duas células idênticas (divisão celular ou mitose). Dessa forma, tal processo é responsável pela reposição de células mortas, regeneração dos tecidos saudáveis do corpo ou pelo crescimento do organismo multicelular. Devido a sua importância tal processo possui mecanismos de regulação e de parada da divisão celular. Entretanto, muitas vezes tais formas de controle são sobrepujadas e, as células passam de uma condição dita “normal” para uma condição dita “tumoral” onde as mesmas crescem (ou seja, se dividem) independentes destes mecanismos de regulação (KIERSZENBAUM et al., 2008).

O crescimento autônomo da massa tecidual de células cancerosas excede ao crescimento de tecidos saudáveis e, em muitos casos, persiste mesmo depois de tratamento e/ou da realização de procedimentos cirúrgicos, comprometendo o organismo hospedeiro pela diminuição do suprimento nutricional e energético. Ainda, através desse mecanismo de crescimento incontrolável, os tumores malignos tendem a ser muito agressivos e, muitas vezes se tornam não responsivos aos tratamentos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo (COTRAN et al., 2004; MCGEE et al., 1992; WILLIS, 1952).

O processo de formação do câncer, chamado de carcinogênese ou oncogênese é, em geral, lento podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere-se e dê origem a um tumor visível (INCA, 2019). Sua formação, então, resulta do acúmulo de mutações genéticas nas células, ou seja, são os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos os principais

responsáveis pela formação e progressão da doença e, como cada célula é exposta a mutagênicos a cada ciclo de divisão celular, a carcinogênese é o resultado da exposição a esses agentes, devido a frequência, o período de tempo e pela interação entre eles. (YUAN et al., 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que “quase todas as famílias do mundo são afetadas pelo câncer de alguma maneira” e que foram feitos muitos progressos na prevenção, no tratamento e nos cuidados paliativos da doença. Entretanto, o acesso a esses avanços é desigual. Em muitos países, o câncer é diagnosticado tardiamente, o tratamento é de alto custo ou inacessível e não há disponibilidade de serviços paliativos. Ainda, segundo a OMS, aproximadamente 14 milhões de novos casos são registrados por ano globalmente. Além disso calcula-se que essas notificações devam subir 70% nas próximas duas décadas (Organização das Nações Unidas - ONU, 2018).

Os países em desenvolvimento serão os mais afetados, entre eles o Brasil. Segundo dados levantados pelo INCA, somente para o biênio 2018-2019, foi estimada a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer, sendo os de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto os mais incidentes. Ademais, também são observadas altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago.

Segundo as estimativas, os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres serão os mais frequentes. À exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais frequentes em homens são os de próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%), são os mais incidentes como mostrado na figura 1. (INCA, 2018).

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma* (Fonte: INCA, 2018). *Números arredondados para múltiplos de 10.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Nesse contexto, no presente trabalho foram selecionados três tipos de linhagens cancerosas para a realização do estudo citotóxico: melanoma, que apesar da baixa incidência, possui elevado índice de letalidade devido sua alta capacidade metastática (LOURENÇO, 2013); adenocarcinoma do colorretal, o mais comum entre homens e mulheres (INCA, 2018 - figura 1) e glioma que age sobre o sistema nervoso central e para o qual atualmente não há cura (LIU et al., 2019).

2.2. Melanoma

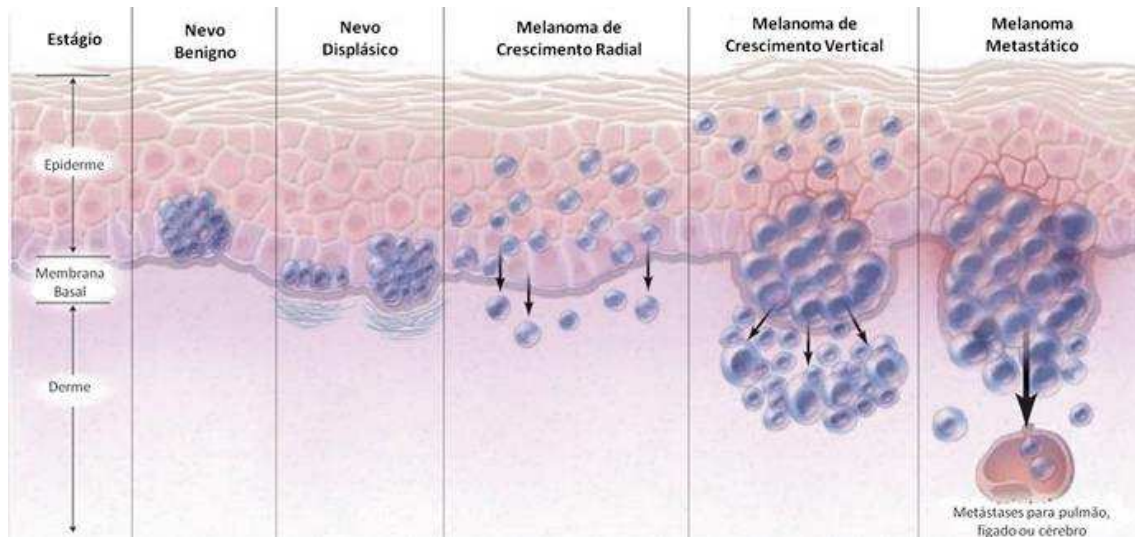
O câncer de pele do tipo melanoma, apesar de ser menos incidente, é considerado um dos cânceres mais agressivos, caracterizado por alta plasticidade e propensão a formação de metástase, além da resistência à terapia, resultando assim em alto índice de mortalidade (LEBSA et al., 2007; RATHORE et al., 2019). É originado dos melanócitos, células normais derivadas da crista neural e produtoras de pigmento na pele, que situam-se na camada basal da epiderme e se separam da derme pela membrana basal. Tais células contêm organelas especiais denominadas melanosomas, os quais são responsáveis pela produção do pigmento melanina. Esses, por sua vez, se organizam em grânulos, e são transferidos para os queratinócitos mais próximos, onde formam uma “capa” ao redor do núcleo, protegendo o DNA de danos causados pela radiação ultravioleta (UV) (DAMSKY, 2014).

O melanoma é causado pela proliferação maligna de melanócitos, sendo majoritariamente causado pela exposição à radiação UV em seus tipos A e B (UVA e UVB). A UVB gera danos diretamente ao DNA, através da formação de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4 PP), enquanto a UVA pode gerar danos indiretos ao DNA, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Assim, a exposição à radiação UV sem proteção, de forma excessiva ou não, pode ultrapassar a capacidade citoprotetora da melanina, resultando em danos a moléculas orgânicas como DNA e proteínas (SAITO, 2014).

A progressão de melanócitos normais para melanoma metastático é um processo que ocorre em várias etapas, as quais podem ser observadas na Figura 2. As mudanças na capacidade proliferativa do sistema melanocítico, ocasionadas pela radiação UV, produzem inicialmente uma lesão precursora benigna (nevo benigno ou nevo melanocítico), as quais são planas e de coloração uniforme. O segundo estágio é um crescimento maior de lesões assimétricas, com bordas irregulares, contendo múltiplas cores, chamado nevo displásico (MILLER et al., 2006, SAITO, 2014). Posteriormente, na fase de crescimento radial, as células adquirem a habilidade de proliferação, apresentando-se como lesões elevadas, com poder de penetração nas papilas dérmicas isoladamente ou em pequenos ninhos. Nas fases finais de transformação, tais células podem progredir para a fase de crescimento vertical, onde adquirem a capacidade de invadir a derme e formar um nódulo expansivo. Nesta fase denominada de progressão tumoral, as células apresentam características metastáticas, são capazes de entrar na corrente sanguínea ou em vasos linfáticos culminando na colonização de tecidos e órgãos distantes (MILLER, et al., 2006).

Acredita-se que o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas impulsione a progressão através dessas etapas (DAMSKY, 2014) e, além disso, segundo o INCA o melanoma pode aparecer em qualquer parte do corpo, na pele ou mucosas, apresentando-se na forma de manchas, pintas ou sinais de danos como feridas ou nódulos de coloração avermelhada que aumentam de tamanho em curto espaço de tempo. Nos indivíduos de pele negra, ele é mais comum nas áreas claras, como palmas das mãos e plantas dos pés. As estimativas para o biênio 2018-2019 no Brasil indicaram a ocorrência de 6.260 novos casos, sendo 2.920 deles em homens e 3.340 em mulheres. Desses, foram contabilizados 1.794 óbitos, 1.012 em homens e 782 em mulheres (INCA, 2019).

Figura 2 - Eventos Biológicos na Progressão do Melanoma. Os primeiros passos considerados como benignos estão associados à formação de nevos e à fase de crescimento radial (RGP). Células do RGP podem progredir para a fase de crescimento vertical (VGP), um estágio mais perigoso no qual as células apresentam potencial metastático, podendo por fim avançar para o estágio final, chamado de melanoma metastático. **Fonte:** Zaidi et. al., 2008, adaptado.



O medicamento de escolha do Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento do melanoma é a Dacarbazina (Figura 3). Essa droga apresenta um Índice de Seletividade (IS) próximo de 1,0 (efeito citotóxico do composto em linhagens derivadas de células normais em relação à linhagens derivadas de células tumorais), o qual é considerado baixo, tornando-a pouco seletiva para células tumorais, podendo atuar em qualquer fase do ciclo celular (NASCIMENTO, 2018; OLIVEIRA, 201; BAËTA, 2019). Apesar de apresentar uma resposta terapêutica muito baixa, com apenas 20% dos casos por um período de aproximadamente 5 meses, o seu uso em quimioterapia ocorre, principalmente, devido ao baixo custo. (FAGHFURI et al., 2015; ATKINS et al., 1999).

2.3. Glioma

Gliomas são tumores heterogêneos derivados de células gliais, que tem origem embrionária na placa neural (LAUG et al., 2018), assim como os melanócitos. Esse câncer é o tumor maligno primário mais comum no sistema nervoso central (SNC) e continua sendo a forma mais letal de câncer cerebral, o que o caracteriza como um

grande desafio no campo da neurocirurgia (INCA, 2019; LIU et al., 2019). Apesar dos avanços nas pesquisas e no desenvolvimento de terapias, ainda não há cura para o glioma e os pacientes apresentam baixas sobrevivência. Para o glioblastoma (GBM), por exemplo, o tempo médio de sobrevivência dos pacientes é menor que 18 meses (LIU et al., 2019).

A OMS dividiu os gliomas em grupos: gliomas de baixo grau (LGG, graus I e II) que são tumores bem diferenciados, de crescimento lento, e gliomas de alto grau (HGG, graus III e IV) que por sua vez são menos diferenciados ou anaplásicos, capazes de se infiltrar fortemente no parênquima cerebral. Desses, o tumor cerebral primário mais comum e mais letal é o glioblastoma (GBM, grau IV).

A formação e progressão do glioma ainda é alvo de muitos estudos. Entende-se atualmente que essa doença é multifatorial, causada pelo somatório de várias alterações genéticas (INCA, 2019). Dentre elas, estão as adquiridas durante a vida do indivíduo, a predisposição genética e aquelas causadas pela exposição a fatores de risco, como radiação ionizante (raios-X, por exemplo) a radioterapia, ou exames excessivos envolvendo radiação (tomografia). Para o Brasil, no biênio 2018-2019, foram estimados 5.810 casos novos de câncer no SNC (sistema nervoso central) em homens e 5.510 em mulheres (INCA, 2019).

O atual tratamento do glioma envolve cirurgia e aplicação combinada de radioterapia e quimioterapia. Embora seja observado algum progresso, o tratamento clínico do glioma permanece difícil devido à sua forte capacidade de invasão e resistência aos tratamentos (LIU et al., 2019).

2.4. Adenocarcinoma do Colorretal

Câncer colorretal (CCR) é um termo que se refere a todas as neoplasias malignas originadas no epitélio do intestino grosso (cólon) e do reto, outra denominação é câncer de cólon e reto (INCA, 2019). O CCR é a terceira neoplasia maligna mais comum em homens e a segunda mais comum em mulheres no Brasil (Figura 1). Além do mais, a taxa de sobrevivência é de 5 anos em 63% dos casos, sendo reduzida a 10% quando acompanhado de diagnóstico de metástases (DENIPOTEI et al., 2010).

Esse câncer é classificado em câncer de cólon proximal, distal e retal, de acordo com os diferentes sítios anatômicos originários do tumor. O adenocarcinoma é a manifestação histológica mais frequente, correspondendo a mais de 90% dos casos (AZEVEDO, 2017). A formação e progressão desse câncer é descrita pela transição de criptas normais a adenoma (pólipos adenomatosos) e, posteriormente, a adenocarcinoma, processo que pode levar de 10 a 20 anos (AZEVEDO, 2017). O estágio inicial da carcinogênese colorretal, se dá pela formação de pólipos, os quais são protuberâncias que se projetam no lúmen intestinal, sendo assim considerados lesões pré-malignas. Posteriormente, há formação de lesões mais invasivas, chamadas de pólipos adenomatosos (adenoma). A detecção precoce das criptas precursoras dos adenomas demonstra uma redução da mortalidade de pacientes. De fato o CCR é uma malignidade ímpar em termos da abundância de lesões pré-neoplásicas e/ou pré-cancerosas (TANAKA, 2009).

Os principais fatores de risco são histórico familiar de câncer de cólon e reto e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (como os pólipos adenomatosos). A idade também é um fator relevante a ser considerado, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade ocorrem de forma diretamente proporcional ao aumento da idade (DENIPOTEI et al., 2010).

Estima-se 36.360 novos casos de CCR no Brasil no biênio 2018-2019, sendo 17.380 em homens e 18.980 em mulheres (INCA, 2019). As modalidades terapêuticas disponíveis para o tratamento do CCR incluem a ressecção cirúrgica da área do intestino afetada, seguida de quimio e radioterapias (AZEVEDO, 2017).

