



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
PPGCF

JEFFERSON DA CRUZ ESTEVES

PERFIL TOXICOGENÉTICO E ANTIPROLIFERATIVO DA CRISINA LIVRE
EM TESTES NÃO CLÍNICOS

TERESINA – PI

2025

JEFFERSON DA CRUZ ESTEVES

**PERFIL TOXICOGENÉTICO E ANTIPROLIFERATIVO DA CRISINA LIVRE EM
TESTES NÃO CLÍNICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

Coorientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

TERESINA – PI

2025

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Divisão de Representação da Informação

E79p Esteves, Jefferson da Cruz.
 Perfil toxicogenético e antiproliferativo da crisina livre em testes
 não clínicos / Jefferson da Cruz Esteves. -- Teresina, 2025.
 80 f.: il.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2025.
 “Orientador: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva”

 1. Flavonóides. 2. Crisina - Genotoxicidade. 3. Câncer. 4.
 Ensaios pré-clínicos. I. Silva, Felipe Cavalcanti Carneiro da. II.
 Título.

CDD 615.32

Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

JEFFERSON DA CRUZ ESTEVES

**PERFIL TOXICOGENÉTICO E ANTIPROLIFERATIVO DA CRISINA LIVRE EM
TESTES NÃO CLÍNICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

Coorientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

Aprovado em 06/março/2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



FELIPE CAVALCANTI CARNEIRO DA SILVA
Data: 09/03/2025 16:34:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva (UFPI)

Orientador

Documento assinado digitalmente



JOAO MARCELO DE CASTRO E SOUSA
Data: 10/03/2025 09:23:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (UFPI)

Coorientador

Documento assinado digitalmente



DALTON DITZ JUNIOR
Data: 10/03/2025 08:48:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Dalton Dittz Junior (UFPI)
Examinador Interno ao Programa

Documento assinado digitalmente



JOSE ROBERTO DE OLIVEIRA FERREIRA
Data: 07/03/2025 18:56:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Ferreira (UNCISAL)
Examinador Externo ao Programa

Documento assinado digitalmente



ISABELA RIBEIRO DE SA GUIMARAES NOLETO
Data: 07/03/2025 16:28:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Isabela Ribeiro de Sá Guimarães Nolêto (UFPI)
Examinadora Externa ao Programa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof.^a Dr.^a Nadir do Nascimento Nogueira

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edmilson Miranda de Moura

PRÓ-REITOR DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof.^a Dr.^a Regina Lucia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Arquimedes Cavalcante Cardoso

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. André Luiz Menezes Carvalho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.^a Dr.^a Marcília Pinheiro da Costa

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por guiar o meu caminho e por sempre me dar forças para superar cada desafio. A minha família, que é a base de tudo, minha mãe Maria de Jesus Campelo da Cruz Esteves, meu pai Antônio José Esteves Sobrinho e meu irmão Gilvan da Cruz Esteves, sem esse apoio nada seria possível.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva pelo apoio e orientação e ao Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa pela força para poder seguir em frente, pelo companheirismo, e por todos os ensinamentos que muitas vezes ultrapassaram a barreira acadêmica.

Aos Professores, Dr. Paulo Michel, Dr. Dalton Dittz e Dr. Francisco das Chagas, pelo suporte e parceria na conclusão desse projeto.

A família Lapgenic onde o apoio recíproco e constante entre todos os integrantes, em especial aos meus amigos: Ilana, Nicole, Malu, João Pedro, Marjorie, Igor, Bia, Athanara, Taline, Shamyra, Glissia, Victor e Helber, quer tornaram essa caminhada mais leve. Aos vizinhos de laboratório Labcancer e Lafan que sempre contribuíram quando possível, em especial aos meus amigos, Rayran, Ingredy, Diego, Joedna, Débora e Micaely, obrigado pela disposição em ajudar e pela companhia diária.

Aos colaboradores do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica que oferecem as condições para o funcionamento diário, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de obtenção do título de Mestre. Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior que possibilita uma dedicação integral.

...Muito Obrigado!

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

(Isaac Newton)

RESUMO

O câncer é uma doença responsável por inúmeras mortes ao ano e um problema global. Desta forma, é importante investigar novos compostos terapêuticos mais seletivos, que possam ajudar a minimizar esse cenário. As investigações toxicológicas de substâncias são essenciais no processo de estudo de fármacos, pois permitem direcionar outras investigações que possam contribuir para a descoberta de substâncias com atividade antitumoral. Dentro desse contexto, a crisina é um flavonoide de origem natural com propriedades biológicas de importância terapêutica como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antigenotóxica, apoptótica, entre outros. Visando contribuir para as possibilidades de aplicação da crisina dentro do contexto oncológico, o presente estudo teve o objetivo de avaliar sua toxicidade em teste de *A. salina*, seus possíveis efeitos genotóxicos em células de *A. cepa*, efeitos antiproliferativos em células tumorais e não tumorais, bem como prever seu perfil de semelhança à fármacos e toxicidade em análise *in silico*. A toxicidade da crisina avaliada por *Artemia salina* nos períodos de 24h e 48h tiveram a CL₅₀ determinada em 657,0 (528,8 – 866,2 µM) e 258,9 (193,6 – 367,7µM) respectivamente. No ensaio de *Allium cepa*, a crisina apresentou efeito citotóxico nas duas maiores concentrações entre as avaliadas (250, 125 e 62,5 µM), entretanto, não foi identificado efeitos genotóxicos. O efeito antiproliferativo com base no ensaio de MTT frente as linhagens MCF-7 e MCF-10 apresentou valores de IC₅₀ de 53,4 (23,7 – 133,5 µM) e 120,8 (39,53 – 785,1 µM) respectivamente. Não foi possível determinar o valor de IC₅₀ nas linhagens B16F10 e U87 sendo estimando como superior as maiores concentrações utilizadas (>125 µM e >200 µM respectivamente). Na linhagem MCF-7, a combinação da crisina com os quimioterápicos demonstrou um aumento no efeito antiproliferativo através da diminuição dos valores de IC₅₀ sendo para cisplatina de 9,4 (8,55 -14,46 µM) para 5,3 (4,17 - 6,3 µM) e para doxorrubicina de 2,5 (1,91 – 3,36 µM) para 0,3 (0,25 - 0,40 µM). As previsões *in silico* demonstraram que a crisina não viola nenhuma das regras pré-estabelecidas para compostos candidatos à fármacos e apresentou toxicidade relativa baixa, além disso, a ancoragem molecular indicou a interação da crisina com os respectivos alvos: CDK1 = -8,1; CDK2 = -10,2; CDK6 = -8,5; EGFR = -7,8; VEGFR2 = -9,0; ER-α = -8,2 e CYP19A1 = -8,3 (kcal/mol). Diante dos resultados, conclui-se que a crisina apresenta efeitos citotóxicos que podem explicar sua ação antiproliferativa em células tumorais. Além disso as previsões *in silico* ainda demonstram que ela possui, em uma análise inicial, características físico-químicas fundamentais para fármacos com biodisponibilidade oral compatível e potencial de inibição para alvos importantes no câncer de mama.

Palavras-chaves: Flavonoides; Genotoxicidade; Câncer; Ensaios pré-clínicos.

ABSTRACT

Cancer is responsible for numerous deaths annually and represents a global health problem. Therefore, it is crucial to investigate novel and, more selective therapeutic compounds that may help mitigate this scenario. Toxicological investigations of substances are essential in drug research, as they guide further studies that may contribute to discovery of compounds with antitumor activity. Within this context, chrysin is a naturally occurring flavonoid with biologically significant therapeutic properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, antigenotoxic, and apoptotic activities, among others. To explore the potential applications of chrysin in oncology, this study aimed to evaluate its toxicity using the *A. salina* assay, its possible genotoxic effects in *A. cepa* cells, its antiproliferative effects in tumor and non-tumor cells, as well as predict its drug-likeness profile and toxicity through in silico analysis. The toxicity of chrysin, assessed in *Artemia salina* at 24h and 48h, had LC₅₀ values of 657.0 (528.8 – 866.2 μ M) and 258.9 (193.6 – 367.7 μ M), respectively. In the *Allium cepa* assay, chrysin presented cytotoxic effects at the two highest tested concentrations (250, 125, and 62.5 μ M); however, no genotoxic effects were identified. The antiproliferative effect, based on the MTT assay in the MCF-7 and MCF-10 cell lines, showed IC₅₀ values of 53.4 (23.7 – 133.5 μ M) and 120.8 (39.53 – 785.1 μ M), respectively. It was not possible to determine the IC₅₀ values for the B16F10 and U87 cell lines, as they were estimated to be above the highest concentrations used (>125 μ M and >200 μ M, respectively). In the MCF-7 cell line, the combination of chrysin with chemotherapeutic agents enhanced the antiproliferative effect by reducing IC₅₀ values: for cisplatin, from 9.4 (8.55 – 14.46 μ M) to 5.3 (4.17 – 6.3 μ M), and for doxorubicin, from 2.5 (1.91 – 3.36 μ M) to 0.3 (0.25 – 0.40 μ M). In silico predictions indicated that chrysin does not violate any pre-established rules for drug-like compounds and exhibited relatively low toxicity. Additionally, molecular docking analysis showed interactions between chrysin and the following targets: CDK1 = -8.1; CDK2 = -10.2; CDK6 = -8.5; EGFR = -7.8; VEGFR2 = -9.0; ER- α = -8.2; and CYP19A1 = -8.3 (kcal/mol). Based on these results, it is concluded that chrysin exhibits cytotoxic effects that may explain its antiproliferative action in tumor cells. Furthermore, in silico predictions suggest that chrysin possesses key physicochemical properties for oral bioavailability and potential inhibition of important targets in breast cancer.