2.5. Quimioterapia antineoplásica e busca de novos fármacos

Nos últimos anos, foram feitos avanços importantíssimos na terapia do câncer. Contudo, até o presente momento, ainda não há um tratamento eficaz para pacientes com diagnóstico tardio. As terapias atualmente empregadas para o combate ao câncer são a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia, a hormonioterapia e a cirurgia (INCA, 2019). Dentre elas, a quimioterapia é a modalidade mais utilizada, visto que cerca de 90% dos tumores podem ser tratados com quimioterápicos (grupo de aproximadamente 300 drogas), os quais possuem função antineoplásica. Nesse

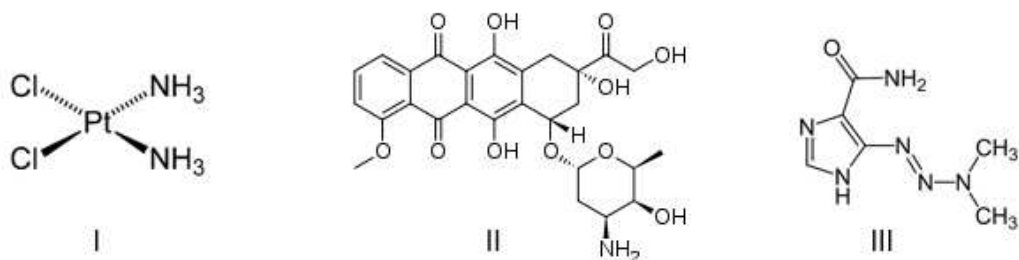
tratamento, são utilizadas doses que se aproximam das doses máximas toleráveis pelo indivíduo, administradas com a maior frequência possível, a fim de desestimular a reincidência do tumor (TONON et al., 2007; SCHULZE, 2007).

Entretanto, destaca-se como um grande problema no tratamento do câncer o desenvolvimento de resistência de algumas populações de células tumorais aos quimioterápicos antineoplásicos conhecidos, bem como o aparecimento de efeitos colaterais adversos. Uma vez que essas drogas não são seletivas, com IS abaixo ou próximo de 1.0, elas também são tóxicas aos tecidos sadios (SAITO, 2014; TONON et al., 2007; VIDAL et al., 2014),

Ainda assim, os tratamentos mais específicos como inibidores de vias específicas e de interferon são muito onerosos tanto para o SUS quanto para unidades particulares. Vale ressaltar a pesquisa feita por SOUZA (2009) entre os anos de 2000 e 2007, apresenta que, somente no estado de São Paulo, o custo do tratamento nos estágios mais avançados do melanoma é superior a 66 mil reais por pacientes no SUS e 130 mil reais em convênios.

Diversas drogas que interagem com o DNA vêm sendo utilizadas com grande potencial quimioterápico como a Cisplatina, a Doxorubicina e Dacarbazina (Figura 3). As combinações desses quimioterápicos com compostos mais específicos mostram um aumento na sobrevida dos pacientes. Por exemplo, no tratamento combinado de Dacarbazina com Cisplatina, Vimblastina, Interferon alfa e Interleucina – 2, verificou-se que 21% alcançaram resposta completa ao tratamento e 43% apresentaram resposta parcial com duração média de 6 meses. Por outro lado, o custo de cada ampola de darcarbazina de 200 mg é em torno de 250,00 reais (Nascimento, 2018).

Figura 3 – Estruturas químicas da Cisplatina (I), Doxorubicina (II) e Dacarbazina (III).

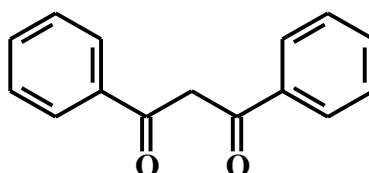


Porém, apesar do sucesso terapêutico que esses complexos quimioterápicos têm demonstrado, ainda há obstáculos comuns inerentes à administração dos mesmos, como a seleção de células resistentes aos mecanismos de citotoxicidade e o surgimento de efeitos colaterais, podendo culminar no óbito do paciente (FAGHFURI et al., 2015; CAMARGO, 2010; TORRES, 2012).

Diante dos fatos apresentados, a busca por novos fármacos que apresentem vias mais eficientes de distribuição de medicamentos para células tumorais constitui atualmente um dos desafios encontrados pelas pesquisas. Nesse contexto, dentre as diversas classes de compostos descritos na literatura com atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, encontram-se os dibenzoilmetanos – 1,3-difenil-propano-1,3-diona – (DBM), Figura 4. Essas substâncias pertencentes à classe dos flavonoides, raramente encontrados na natureza e têm sido isolados de alguns gêneros de *Lonchocarpus*. Esses por sua vez, ocorrem em formações florestais geralmente associadas às margens de rios, como as famílias de leguminosas e, especialmente, Fabaceae (MAGALHÃES et al., 1996, 1997; NOGUEIRA et al., 2003).

Os DBMs e seus derivados têm sido foco de estudos por se mostrarem potentes agentes farmacológicos devido à capacidade de formar um grupo raro de pequenas β -dicetonas (Figura 5) com diversas propriedades farmacológicas, como fotoproteção e atividades anti-inflamatória, antitumoral e antiviral (QUIRINO et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2003).

Figura 4 – Estrutura química do DBM.

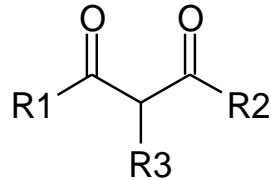


2.6. As β -dicetonas

As β -dicetonas (Figura 5) têm se destacado nos últimos anos devido à atividade antitumoral promissora frente a diversos cânceres. A presente revisão busca

apresentar a ação de alguns desses compostos de origens sintética e natural, aqui representados pelo dibenzoilmetano (DBM), nos mais variados tipos de câncer.

Figura 5 – Estrutura geral das β -dicetonas.



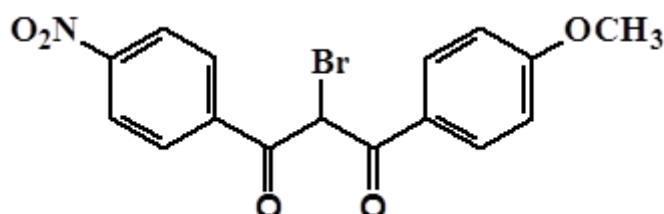
Pode-se dizer que as β -dicetonas, devido a ação antitumoral que apresentam, têm se demonstrado como compostos bastante promissores, tanto na forma livre, ou na forma complexada com metais como Cu e Pt (NOGUEIRA et al., 2003; WILSON, 2012). Tais compostos podem ser encontrados naturalmente em algumas plantas como Annonaceae, Astraceae, Menispermaceae, Rosaceae, Salicaceae e, especialmente, Leguminosae (BLATT et al., 2002), como também podem ser obtidos por meio de síntese orgânica (MAGALHÃES et al., 1997). Dentre eles, estão os dibenzoilmetanos (DBM), cuja atividade antitumoral e fotoprotetora vêm sendo descritas em diversos estudos (SINGLETERY et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2003; NAKANO et al., 2004; KHOR et al., 2009).

A suplementação com 1% do composto derivado sintético de dibenzoilmetano (7,12-dimetilbenz[a]antraceno - DBMA) na dieta de ratas foi capaz de reduzir significativamente o tumor mamário nesses animais, evidenciando assim sua atividade antineoplásica, (SINGLETERY et al., 1998; LIN et al., 2001). Um efeito similar foi observado por Shen e colaboradores (2007), em que o emprego de uma dieta contendo Sulforaphane (SFN) e DBM na dose de 1 % isoladamente, ou em combinação, foi capaz de suprimir, significativamente a tumorigênese do colo retal no modelo de animal com mutação. Tais resultados evidenciam não somente o poder antitumoral, como também o efeito quimiopreventivo dessa classe de compostos.

Ishida e colaboradores (2002), após avaliarem os efeitos citotóxicos in vitro de 26 derivados sintéticos do DBM frente a linhagens tumorais humanas diversas, obtiveram um análogo mais potente contra várias linhas celulares, incluindo HOS

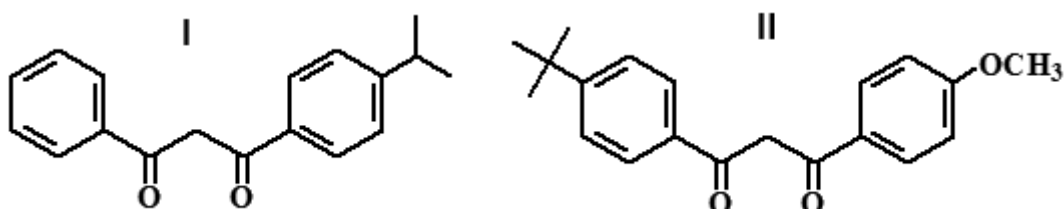
(câncer de osso) e 1A9 (câncer da mama), que está representado pela Figura 6, um derivado α substituído de DBM.

Figura 6 – Derivado de DBM mais potente contra linhagens de células Câncer de Ovário (1A9) e câncer de osso (HOS).



Dibenzoilmetanos também apresentam atividade fotoprotetora. O Eusolex® 8020 e o Parsol® 1789, Figura 7, são utilizados na indústria cosmética como componentes de filtros solares, sendo, em sua maioria, muito eficientes contra radiação UVA, por prevenir sua penetração nas células (NOGUEIRA et al., 2003).

Figura 7 – Estruturas química do Eusolex® 8020 (I) e o Parsol® 1789 (II).



Nogueira e colaboradores (2003), descreveram a síntese e caracterizaram dezenove compostos derivados desses dibenzoilmetanos (Eusolex® 8020 e Parsol® 1789). Foi feita a avaliação da atividade antitumoral e citotóxica dos derivados sintéticos em quatro linhagens celulares de diferentes tipos de câncer humano, a saber, MCF 7 (mama), NCI ADR (expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas), NCI 460 (pulmão) e UACC 62 (melanoma). Dentre esses, um total de oito dos 19 derivados mostraram citotoxicidade contra as quatro linhas celulares citadas. Espectroscopias de absorção revelaram que essas substâncias podem ser usados como protetores solares contra a radiação UV, e que inclusive uma delas se mostrou altamente estável após avaliação de fotoestabilidade por exposição à luz ultravioleta por nove horas. Além da estabilidade, o mesmo composto apresentou IC₅₀

(concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular) menor que a o composto doxorubicina (agente quimioterápico de ampla utilização) para melanoma.

Além de todas essas atividades, o DBM e seus derivados também tem se mostrado capazes de induzir apoptose e interrupção do ciclo celular em células de câncer humano de próstata (Jackson et al., 2002) e em células de câncer de cólon (Hong, 2007). Adicionalmente, eles têm a propriedade de evitar a formação de adutos de DNA induzidos por carcinógenos in vitro e in vivo em glândulas mamárias (LIN, 2001) e nos pulmões, por meio da ativação da via de desintoxicação do Nrf2 (THIMMULAPPA et al., 2008).

Em trabalhos previamente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (Oliveira, 2017; Nascimento et al., 2018; Baêta, 2019), foram descritos derivados do DBM com atividade antimelanoma in vitro e in vivo com valores de IC₅₀, IC₉₀ e índices de seletividades robustos, sem a observação de efeitos tóxicos nos testes avaliados. Dessa forma, a possibilidade de testar derivados inéditos de DBM em linhagens tumorais variadas tem mostrado ser uma estratégia promissora para o tratamento do câncer.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar um derivado inédito na literatura do DBM e avaliar sua atividade antitumoral in vitro, a fim de verificar se tal composto é possuidor de características desejáveis a um novo fármaco, apresentando IC₅₀ e IS superiores ao valor mínimo considerado significativo em ensaios de novas drogas.

3. METODOLOGIA

3.1. Crescimento das células in vitro (cultivo celular)

A linhagem celulares tumoral B16F10, derivada de um melanoma murinho (FIDLER, 1975) obtida da prof^a. Mirian T. Paes Lopes do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, C6 estabelecida a partir glioma de ratos Wistar (BENDA et al., 1968), recuperada de estoque de células do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa e SW480, estabelecida a partir de um adenocarcinoma primário do cólon humano (ATCC CCL-228), cedida pelo Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, da Universidade

Federal de Viçosa, foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) (Sigma-Aldrich) e RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma-Aldrich) 1:1, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml e suplementados com 10 % de soro fetal bovino (todos Sigma-Aldrich) sendo assim denominado meio completo (MC). As linhagens normais Melan-A derivada de melanoblastos epidermais normais de camundogos C57BL/6 (BENNETT et al., 1987), obtida do ICESP (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo) e VERO estabelecidas a partir do epitélio renal de *Cercopithecus aethiops* (Yasumura et al., 1963), cedida pelo Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, da Universidade Federal de Viçosa, foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura RPMI1640 (Sigma-Aldrich), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml, suplementados com 10 % de soro fetal bovino (MC) (todos Sigma-Aldrich). Os frascos de cultura de poliestireno de cada linhagem foram mantidos em incubadora (MCO-18AC Panasonic, U.S. Canada) a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Quando as culturas atingiam a subconfluência, as culturas eram lavadas em solução PBS-EDTA (2gxL⁻¹) (Sigma-Aldrich) e removidas com solução de tripsina-EDTA (2,5gxL⁻¹) (Sigma-Aldrich), replaqueadas ou congeladas em N₂ líquido.

3.2. Síntese e caracterização do composto IP₂-DBM

3.2.1. Alquilação

A síntese do derivado IP₂-DBM foi realizada de acordo com a patente PI0006583-8, no Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais da Universidade Federal de Viçosa. De maneira geral, a síntese foi realizada a partir de carbonato de potássio (3,0 equiv.) e DBM (1,0 equiv.). A mistura foi suspensa em acetona (20 mL) e agitada durante 30min à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado o reagente de alquilação - bromopropano (1,0 equiv.), e a mistura foi submetida a agitação por 60 horas e monitorada por cromatografias de camada delgada (CCD), feitas em cromatofolhas de alumínio revestida com sílicagel G F₂₅₄ 0,2 nm Art. 1.05554 Merck. Para a revelação, foram utilizadas lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e solução de ácido fosfomolibdico (Merck, 1971), por nebulização em placa seguida de aquecimento.

Por fim, a mistura foi filtrada, o solvente foi evaporado e o produto resultante foi purificado por cromatografia de camada delgada de sílica. As frações separadas foram enviadas para a análise por ressonância magnética nuclear (RMN).