Keywords: Flavonoids; Genotoxicity; Cancer; Preclinical trials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de formação de tumores.....	17
Figura 2 – “Hallmarks of cancer”.	19
Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides.....	21
Figura 4 – Classes de Flavonoides e suas estruturas químicas.	22
Figura 5 – Estrutura química da crisina.	23
Figura 6 – Reação de redução do MTT.....	28
Figura 7 – Toxicidade da crisina em diferentes concentrações (μM) nos tempos de 24 (A) e 48h (B) por meio do Bioensaio de Viabilidade em Artemia salina.	37
Figura 8 – Viabilidade celular em diferentes linhagens celulares (A-E) em exposição de 72 h à crisina.....	40
Figura 9 - Viabilidade de células MCF-7 em concentração fixa de crisina (50 μM) associada a cisplatina (A) e doxorubicina (B).....	41
Figura 10 - Interações moleculares resultantes da ancoragem com a proteína CDK1.	45
Figura 11 - Interações moleculares resultantes da ancoragem com as proteínas CDK2 (A) e CDK6 (B).....	46
Figura 12 - Interações moleculares resultantes da ancoragem com as proteínas EGFR (A) e VEGFR2 (B).	47
Figura 13 - Interações moleculares resultantes da ancoragem com as proteínas ER- α (A) e Aromatase (B).	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas utilizadas do docking.....	36
Tabela 2 - Avaliação do índice mitótico (IM) e das diferentes fases do ciclo celular após 24hs de tratamento com a crisina em células meristemáticas vegetais.....	38
Tabela 3 – Avaliação da genotoxicidade das diferentes concentrações de Crisina em células de A. cepa.....	39
Tabela 4 – Concentração Inibitória 50% (IC ₅₀) da crisina frente à diferentes linhagens celulares com exposição de 72h.	40
Tabela 5 – Propriedades in silico da Crisina (CR), Doxorrubicina (DOX) e Ciclofosfamida indicadas pelo SwissADME.	42
Tabela 6 - Parâmetros toxicológicos da Crisina (CR), Doxorrubicina (DOX) e Ciclofosfamida previstos através do PROTOX 3 e GUSAR.....	42
Tabela 7 - Resultado dos RMSD's após o redocking.	43
Tabela 8 - Afinidades de ligação da crisina e ligantes de referência.	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADMET – absorção, distribuição, metabolização e toxicidade
ADT – autodock tools
AT – atraso cromossômico
B16-F10 – linhagem célula de melanoma murino
CADD – computer-aided drug design
C-met – C-metáfase
CDK - cinase dependentes de ciclina
CN – controle negativo
CR – crisina
CV – controle veículo
DMSO – dimetilsulfóxido
EGFR – receptor do fator de crescimento epidémico
IPCS – programa internacional de segurança química
MCF-10 – células de (epitélio mamário humano não tumoral
MCF-7 – linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MN – micronúcleo
MTT – brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
OMS – organização mundial da saúde
PDGFR – receptor de crescimento derivado de plaquetas
PDI – índice de polidispersão
PN – ponte
QR – quebra cromossômica
QSAR – *quantitative structure-activity relationship*
RTKs – receptores tirosina-quinase
TAC – total de aberrações cromossômicas
U87 – linhagem celular de glioblastoma humano
VEGFR – receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral.....	15
2.1 Específicos	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 O câncer.....	16
3.2 Flavonoides	21
3.2.1 Crisina.....	23
3.3 Avaliação genotóxica e mutagênica de substâncias.....	24
3.3.1 Toxicidade frente ao teste de <i>Artemia salina</i>	25
3.3.2 Teste de <i>Allium cepa</i>	26
3.4 Viabilidade celular e ensaio de MTT	27
3.5 Estudos <i>in silico</i>: ADMET e docking molecular	28
4 METODOLOGIA	32
4.1 Obtenção da crisina.....	32
4.2 Teste de <i>A. salina</i>.....	32
4.3 Ensaio de <i>A. cepa</i>	33
4.4 Cultura de células	34
4.5 Ensaio de MTT.....	34
4.6 Índice de seletividade	34
4.7 Avaliação dos parâmetros ADMET	35
4.8 Ancoragem molecular.....	35
4.9 Estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Toxicidade da crisina frente ao teste de <i>A. salina</i>	37
5.2 Efeitos toxicogenéticos da crisina em <i>A. cepa</i>	37
5.3 Avaliação da viabilidade celular da crisina no ensaio de MTT	39
5.4 Predições das propriedades ADMET para a crisina	41
5.5 Ancoragem molecular dos alvos selecionados	43
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de mortes no mundo, sendo, essencialmente, causado por alterações genéticas que permitem o aparecimento de células transformadas que adquirem a capacidade de proliferar de modo desordenado, podendo atingir outros órgãos (metástase) (Baidoun et al., 2021; Gerstberger; Jiang; Ganesh, 2023). Estima-se que cerca de 20% da população desenvolverá algum tipo de câncer ao longo da vida, sendo que a doença é fatal para aproximadamente um em cada nove homens e uma em cada doze mulheres (Bray et al., 2024).