3.2.2. Espectrometria de Massas

O espectro de massa do composto IP₂-DBM foi obtido no espectrômetro Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra, com coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor e da fonte foi de 290°C. Para a coluna, a temperatura inicial foi de 80°C por 5 minutos, a qual foi aumentada até 285 °C, com taxa de 4 °C/minuto, com permanência nessa temperatura durante 40 minutos. A temperatura na interface do sistema foi de 290°C. O detector de massas foi operado com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 35 a 700 Da.

3.2.3. Ressonância magnética nuclear

A caracterização do composto foi realizada por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C. Os espectros de RMN de ¹H (400 MHz) e de ¹³C (100 MHz desacoplado), DEPT 90 e DEPT 135, foram obtidos em espectrômetros Inova 400 da Varian. Os solventes utilizados foram dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), usando-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS) para espectros de RMN ¹H.

3.3. Atividade citotóxica do composto medida pelo ensaio do MTT

Frascos de cultivo contendo cada uma das culturas em monocamada subconflente foram tripsinizadas e, decorrido tempo de dissociação celular, ressuspensas, em meio de cultura contendo soro (MC). Esta suspensão foi submetida a centrifugação por 5min a 700xg e ressuspensa em MC. Em seguida, foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Dados de experimento piloto foram utilizados para a escolha do número de células a serem plaqueadas em cada poço da placa de 96 poços.

Esta suspensão foi submetida à centrifugação por 5min a 700xg e ressuspendida em MC. Em seguida foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Dados de experimento piloto foram utilizados para a escolha do número de células a ser plaqueado em cada poço da placa de 96 poços.

A partir deste experimento, as células foram plaqueadas nas concentrações de 1×10^3 células/mL e 1×10^4 células/mL, para as linhagens tumorais e para as linhagens normais, respectivamente. A cada poço foi adicionado 100 μ L de MC e suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade em seus respectivos meios de cultura. Após esse período, foram adicionadas diferentes concentrações de IP₂-DBM às células, as quais foram incubadas por 60 horas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. As diferentes concentrações de IP₂-DBM foram obtidas a partir de diluição em série em DMSO e MC, com concentrações entre 6,25 μ g/mL e 400 μ g/mL, de forma que em cada poço a concentração de DMSO não ultrapassasse 0,5%. Para cada concentração do composto e para cada linhagem celular, foram utilizados cinco repetições (poços) por placa, cada experimento foi repetido 3 vezes. Os controles deste ensaio (100% de células viáveis) foram realizados com meio de cultura contendo 0,5% de DMSO (v/v). O mesmo tratamento foi realizado com as drogas Dacarbazina, Cisplatina e Doxorubicina.

Decorrido o período de incubação, o meio contendo as drogas foi removido. A seguir, todos os poços foram lavados com PBS, e a cada um deles foram adicionados 50 μ L de uma solução de MTT (3-{4,5- dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio bromido) a 0,5 mg/mL. As placas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 4 horas. Após esse período, o MTT foi retirado de todos os poços, e os cristais de formazan foram solubilizados em 100 μ L de DMSO. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento).

3.3.1. Cálculo da concentração inibitória de 50% das células (IC₅₀)

O valor da concentração inibitória de 50% das células (IC₅₀) foi calculado por meio de uma regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células viáveis), utilizando os programas GraphPad Prism® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®.

3.3.2. Índice de Seletividade

A concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi calculada para cada linhagem, e serviu para o cálculo do índice de seletividade (IS) do composto. O IS indica a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, e conseqüentemente, o potencial uso terapêutico desse composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da IC_{50} do composto sobre a linhagem de células normais (Melan-A e VERO) e o valor da IC_{50} do composto sobre a linhagem de células neoplásicas (B16F10, C6 e SW40), ou seja:

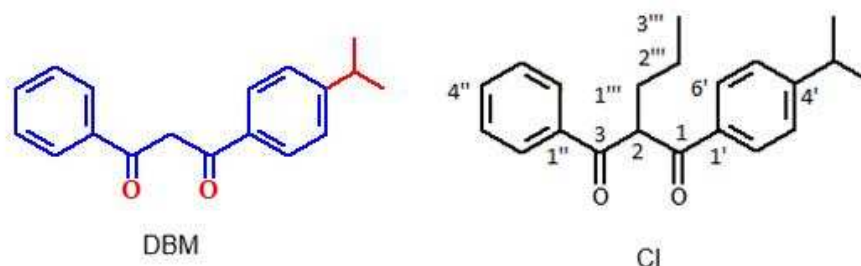
$$IS = \frac{IC50_{linhagem\ normal}}{IC50_{linhagem\ neoplásica}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e caracterização do composto

Na primeira etapa da síntese com duração de 72 horas, foi obtido o composto alquilado. A síntese procedeu-se de acordo com a patente PI0006583-8. A evolução da reação foi acompanhada por meio de CCD, como mostrado na Figura 8.

Figura 8 – Cromatografia de camada delgada (CCD) da primeira etapa da síntese (alquilação do dibenzoilmetano). Após 72 horas a mistura de reacional foi submetida a cromatografia de camada delgada de fase móvel composta por solução de hexano e diclorometano (9:1) e fase estacionária composta por sílica. DBM: dibenzoilmetano; Cl: composto alquilado.



Após as etapas de separação, purificação e filtração, o composto foi submetido à espectrometria de massas e RMN.

4.1.1 Rendimento da reação

O rendimento da reação foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{\text{Produto final (g)}}{\text{Reagente de partida (g)}} \times 100$$

Assim, partido-se de 200 mg ($0,75 \times 10^3$ mols) do reagente de partida e obtendo-se 113,8 mg ($0,37 \times 10^3$ mols) de produto final, temos que o rendimento da reação foi de 56,9%, visto que a equivalência molar entre o reagente de partida e o produto final é 1 para 1.

4.1.2 Espectrometria de Massas

Como parte da verificação da reação, o composto foi submetido à espectrometria de massas (dissolvido em acetonitrila HPLC na concentração de 1 mg/mL), Figuras 9 e 10, realizada no Departamento de Química da UFV. O identificado de massa m/z 308 (Figura 10) foi fragmentado e as propostas estruturais dos fragmentos foram feitas para as seguintes massas: m/z 77, m/z 91, m/z 105, m/z 105, m/z 266 e m/z 293, representadas na Figura 11.

Figura 9 - Perfil do padrão contendo IP₂-DBM concentração 1,00 mg/mL (área vs. tempo de retenção em s.)

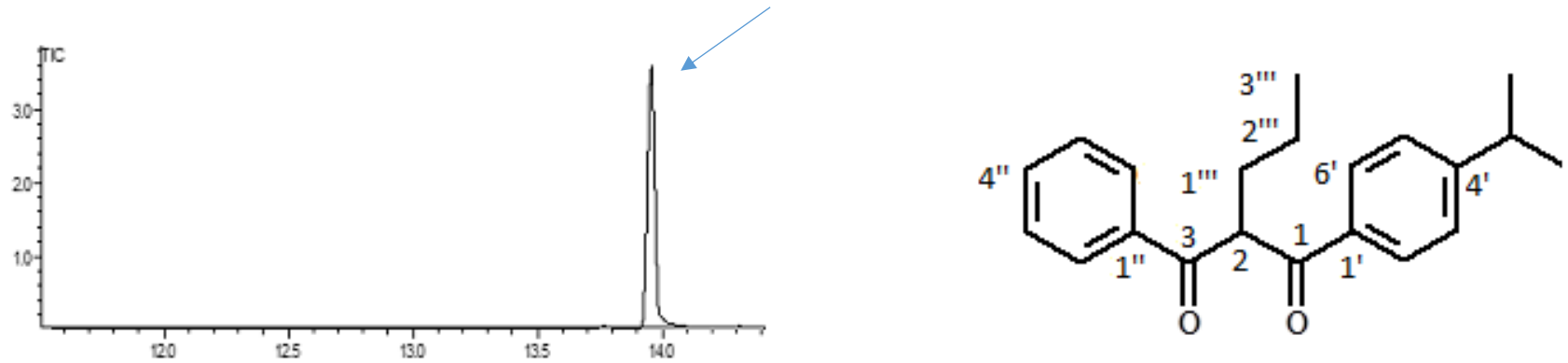


Figura 10 - Espectro de massas do composto IP₂-DBM, na concentração de 1,00 mg/mL.

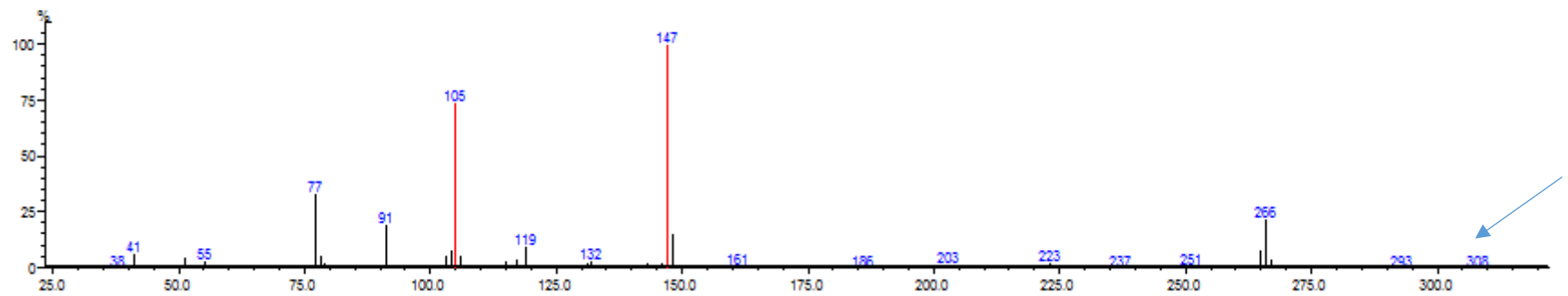
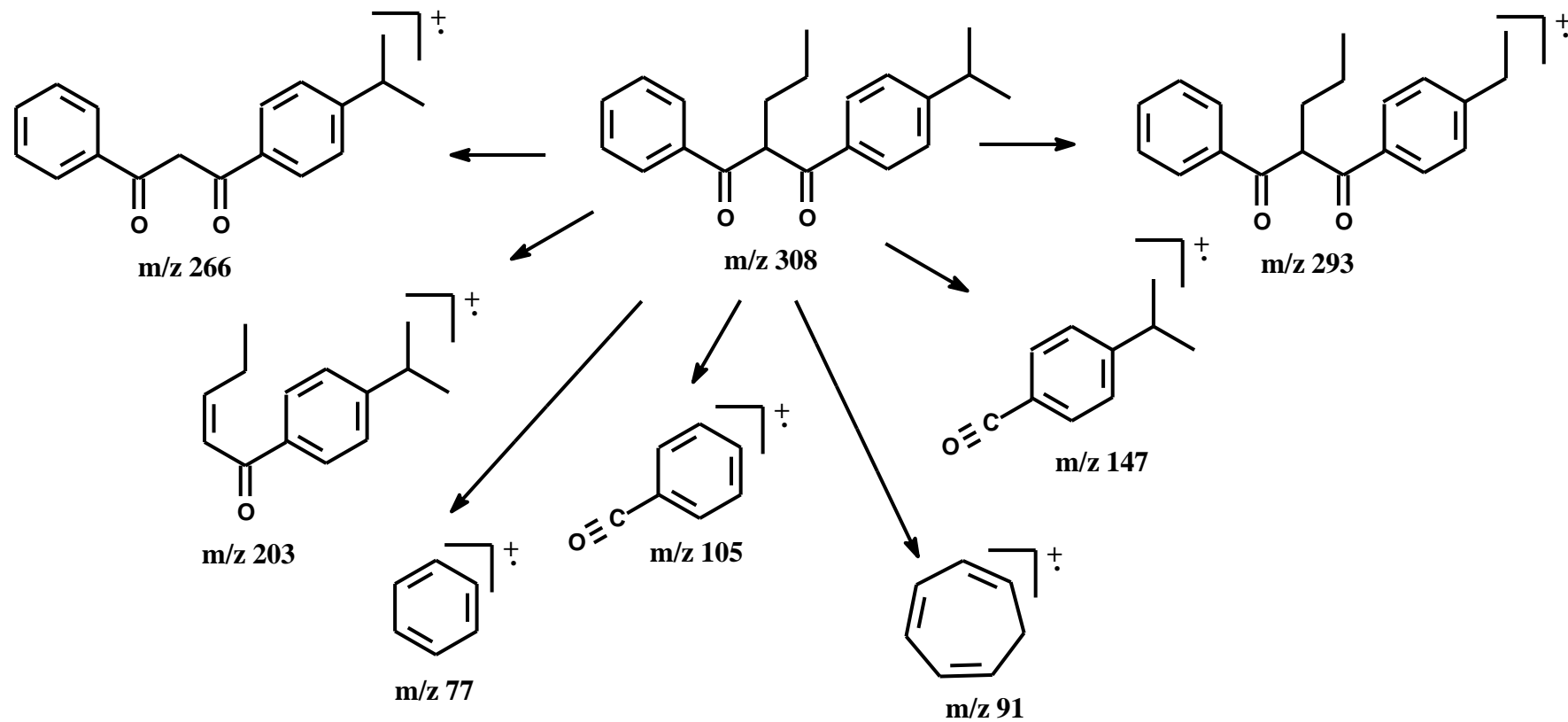


Figura 11 - Proposta de fragmentação do composto IP2-DBM. Fragmentos e suas respectivas massas: m/z 77, m/z 91, m/z 105, m/z 105, m/z 266 e m/z 293.