Entre os tratamentos contra o câncer, a quimioterapia consiste na utilização de compostos contra células neoplásicas evitando a proliferação descontrolada em relação as células normais. Essa distinção pode ser baseada em marcadores específicos das células transformada (superexpressão de receptores alvo) para tornar o tratamento mais seletivo (Anand et al., 2022; Falzone; Salomone; Libra, 2018).

Entretanto, a natureza complexa do câncer impõe alguns desafios na utilização da quimioterapia como o desenvolvimento de mecanismos de resistência, ou seja, a capacidade das células em alterar seu metabolismo para adaptar-se aos efeitos de compostos quimioterápicos. Além disso, a toxicidade de muitos fármacos antineoplásicos limita a terapia pelos seus efeitos adversos em células saudáveis (não tumorais). Dessa forma, existe a necessidade da busca de novos compostos que possam ser candidatos a medicamentos mais específicos contra células cancerígenas (Hait, 2010; Khan et al., 2024).

A crisina é um flavonoide de origem natural encontrada no mel, própolis e plantas do gênero *Passiflora*. A crisina apresenta diversas atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória e atividade antitumoral (Chinembiri et al., 2014; Mani; Natesan, 2018; Naz et al., 2019; Ożarowski; Karpiński, 2021). Estudos com a crisina apontam seu potencial antiproliferativo em células tumorais de fígado (Hep G2); mama (T47D); próstata (pc-3) entre outros, indicando ser um composto com possível potencial para atividade anticâncer (Alshetaili et al., 2023; Eatemadi et al., 2016; Samarghandian; Afshari; Davoodi, 2011).

A avaliação toxicológica é uma etapa indispensável no processo de descoberta de fármacos, contribuindo para elucidação da faixa terapêutica segura para compostos com atividade farmacológica comprovada em modelos preditivos (Dorato;

buckley, 2006). A toxicidade pode ser avaliada em múltiplas abordagens como *in silico*, *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos. Com os avanços tecnológicos, métodos *in vitro* e *in silico* tem ganhado destaque por suas vantagens como baixo custo, rapidez e boa reprodutibilidade sendo considerados modelos menos complexos. Além disso, preocupações sociais e éticas tendem a diminuir quando é possível substituir o uso de modelos animais (Eisenbrand et al., 2002; Singh; Khanna; Pant, 2018).

Nesse contexto, o presente trabalho visa avaliar o perfil tóxico e genotóxico da crisina em ensaios não clínicos, seus efeitos antiproliferativos em células tumorais e análises *in silico* que possam esclarecer os possíveis resultados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o perfil toxicogenético da crisina em bioensaios e sua ação antiproliferativa frente a linhagens tumorais bem como realizar avaliações *in silico* para entender seus efeitos.