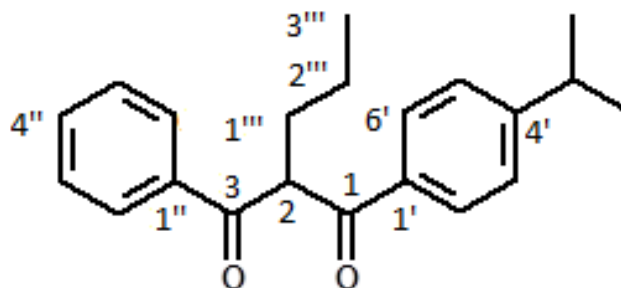
4.1.3. Espectrometria de Hidrogênio e Carbono

O composto IP₂-DBM foi identificado com base nos espectros de hidrogênio, carbono 13 e DEPT. As Figuras 13, 14 e 15 apresentam os espectros de RMN 1H em DMSO-d₆, nos quais podem ser observados os sinais referentes a dois anéis aromáticos, sendo um deles monossustituído, com absorções características para o grupo isopropila em δ 2,94 (1H, hepteto, $J = 7$ Hz, H_{isopropil}). Os sinais em δ 1,21 (3H, s, CH₃) e δ 1,19 (3H, s, CH₃) referem-se às duas metilas. Ademais, os sinais característicos para o grupo propila se apresentam em δ 1,85 (2H, m, H1''', referente a CH₂), δ 1,35 (2H, m H 2''', referente a CH₂) e em δ 0,88 (3H, t, $J = 7$ Hz, H3''', referente ao CH₃ terminal).

Os espectros de RMN C¹³ estão apresentados nas Figuras 16, 17 e 18. O sinal em δ 54,9 refere-se ao carbono C-2, em δ 31,2 ao carbono C-1''', em δ 20,7 ao carbono C-2''' e em δ 14,1 ao carbono C-3''' do grupo propila. Os sinais em δ 33,5, 23,4 e 23,38 referem-se aos carbonos do grupo isopropila. Já os sinais em δ 196,8 e 196,3 (C-1 e C-3) referem-se às carbonilas. Em conjunto, esses sinais corroborando a estrutura proposta (Figura 12).

As Figuras 19 e 20 apresentam os espectro de DEPT 135, as quais mostram os picos referentes a nove carbonos C-H de aromáticos, dois CH₂ do grupo propila, dois CH₃ do grupo isopropila, um CH₃ do grupo propila, um CH do grupo isopropila e um CH do dibenzoilmetano.

Figura 12 – Estrutura química do 1-[(4'-iso-propil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3 propanodiona (IP₂-DBM).



Aspecto Físico: Sólido amorfo incolor

Peso Molecular: 308

MS [m/z (ν rel. int.)]: 147,0 (100), 105,0 (76), 91,0 (25), 77,0 (40), 266 (20).

RMN ^1H δH (400 MHz; CDCl_3 ; TMS): 7,97 (2H, dd, $J = 10$; 2Hz, H-2'', H-6''); H-2', H-6'), 7,90 (2H, dd, $J = 10$; 2Hz, H-2', H-6'), 7,40-7,58 (6H, m, H-3'', 4'', 5'', 3', 4', 5'), 5,68 (1H, t, $J = 7$ Hz, H-2) 2,94 (1H, hepteto, $J = 7$ Hz, $\text{H}_{\text{isopropil}}$), 1,85 (2H, m, H1'''), 1,35 (2H, m, H 2''') 1,21 (3H, s, CH_3), 1,19 (3H, s, CH_3), 0,88 (3H, t, $J = 7$ Hz, H3''').

RMN ^{13}C δC (100 MHz; CDCl_3 ; TMS): C-1'' (136,0 C_O), C-2''-C-6'' (128,9 C-H), C-3''-C-5''; (128,6 C-H), C-4'' (133,7 C-H), C-1' (133,5 C_O), C-2'; C-6' (128,9 C-H) C-3';C-5' (127,0 C-H), C-4' (154,7 C-H), C-3 (196,3 C = O), C-2 (54,9 C-H). C-1 (196,8 C = O), $\text{C}_{\text{isopropil}}$ (33,5), CH_3 isopropil (23,4 e 23,3), CH_2 (31,2 C-1'''), CH_2 (20,7 C-2''') CH_3 (14,1 C-3''').

Figura 13 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) do composto $\text{IP}_2\text{-DBM}$ com supressão do sinal da H_2O .

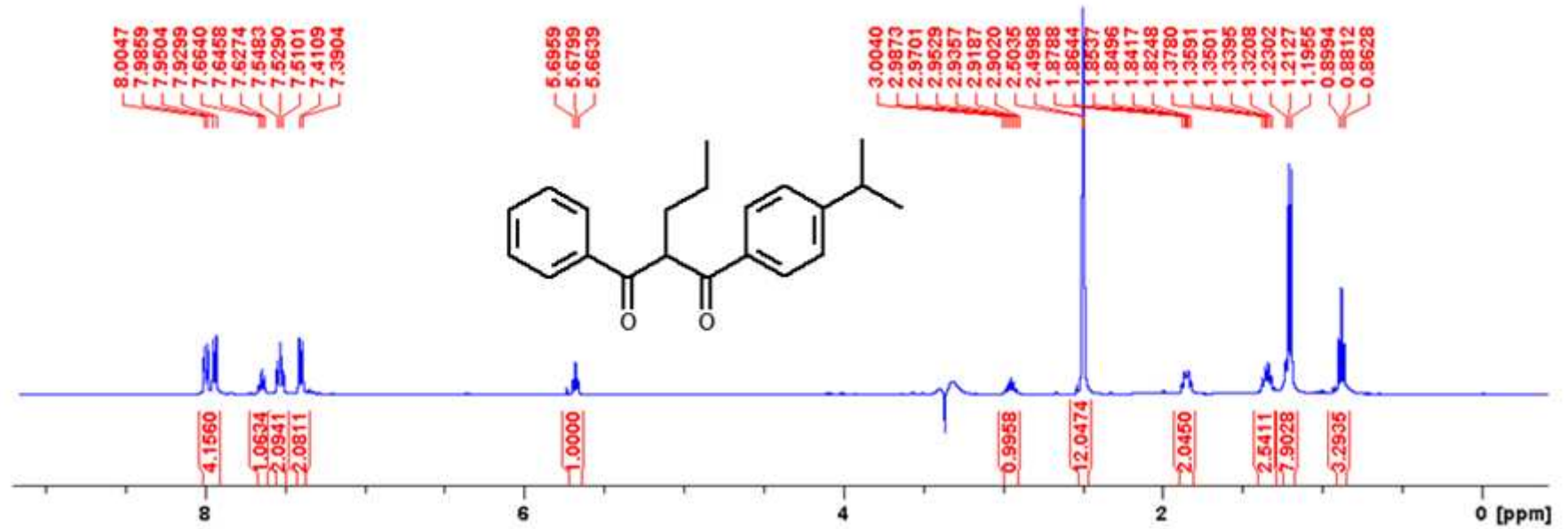


Figura 14 - Ampliação da região de 8.0 a 6.0 ppm do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) com supressão do sinal da H_2O do composto $\text{IP}_2\text{-DBM}$.

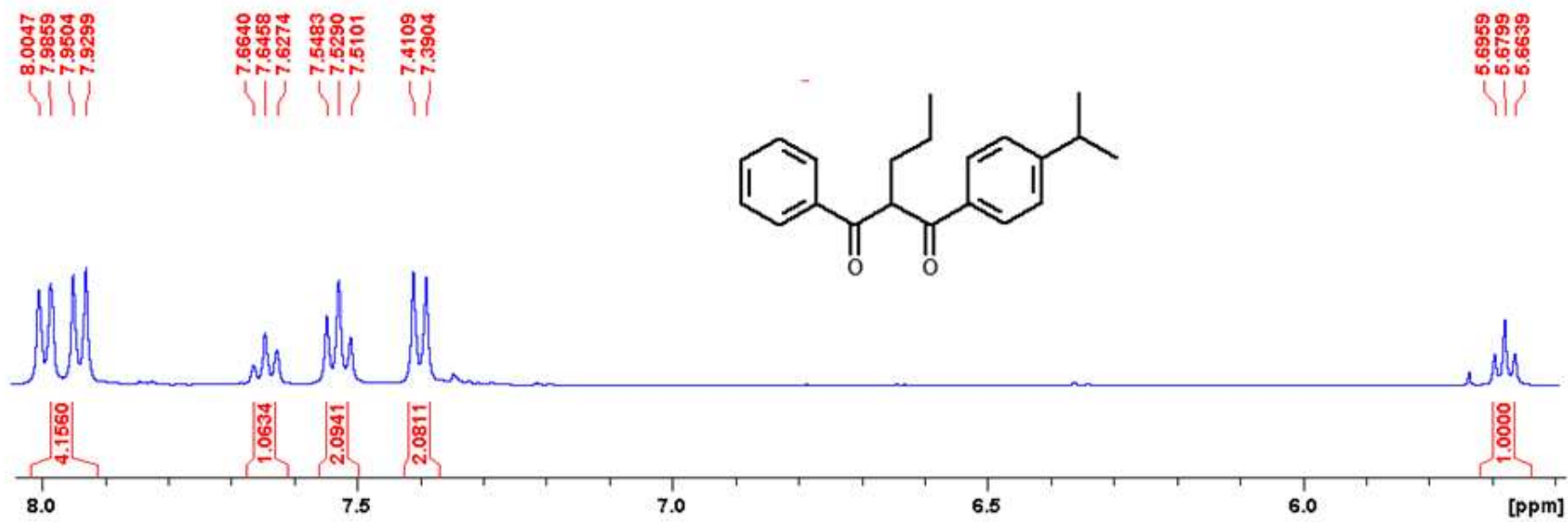


Figura 15 – Ampliação da região de 3.0 a 1.0 ppm do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) com supressão do sinal da H_2O do composto $\text{IP}_2\text{-DBM}$ (extensão B).

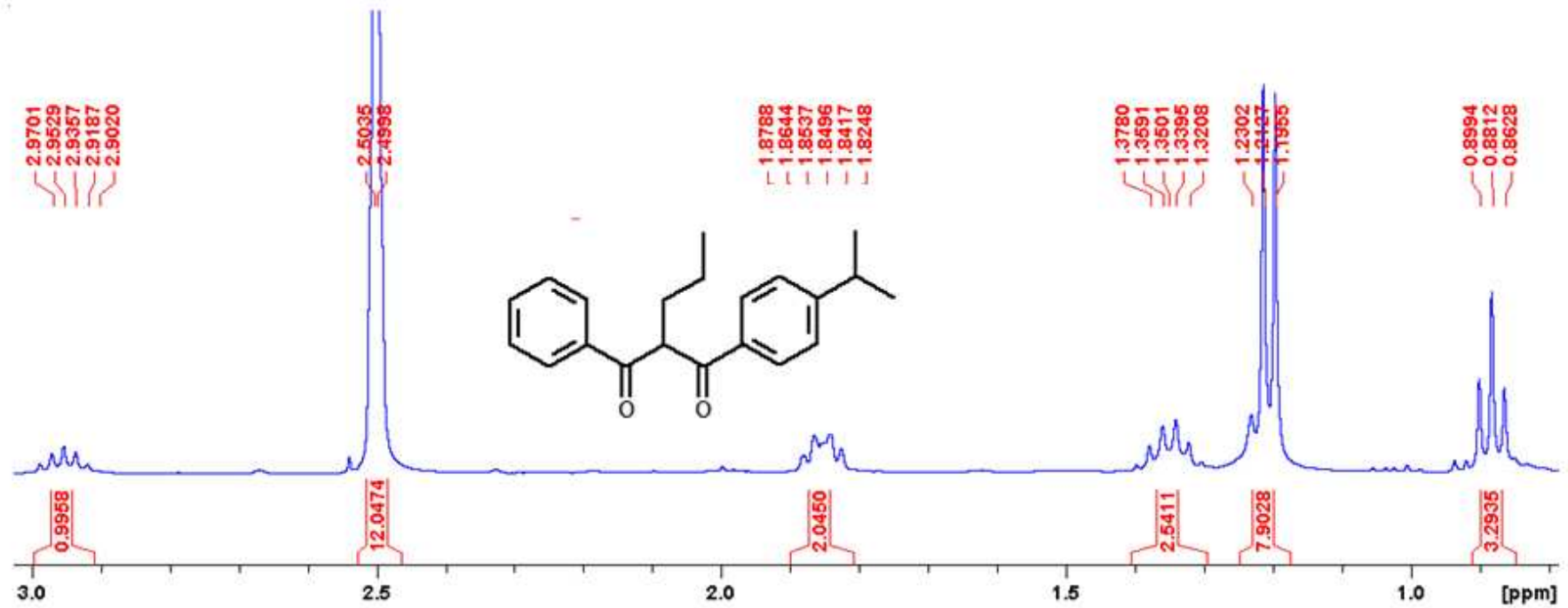


Figura 16 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto IP $_2$ -DBM.

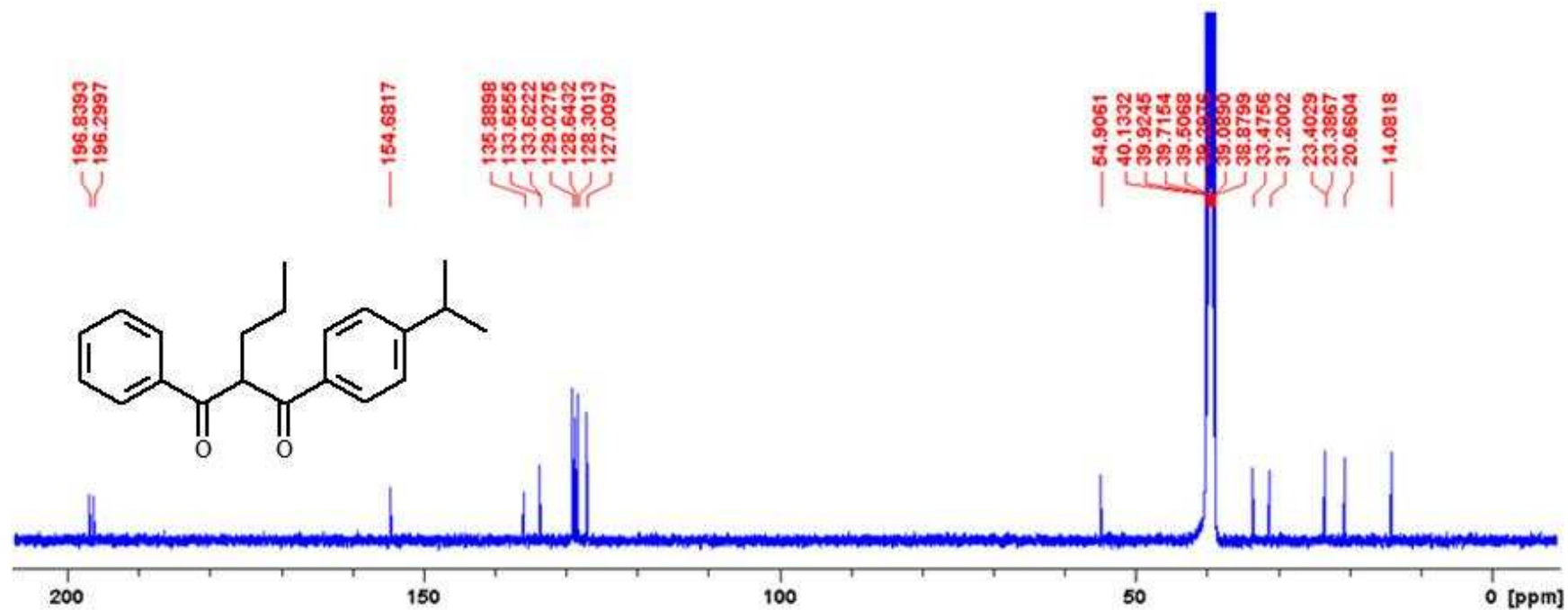


Figura 17 – Ampliação da região de 12 a 56 ppm do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto IP₂-DBM.

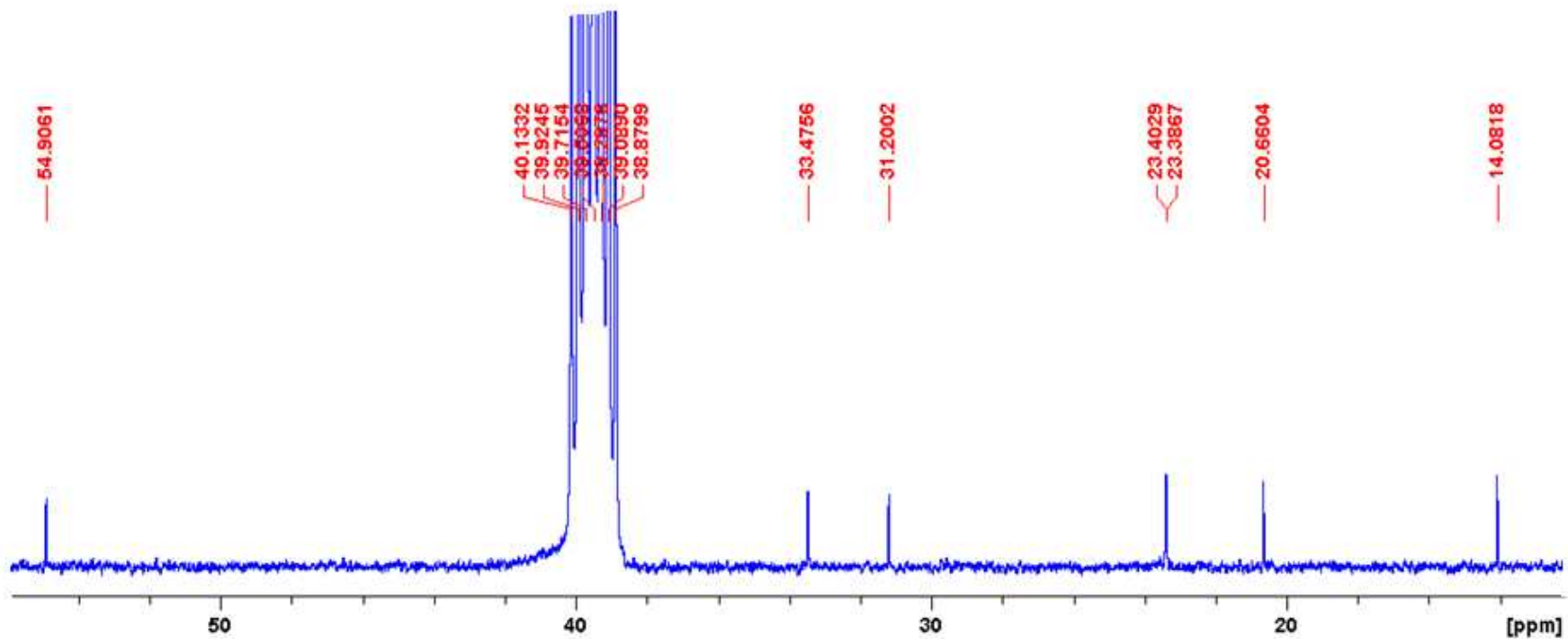


Figura 18 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto IP $_2$ -DBM.

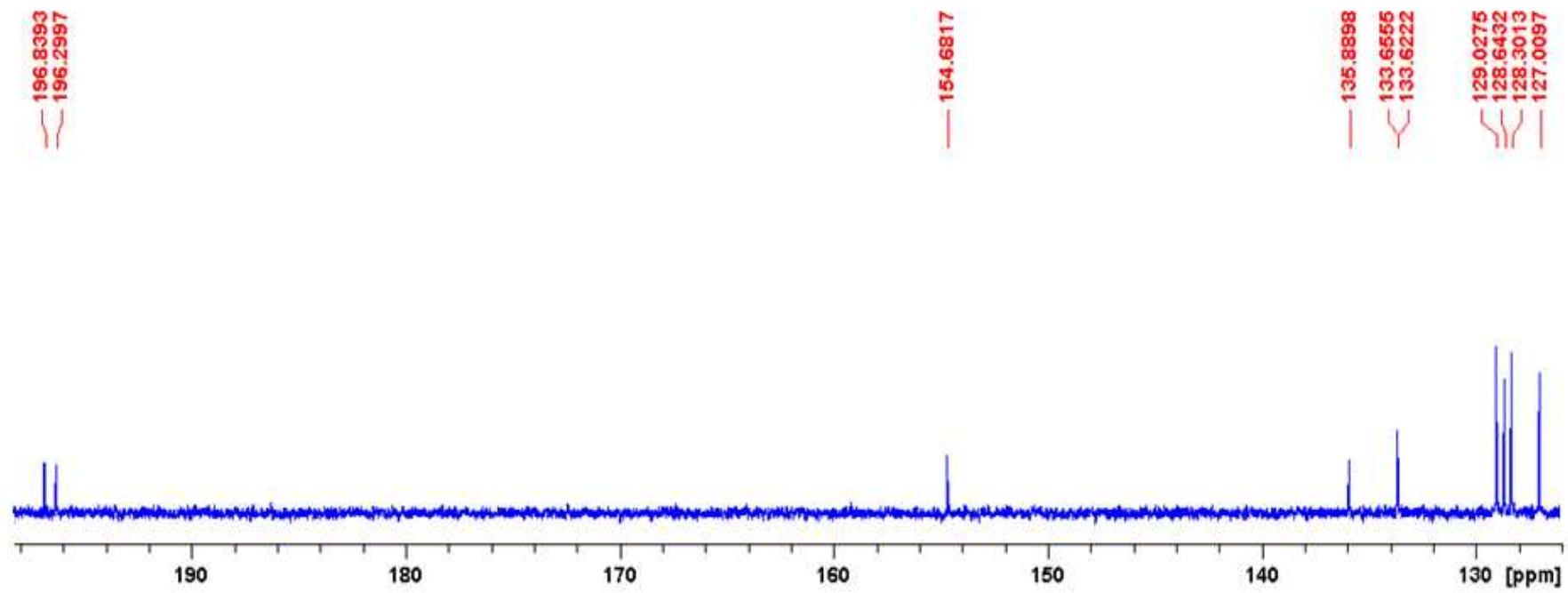


Figura 19 – Espectro de DEPT (100 MHz, DMSO-d₆) do composto IP₂-DBM.

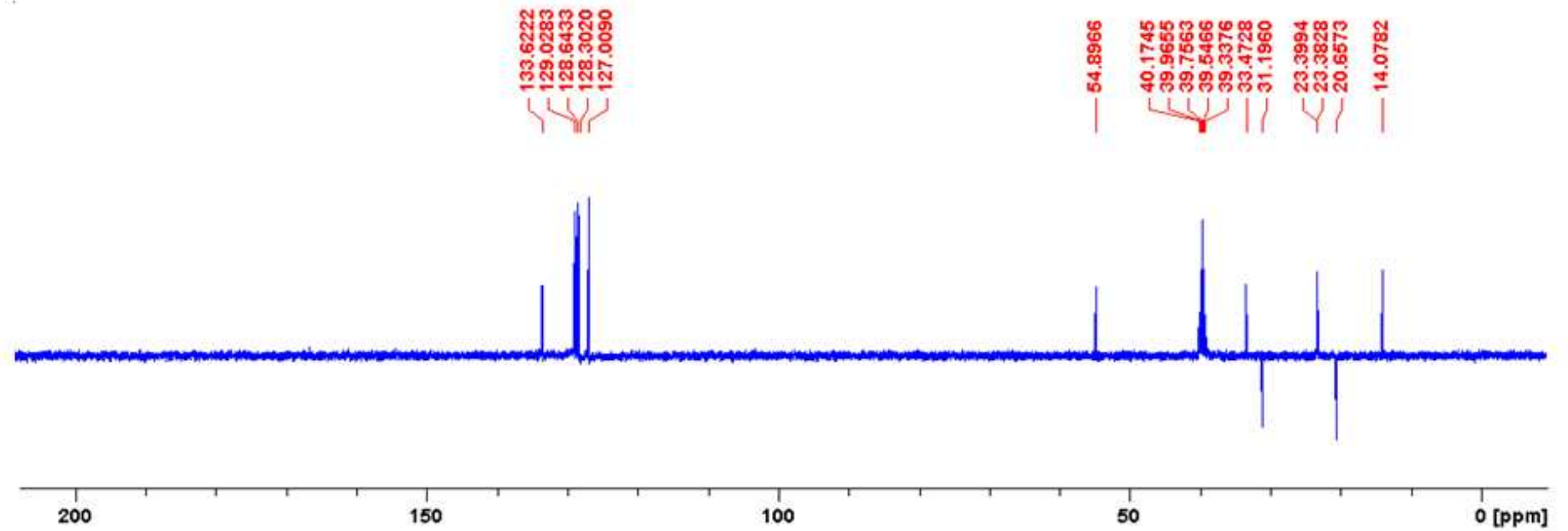
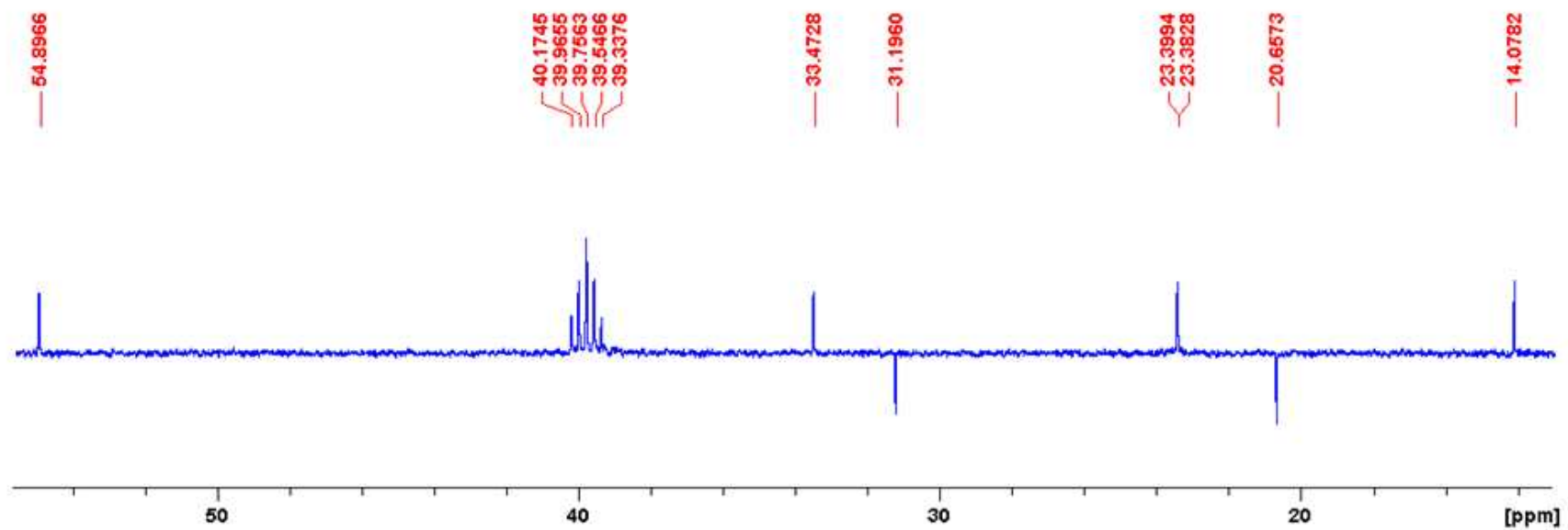


Figura 20 - Ampliação da região de 12 a 56 ppm do espectro de DEPT (100 MHz, DMSO-d₆) do composto IP₂-DBM.



4.2. Ensaio de citotoxicidade in vitro e índice de seletividade (IS)

As taxas de mortalidade celular, provenientes do ensaio de MTT, após a exposição das linhagens normais Melan-A e VERO e das linhagens tumorais B16F10, C6 e SW80 às diferentes concentrações do composto IP₂-DBM, estão representados nos gráficos das figuras 21 e 22. O valor de IC₅₀ foi calculado utilizando regressão não linear (log da concentração do composto em µg/mL versus porcentagem de morte celular). Na Tabela 1 está representado o valor do coeficiente de determinação da regressão (R²).

No tratamento com IP₂-DBM durante o período de 60 horas observou-se um efeito citotóxico proporcional à concentração do composto. Para a linhagem normal Melan-A (Figura 21), os maiores efeitos foram observados em concentrações superiores a 51,85 µg/mL (168 µM), representada pelo log[]=1,715. Por outro lado, para a linhagem normal VERO (Figura 21) observa-se que o efeito citotóxico é bastante elevado em concentrações maiores que 100 µg/mL (324 µM), representada pelo log[]=2,00.

No tratamento com o composto IP₂-DBM em linhagens de células tumorais, também durante o período exposição de 60 horas, observou-se que as linhagens de B16F10, C6 e SW480, gráficos da Figura 22, diferentemente das células normais, apresentaram viabilidade celular rigorosamente afetada. Ou seja, tais linhagens celulares são muito sensíveis ao composto em estudo, enquanto as células de linhagens normais não apresentaram tal sensibilidade, o que representa um resultado promissor, visto que o objetivo de um composto antitumoral eficaz é justamente eliminar células tumorais, sem causar danos agressivos às células normais, ou danos menores.

Figura 21 - Taxa de mortalidade celular em função da concentração do composto IP₂-DBM para as linhagens celulares normais indicadas nas legendas, após exposição de 60 horas.

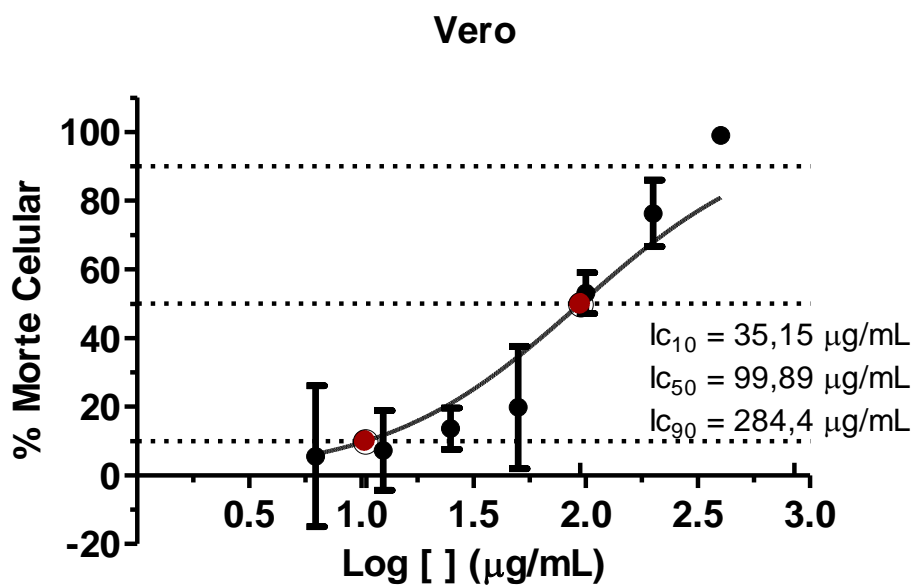
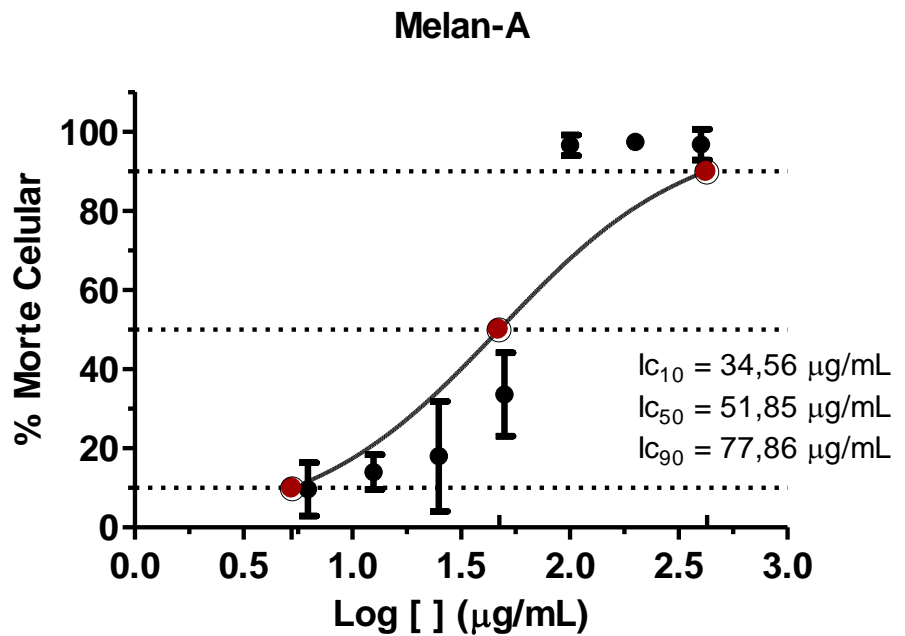
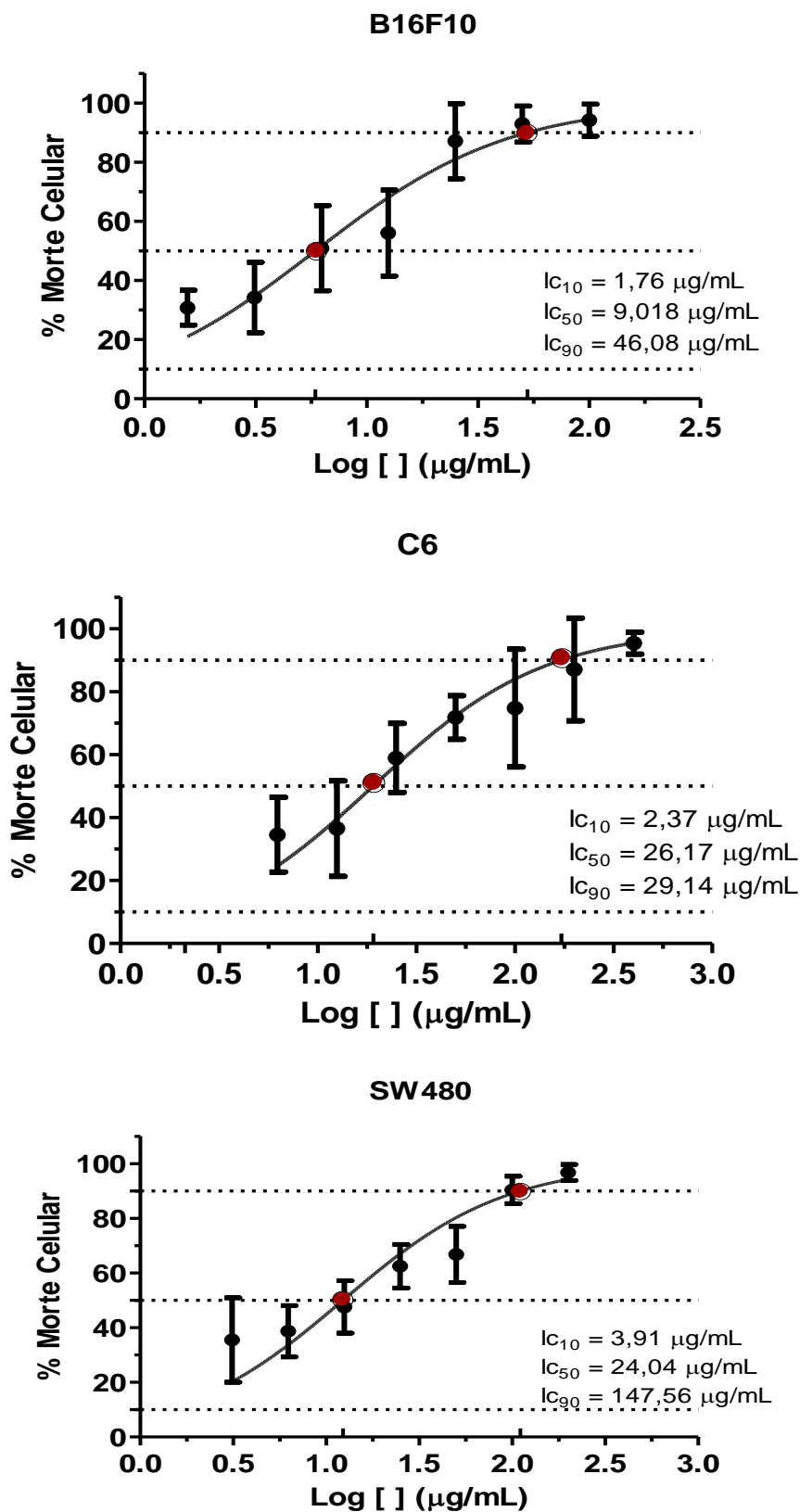


Figura 22 - Taxa de mortalidade celular em função da concentração do composto IP₂-DBM para as linhagens celulares tumorais, após exposição de 60 horas.



Com os dados obtidos pelo cálculo de efeito citotóxico, utilizando regressão não linear, foi possível estabelecer as concentrações das porcentagens de morte celular correspondentes a 50% (IC₅₀) da população total de células das linhagens submetidas ao tratamento. Esses dados estão representados na Tabela 1, juntamente com o valor do coeficiente de determinação da regressão (R²). Foi possível calcular também os valores de concentrações equivalentes às porcentagens de morte celular correspondentes a 10% (IC₁₀) e 90% (IC₉₀) da população total de células (Tabela 1), utilizando a equação da reta fornecida pelo Prism, abaixo.

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(\text{Log}EC_{50} - X) * \text{HillSlope}}}$$

A partir dos dados da Tabela 1, percebe-se que para as linhagens normais, as IC₅₀ do IP₂-DBM (IC₅₀Melan-A = 51,85 ± 3,19 µg/mL e IC₅₀vero = 99,89 ± 9,01 µg/mL) foram maiores que para as linhagens tumorais (IC₅₀B16F10 = 9,018 ± 1,06 µg/mL; IC₅₀C6 = 26,17 ± 4,18 µg/mL e IC₅₀SW480 = 24,04 ± 2,98). Em suma, esses dados mostram que a dose mínima letal necessária para matar metade da população de células tumorais é menor que a dose mínima letal para células normais. Assim, o composto desenvolvido nesse estudo apresenta seletividade para os tipos câncer tratados, o que sugere segurança terapêutica. Isso pode ser verificado se for considerado que a dose terapêutica poderia ser bem menor do que a dose que é tóxica à população de células normais, indicando um índice terapêutico alto para melanoma e intermediário pra adenocarcinoma do colerretal e glioma.

Tabela 1 - Concentrações letais do composto IP₂-DBM para cada linhagem tratada.

	Linhagem Celular				
	Melan-A	VERO	B16F10	C6	SW480
Log IC₅₀	1,715	2,000	0,9551	1,418	1,381
IC₅₀ (µg/mL)	51,85 ± 3,19	99,89 ± 9,01	9,018 ± 1,06	26,17 ± 4,18	24,04 ± 2,98
IC₅₀ (µM)	168 ± 3,19	324,3 ± 4,20	29,27 ± 1,06	84,96 ± 4,18	78,05 ± 2,98
R²	0,8983	0,8850	0,8434	0,7430	0,8335
HillSlope	5,411	2,102	1,347	0,9148	1,211
IC₁₀ (µg/mL)	34,56588	35,15857	1,764735	2,37074	3,917609
IC₉₀ (µg/mL)	77,8668	284,4257	46,08086	289,1452	147,5635

IC₅₀: Concentração inibitória de 50%.

Além disso, os valores de concentração do IC₅₀ de todas as linhagens tumorais estão em uma faixa de concentração menor que as IC₁₀ das linhagens normais. Ou seja, a concentração que mata 50% da população das células tumorais tem ação citotóxica em menos de 10% das células normais. Podemos perceber também que a linhagem VERO é a mais resistente à exposição ao IP₂-DBM. Em 1962, Nakamura e colaboradores, no Japão, estabeleceram a linhagem VERO, oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Atualmente essa é uma das poucas aprovadas para uso em produção de vacinas pela OMS, o que a torna um excelente modelo de pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas (SOUZA et al., 2005). Assim, essa linhagem foi utilizada, juntamente com a Melan-A, com intuito de comparar a atividade do composto sintetizado com quimioterápicos utilizados na clínica médica, a Dacarbazina, Cisplatina e Doxorubicina frente as linhagens tumorais.

A Dacarbazina é um antineoplásico clássico utilizado para o tratamento do câncer do tipo melanoma. Nesse presente estudo foram feitos tratamentos com essa droga para a linhagem de melanoma e linhagem normal a fim de confrontar tais resultados com os dados obtidos do composto neste estudo. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – IC₅₀ das linhagens de melanoma e normal após tratamento com Dacarbazina.

	Linhagem celular	
	Melan-A	B16F10
LogIC₅₀	2,416	2,504
IC₅₀ (µg/mL)	260,7 ± 48,6	319,4 ± 89,9
R²	0,8869	0,7645

IC₅₀: Concentração inibitória de 50%.

Os dados da Tabela 2 apresentam valores de IC₅₀ do quimioterápico Dacarbazina, os quais são muito superiores aos encontrados para o composto IP₂-DBM. Assim, é reforçada a hipótese de que o composto aqui sintetizado apresenta virtudes de um novo fármaco, potencialmente promissor para o tratamento do câncer. A partir dessa avaliação foi possível calcular e comparar os índices de seletividade (IS) do IP₂-DBM e do quimioterápico comercial utilizado para o tratamento de melanoma. Quanto à linhagem VERO, não foi observado atividade após tratamento com dacarbazina (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dos IC₅₀ e Índice de Seletividade da linhagem de melanoma após tratamento com IP₂-DBM e dacarbazina.

	Composto	
	IP ₂ -DBM	Dacarbazina
IC₅₀B16F10(µg/mL)	9,018 ± 1,06	319,4 ± 89,9
IC₅₀Melan-A (µg/mL)	51,85 ± 3,19	260,7 ± 48,6
IS (Melan-A/ B16F10)	5,749	0,8162
IC₅₀VERO (µg/mL)	99,89 ± 9,01	*
IS (VERO/ B16F10)	11,076	*

IS: Índice de Seletividade IC₅₀: Concentração inibitória de 50%. * Não calculado.

Com esses resultados, foi possível avaliar a seletividade do composto inédito, IP₂-DBM, sobre o melanoma. A avaliação do seu efeito citotóxico em

relação ao do fármaco tradicionalmente utilizado revela que ele é quase sete vezes mais ativo que Dacarbazina contra células do melanoma, em comparação às células normais da linhagem Melan-A. Ademais, esse composto exibiu um IS igual a 11,076 para a linhagem normal VERO, um dos maiores índices de seletividade para o câncer relacionado a um derivado de DBM encontrados na literatura. Ambos valores de IS do composto em estudo estão dentro dos padrões considerados significativos (entre 2 e 3 para ensaios de novas drogas), ressaltando mais uma vez seu potencial promissor para utilização como novo fármaco.

Tais resultados foram semelhantes às recentes análises da atividade antimelanoma de derivados sintéticos do DBM obtidos por Oliveira (2017), Nascimento (2018) e Baêta (2019). Nesses estudos, os testes *in vitro* também mostraram maior citotoxicidade dos compostos então estudados sobre linhagens de melanoma (B16F10) em comparação à linhagem normal Melan-A, e os testes *in vivo* revelaram redução da massa tumoral, redução da vascularização e redução da invasão. Além disso, os valores de IS encontrados para os derivados de DBM também foram superiores ao Dacarbazina. Oliveira (2017), por exemplo, obteve um derivado quase três vezes mais ativo contra células do melanoma. Por outro lado, Nascimento (2018) obteve um composto sintético com IS igual a 41.94. Por fim, o composto produzido por Baêta (2019) apresentou IS 8 vezes maior que o do medicamento Dacarbazina.

Para as demais linhagens de células tumorais, foi realizada a análise comparativa do IS do IP₂-DBM com os da Doxorubicina e Cisplatina. Para tanto, foram realizados experimentos de citotoxicidade, a fim de verificar a sensibilidade das linhagens tumorais e normais estudadas frente à essas duas drogas, as quais pertencem ao grupo dos quimioterápicos mais utilizados em diversos tipos de câncer. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de IC₅₀ e Índice de Seletividade das diferentes linhagens após tratamento com os compostos tradicionais.

Drogas		Parâmetros estáticos			IS	
		Log IC ₅₀	IC ₅₀ (µg/mL)	R ²	Melan-A	Vero
Cisplatina	Melan-A	0,9718	9,371 ± 0,43	0,9789		
	Vero	1,238	17,28 ± 1,68	0,9751		
	B16F10	1,020	10,46 ± 1,21	0,9282	0,89	1,66
	C6	1,241	17,43 ± 1,78	0,9481	0,53	0,99
	SW480	1,240	17,39 ± 3,29	0,8677	0,53	0,99
Doxorrubicina	Melan-A	0,7042	5,061 ± 0,69	0,9491		
	Vero	0,7858	6,106 ± 0,88	0,9230		
	B16F10	0,7189	5,234 ± 2,27	0,9180	0,9	1,1
	C6	1,087	12,22 ± 3,88	0,7128	0,4	0,4
	SW480	1,083	12,12 ± 1,27	0,9988	0,4	0,5

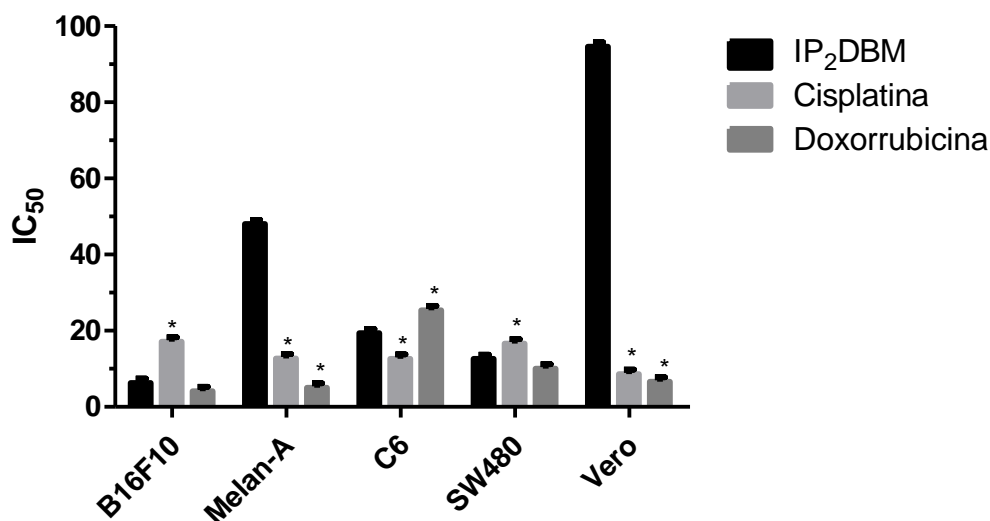
IS: Índice de Seletividade IC₅₀: Concentração inibitória de 50%.

No tratamento com Cisplatina durante o período de 60 horas, observou-se que os valores de IC₅₀, no caso das linhagens Melan-A e B16F10, foram 9,371 (31,23µM) e 10,46 (34,86 µM), respectivamente. Esses valores estão próximos aos valores encontrados na literatura referentes às concentrações de Cisplatina entre 25 µM a 30 µM, para essas mesmas linhagens (RODRIGUES et. al., 2004). Para esse mesmo quimioterápico, em relação à linhagem VERO, o valor de IC₅₀ de 6,106 µg/mL foi próximo ao encontrado em um estudo que comparava os efeitos citotóxicos entre a Cisplatina e uma outra substância presente na *Nigella sativa*, nessa linhagem celular (NG et al., 2011). Similarmente, os valores de IC₅₀ aqui encontrados para as linhagens C6 (17,43 µg/mL) e SW480 (17,39µg/mL) também estão de acordo com o valor de IC₅₀ de 16.75 µg/mL para a cisplatina em relação à linhagem C6, encontrado em estudos já descritos (YILDIRIM et al., 2012). Em um estudo semelhante, porém com adenocarcinoma do colorretal (SW480), foi encontrado um IC₅₀ de 64.74µM (VOLAREVIC et al., 2013), próximo ao valor de 56,66 µM (17,39 µg/mL) encontrado nesse presente estudo.

No tratamento com Doxorrubicina, observou-se que os valores de IC₅₀, no caso das linhagens Melan-A e B16F10, foram muito próximos aos valores encontrados por Oliveira e colaboradores (2015) de $3.81 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$. Da mesma forma, o valor de IC₅₀ encontrado para a linhagem SW480 ($12,12\mu\text{g/mL}$) também está próximo ao valor de $14.2 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ já descrito em outro trabalho (RAJABALIAN et al., 2008), onde foi feita a avaliação do efeito combinado de um extrato contendo vários quimioterápicos, incluindo doxorrubicina, contra um painel de linhas celulares cancerosas, inclusive a SW480. Os valores de IC₅₀ de ambos quimioterápicos encontrados nesse presente estudo para C6 foi maior àqueles já descritos da literatura. Entretanto, estudos descrevem uma via que explica tamanha resistência desse câncer ao quimioteráico dacarbazina, reforçando a necessidade da busca de novos quimioterápicos (ROBERT et al., 1992).

Com os dados apresentados na Tabela 4 foi possível a comparação do efeito do IP₂-DBM em relação às demais drogas (Figura 22 e Tabela 5). Um resultado promissor para o possível desenvolvimento de novos quimioterápicos baseia-se na obtenção de compostos que apresentem valor de IS superior, de forma estatisticamente significativa, ao de drogas clinicamente já utilizadas.

Figura 23 – Comparação do efeito citotóxico do IP₂-DBM com o efeito das demais drogas para as linhagens estudadas.



	Composto		
	IP ₂ -DBM	Cisplatina	Doxorrubicina
IS (Melan-A/ B16F10)	5,749	0,89	0,9
IS (Melan-A/ C6)	1,981	0,53	0,4
IS (Melan-A/ SW480)	2,156	0,53	0,4
IS (Vero/ B16F10)	11,067	1,66	1,1
IS (Vero/ C6)	3,816	0,99	0,4
IS (Vero/ SW480)	4,155	0,99	0,5

Tabela 5 - Comparação dos Índices de Seletividade do IP₂-DBM com relação aos demais quimioterápicos.

IS: Índice de Seletividade

Nesse estudo, os valores de IS do composto IP₂-DBM encontrados para linhagem de glioma em relação a linhagem Melan-A, não são estaticamente mais significativos do que os de outros quimioterápicos, porém estão próximos do valor mínimo considerável para ensaio de novas drogas (>2), realçando seu potencial caráter antitumoral. Assim, vale a pena salientar que o composto inédito apresenta, ainda para essa linhagem, mais que o triplo de seletividade que a cisplatina e quase uma ordem de grandeza quando o IS do IP₂-DBM é comparado com a doxorubicina.

Ademais, o IP₂-DBM apresentou valores de IS superiores (IS >1) ao das drogas conhecidas para o tratamento de tumores de origem similar às linhagens utilizadas neste estudo. Sobre a linhagem VERO, por exemplo, o IP₂-DBM exibe uma atividade antitumoral estatisticamente mais significativa. Como é possível observar nos dados apresentados na Tabela 3, o IS obtido para as linhagens de glioma e de adenocarcinoma colorretal são significativos em relação aos valores de IS para Cisplatina. Em especial, com relação a doxorubicina, houve um incremento de dez vezes na seletividade do tratamento com IP₂-DBM.

Vale salientar ao final de nossas avaliações que um valor de IS superior a 2 é um forte indicativo de que testes in vivo podem ser iniciados, a fim de averiguar se essa diferença pode favorecer a redução da taxa de desenvolvimento do tumor in situ.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse presente trabalho mostram que a síntese do IP₂-DBM, um composto inédito, foi concluída com sucesso, e que a sua caracterização satisfatória permitiu identificá-lo quimicamente como um novo composto contendo uma alquilação não descrita na literatura: 1-[(4'-isopropil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3 propanodiona - IP₂-DBM. O rendimento da síntese obtida foi abaixo do esperado; entretanto, o baixo custo e método de obtenção são suficientemente robustos para inferirmos que a metodologia empregada pode ser uma alternativa de baixo custo muito promissora. A dose mínima letal (IC₅₀) foi bastante inferior aos valores obtidos para quimioterápicos de uso tradicional. Além disso, os índices de seletividade do composto foram superiores ao valor mínimo considerado significativo (IS = 2,0) pela comunidade científica em ensaios de novas drogas. Assim, os resultados obtidos nessa presente dissertação revelam que o composto IP₂ DBM é um potencial medicamento para o tratamento do câncer do tipo melanoma, glioma e adenocarcinoma do colorretal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINS, M.B., LOTZE, M.T., DUTCHER, J.P. et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. **Journal of Clinical Oncology**, 17(7): 2105-2105. 1999.

AZEVEDO, L. **Análise da proteína Anexina A1 na diferenciação morfofenotípica e funcional dos mastócitos no câncer colorretal**. Orientadora: Sonia Maria Oliani. 2017. Tese (Doutorado em Biociências). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, São José do Rio Preto, 2017.

BAÊTA, J. V. B. de P. **Avaliação da atividade antimelanoma in vitro, in silico e in vivo derivado de dibenzoilmetano 1,3-difenil-2-alil-1,3-propanodiona (DMA₂)**. Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG, 2018.

BLATT, A.F.; CHÁVEZ, D.; CHAI, H.; GRAHAM, J.G. et al. Cytotoxic flavonoids from the stem bark of *Lonchocarpus aff. Fluvialis*. **Phytoter Research**, 16(4):320-5. Jun 2002.

CAMARGO, E. A. **Efeitos Genotóxicos E Mutagênicos Dos Agentes Antineoplásicos Cisplatina E Gencitabina Em Células De Carcinoma De Bexiga**. Orientadora: Daisy Maria Favero Salvadori. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2010.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2004.

DAMSKY, W. E.; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncogene**, 33(19), 2413. May 2014.

DENIPOTE, F.G.; TRINDADE, E.B.S.D.M.; BURINI, R.C. 2010. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, 1:93-98. Mar 2010.

FAGHFURI, E.; FARAMARZI, M.A.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma. **Expert review of anticancer therapy**, 15(9):981-93. Jul 2015.

GIERYNG, A.; PSZCZOLKOWSKA, D.; WALENTYNOWICZ, K.A.; RAJAN, W.D.; Kaminska, B. Immune microenvironment of gliomas. **Laboratory Investigation**, 97(5), p.498. Mar 2017.

HONG, JIN-LIERN. **Dibenzoylmethane induced cell cycle arrest in human colon cancer cells and its pharmacokinetic disposition in the rats**. 2007. Adviser: Ah-Ng Tony Kong. Thesis (Master of Science Graduate Program in

Pharmaceutical Science) - Graduate School-New Brunswick Rutgers, The State University of New Jersey, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018: Incidência do câncer no Brasil.** [Brasília, DF]: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em 07 jun. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018: **Incidência do câncer no Brasil.** Instituto Nacional do Câncer, 2018. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em 07 jun 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é câncer.** [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2018. Disponível em <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em 07 jun. 2019.

ISHAQ, M. et al. Atmospheric gas plasma–induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, v. 25, n. 9, p. 1523–1531, 2014.

ISHIDA, J., OHTSU, H., TACHIBANA, Y., NAKANISHI, Y., BASTOW, K. F., NAGAI, M., WANG, H., ITOKAWA, H., LEE, K., Antitumor agents. Part 214: Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. **Bioorg. Med. Chem.**, 10: 3481 - 3487, 2002.

JACKSON, K.M.; DELEON, M.; VERRET, C.R; and HARRIS, W.B. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, 178:161-165. Apr 2002.

KIERSZENBAUM, A. L; TRES, L. **Histology and Cell Biology:** an introduction to pathology. 2^{ed} edilion. Copyright: Editorial Elsevier, 2008.

LAUG, D.; GLASGOW, S.M.; and DENEEN, B. A glial blueprint for gliomagenesis. **Nature Reviews Neuroscience**, 19:393–403. May 2018.

LEBSA, A.; NUNES, D.H.; SOUZA FILHO, J.J.D; and PINTO, C.J.D.C.. Avaliação de 496 laudos anatomopatológicos de melanoma diagnosticados no município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 2007. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 82 (3): 234-257. 2007.

LIN, C.C.; LU, Y.P.; LOU, Y.R.; HO, C.T.; NEWMARK, H.H.; MACDONALD, C., SINGLETARY, K.W; et al. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation, formation of DMBA–DNA adducts in mammary glands, and mammary tumorigenesis in Sencar mice. **Cancer Letters**, 168:125-132. Jul 2001.

LIN, W.; HONG, J. L.; SHEN, G.; WU, R. T.; WANG, Y. et. al. Pharmacokinetics of Dietary Cancer Chemopreventive Compound Dibenzoylmethane in Rats and the Impact of Nanoemulsion and Genetic knockout of Nrf₂ on its Disposition. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, 32: 65-75. Mar 2011.

LIU, L.; SHI, Y.; SHI, J.; WANG, H.; SHENG, Y.; JIANG, Q.; et al. The long non-coding RNA SNHG1 promotes glioma progression by competitively binding to miR-194 to regulate PHLDA1 expression. **Cell Death & Disease**, 10(6), 463. Jun 2019.

LOURENÇO, Luiza Helena Madia. **Interface entre glicosilação pós-traducional e estresse de retículo em melanomas: alvo para sensibilização de células tumorais a agentes quimioterápicos?** Orientador: Roger Chammas. 2013. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2013.

MAGALHÃES, A.F.; TOZZI, A.M.G.A.; SALES, B.H.L.N.; AND MAGALHÃES, E.G.. Twenty-three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. **Phytochemistry**, 42(5):1459-1471. Jul 1996.

MCGEE, J. O. D.; ISAACSON, P. G.; WRIGHT, N. A. Neoplasia. In: **Oxford Textbook of Pathology**. Oxford, Oxford University Press, 1992.
MILLER, A.J.; MIHM JR, M.C. 2006. **Melanoma**. *New England Journal of Medicine*, 6;355(1):51-65. Jul 2006.

NAKAJIMA, A.; KOJIMA, Y.; NAKAYAMA, M.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. NAKANO, H. Downregulation of c-FLIP promotes caspase-dependent JNK activation and reactive oxygen species accumulation in tumor cells. **Oncogene**, 27(1): 76. Jun 2008.

NASCIMENTO, FERNANDA RODRIGUES. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimelanoma in Vitro e in Vivo do derivado sintético 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona**. 2018. Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2018.

NG, W. K.; YAZAN, L. S.; ISMAIL, M. Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1392–1398, 2011.

NOGUEIRA, M.A.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; BILOTI, D.N.; LAVERDE JR, A.; PESSINE, F.B.. et al. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **II Farmaco**, 58(11), pp.1163-1169. Nov 2003.

OLIVEIRA, Marcos Rodrigo de. **Avaliação Da Atividade Antimelanoma De Formulação Transdérmica De Um Derivado Sintético De Dibenzoilmetano**. Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2017.

OLIVEIRA, P.F.D.; ALVES, J.M.; DAMASCENO, J.L.; OLIVEIRA, R.A.M.; DIAS JÚNIOR, H., CROTTI, A.E.M. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25(2):183-188. 2015.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Desenvolvimento Sustentável.** Organização das Nações Unidas, 2018. Disponível em <https://nacoesunidas.org/casos-de-cancer-devem-aumentar-70-ate-2038-calcula-oms/>. Acesso em 07 jun. 2019.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Desenvolvimento Sustentável.** Organização das Nações Unidas, 2018. Disponível em <https://nacoesunidas.org/casos-de-cancer-devem-aumentar-70-ate-2038-calcula-oms/>. Acesso em 07 jun. 2019.

QUIRINO, A.; NOGUEIRA, M. A.; DOS REIS, R. R.; DE MELO, E. B. Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, 52(4), 345-357. Maio 2006.

RAJABALIAN, S. Methanolic extract of teucrium polium I. Potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. **Exp Oncol**, v. 30, n. 2, p. 12, 2008.

RATHORE, M.; GIRARD, C.; OHANNA, M.; TICHET, M.; JOUIRA, R.B.; GARCIA, E. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B signaling pathway. **Oncogene**, 38:5873–5889. Jun 2019.

ROBERT, J. et al. P-glycoprotein overexpression cannot explain the complete doxorubicin-resistance phenotype in rat glioblastoma cell lines. **Br J Cancer**, v. 65, n. 4, p. 538–544, 1992.

RODRIGUES, M. et al. Dipyridamole increases the cytotoxicity of cisplatin in human larynx cancer cells in vitro Dipyridamole and cisplatin **cytotoxicity.** **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 591-599, 2004

SAITO, Renata. **Indução de estresse de retículo endoplasmático como estratégia de quimiossensibilização de melanoma.** Orientador: Roger Chammas. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2014.

SCHULZE, M. M. Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos. **Revista Brasileira Oncologia Clínica**, 4 (12): 17-23. 2007.

SHEN, G.; KHOR, T.O.; HU, R.; YU, S.; NAIR, S.; HO C.; et al. Chemoprevention of Familial Adenomatous Polyposis by Natural Dietary Compounds Sulforaphane and Dibenzoylmethane Alone and in Combination in Apc^{Min/+} Mouse. **Experimental Therapeutics, Molecular Targets, and Chemical Biology**, 67: (20). Oct 2007.

SILVEIRA, LEANDRO GREFF da. **Estudos teóricos da reação de alquilação desracemizante em enaminas quirais.** 2005. Orientador: Paolo Roberto

Livotto. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

SINGLETERY, K.; MACDONALD, C.; IOVINELLI, M.; FISHER, C.; WALLIG, M., Effect of the beta-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene. **Carcinogenesis**, 19(6):1039-1043. Jun 1998.

SOUZA, M.C.O.; FREIRE, M.S.; CASTILHO, L.R. Influence of culture conditions on Vero cell propagation on non-porous microcarriers. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 48:71-77. 2005.

SOUZA, R.; MATTEDI, A.; REZENDE, M.; CORREA, M.; DUARTE, E. An estimate of the cost of treating melanoma disease in the state of Sao Paulo-Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 84: 237– 43. 2009.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **Journal of Carcinogenesis**, 8(1):5, 2009.

THIMMULAPPA, R.K.; RANGASAMY, T.; ALAM, J.; BISWAL S. Dibenzoylmethane Activates Nrf2-Dependent Detoxification Pathway and Inhibits Benzo(a)pyrene Induced DNA Adducts in Lungs. **Medicinal Chemistry**, 4(5):473-81. 2008.

TONON, L. M.; SECOLI, S. R.; CAPONERO, R. Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53(2), 173-182. Jan 2007

TORRES, Bruna Gaelzer Silva. **Avaliação pré-clínica da Farmacocinética e a Toxicidade Aguda em Roedores do Candidato a Fármaco Antitumoral LaSOM 65**. 2012. Orientadora: Dalla Costa .Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2012.

VIDAL, S.J.; RODRIGUEZ-BRAVO, V.; GALSKEY, M.; CORDON-CARDO, C.; DOMINGO-DOMENECH, J., Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. **Oncogene**, 33(36): 4451. 2014.

VOLAREVIC, V. et al. Cytotoxic effects of palladium(II) and platinum(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamineN,N'-di-2-(4-methyl) pentanoic acid on human colon cancer cell lines. **J Buon**, v. 18, n. 1, p. 131-137, 2013.

WILLIS, R. A. **The spread of tumors in the human body**. London: Butterworth & Co., 1952.

WILSON, J. J.; LIPPARD, S. J. In vitro anti cancer activity of cis-diammineplatinum (II) complexes with b-dicetones leaving groups ligands. **Journal of Medical Chemistry**, 55:5326-36. 2012.

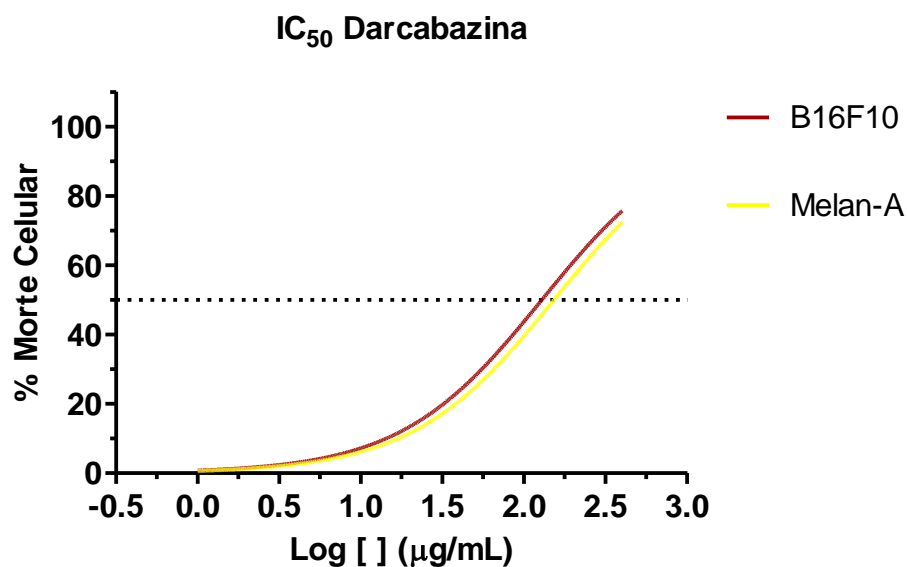
YILDIRIM, H.; KÖÇKAR, F.; NAKİBOĞLU, C. Antiproliferative activity of some novel platinum complexes on C6 glioma and MCF-7 breast cancer cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 60, p. 12422-12428, 2012.

YUAN, X.; LARSSON, C.; XU, D., Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. **Nature Oncogene**, 1. 2019.

ZAIDI, M. R.; DAY, CHI-PING; MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, 128: 2381–2391, 2008.

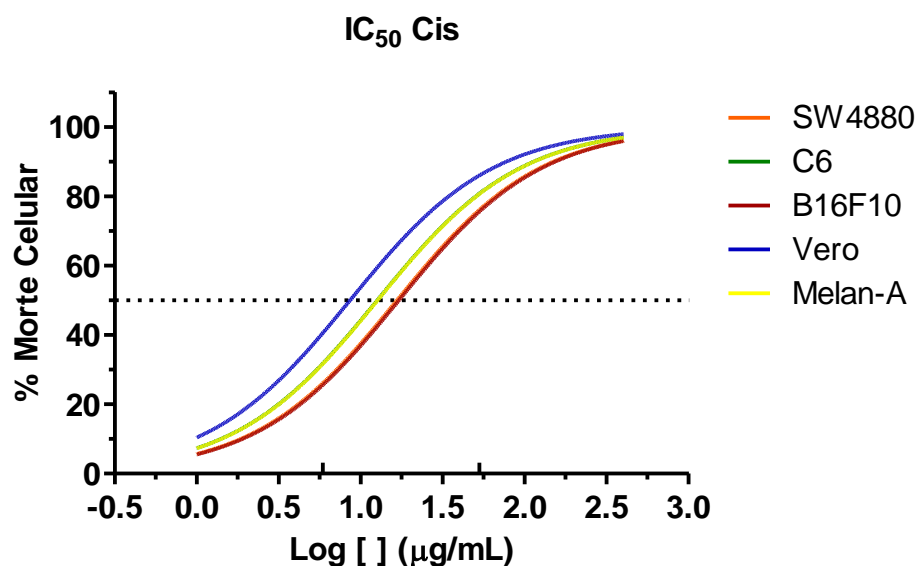
ANEXO - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Figura Complementar 1: Efeito citotóxico em função da concentração de Dacarbazina para as linhagens celulares Melan-A e B16F10, após exposição de 60 horas.



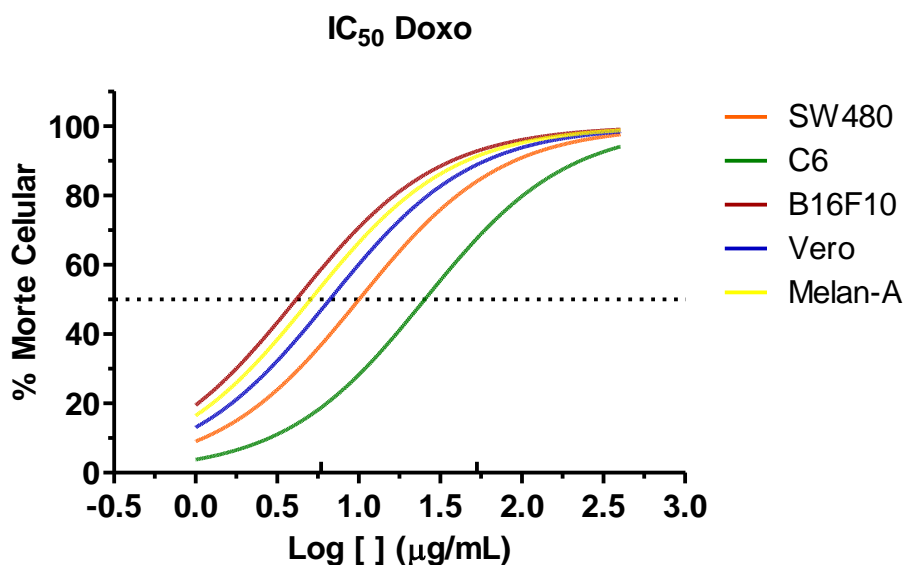
Os valores de IC₅₀ encontrados para Dacarbazina foram iguais a 260,7µg/mL e 319,4 µg/mL para células de melanócitos normais e B16F10, respectivamente, muito superiores aos encontrados para o composto IP₂DBM.

Figura Complementar 2: Efeito citotóxico das linhagens celulares estudadas em função da concentração de Cisplatina, após exposição de 60 horas.



No tratamento com Cisplatina durante o período de 60 horas, observou-se que os valores de IC_{50} , no caso das linhagens Melan_A e B16F10 foram 9,371 $\mu\text{g/mL}$ e 10,46 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O mesmo composto, para linhagem VERO, o obteve valor de IC_{50} igual a 17,28 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de IC_{50} encontrados para as linhagens C6 foi de 17,43 $\mu\text{g/mL}$, e SW480 17,39 $\mu\text{g/mL}$.

Figura Complementar 3: Efeito citotóxico das linhagens celulares estudadas em função da concentração de Doxorubicina, após exposição de 60 horas.



No tratamento com Doxorubicina, observou-se que os valores de IC_{50} , no caso das linhagens Melan_A e B16F10, foram de 5,061 $\mu\text{g/mL}$ e 5,234. O valor de IC_{50} encontrado para a linhagem SW480 foi igual a 12,12 $\mu\text{g/mL}$. Já o valor de IC_{50} encontrado nesse estudo para C6 foi 12,22 $\mu\text{g/mL}$.