2.1 Específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos da crisina frente ao ensaio de *Artemia salina*;
- Investigar o perfil toxicogenético em meristemas de raízes de *Allium cepa*;
- Analisar o perfil antiproliferativo da crisina em linhagens tumorais através do ensaio de MTT;
- Analisar predições farmacocinéticas ADMET *in silico* da crisina em comparação com fármacos antineoplásicos;
- Avaliar possíveis interações com alvos específicos analisadas através de ancoragem molecular;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O câncer

O câncer é definido de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) como um conjunto numeroso de doenças que possuem em comum o crescimento descontrolado de células podendo iniciar em praticamente qualquer órgão ou tecido do corpo com capacidade de invasão local podendo espalhar-se para outros órgãos em um processo denominado metástase (WHO, 2024). Essa proliferação celular ocorre em células transformadas que são sujeitas à evolução por seleção natural com progressivas adaptações através de mudanças genéticas e epigenéticas de modo que esse acúmulo garante a sobrevivência dessa população de células (Brown et al., 2023).

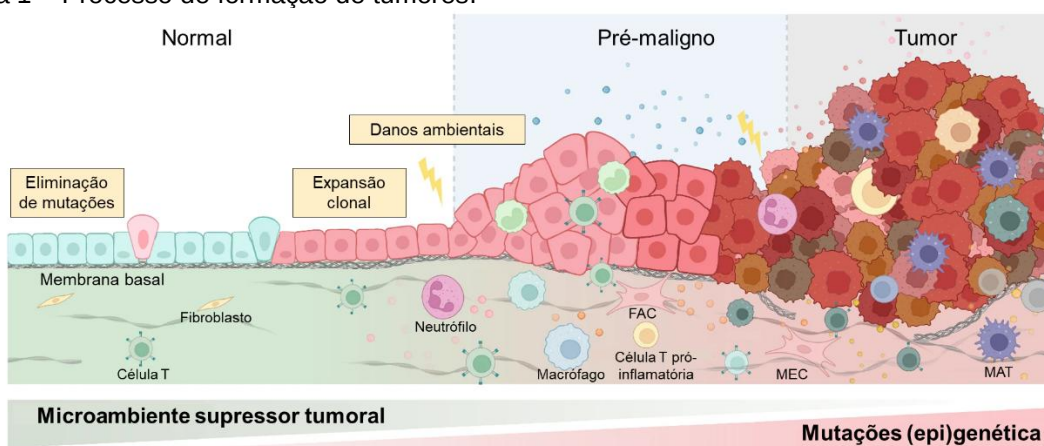
Em 2022 houve aproximadamente 20 milhões de novos casos de câncer em todo mundo provocando 9,7 milhões de mortes sendo a segunda maior causa, estando atrás das doenças cardiovasculares, de modo que ainda é previsto que um em cada cinco homens ou mulheres irá desenvolver câncer ao longo da vida e um em cada nove homens e uma em cada doze mulheres irá morrer por conta dele sendo um problema grave de saúde pública com uma estimativa para 35 milhões de casos até 2050 (Bray et al., 2024).

O câncer é essencialmente causado por uma desordem genética provocada por mutações no DNA que podem ocorrer naturalmente ou adquiridas através de fatores externos como infecções virais e/ou consumo de substâncias com potencial carcinogênico (Bai et al., 2024; Bierut, 2011; Hazazi et al., 2024). O acúmulo dessas alterações genéticas é herdado e passado para as células filhas à medida que os sistemas de identificação e de defesa falham sendo sujeitas ao processo de seleção natural de Darwin proporcionando vantagens de sobrevivência e crescimento em relação as células vizinhas (Maley; Reid, 2005).

Como pode ser visto na Figura 1 no tecido normal, mutações podem surgir esporadicamente e são geralmente eliminadas por mecanismos supressores tumorais. No entanto, a falha nesses sistemas de controle e/ou a ocorrência de alterações genéticas podem conferir vantagens proliferativas às células, levando à formação de clones mutantes. Durante esse processo, o acúmulo progressivo e desregulado dessas alterações genéticas desencadeia a transformação maligna,

resultando no desenvolvimento de tumores avançados com capacidade de evasão imunológica, ruptura da arquitetura tecidual e invasão. Paralelamente, o microambiente tumoral sofre uma reprogramação, transitando de um estado supressor para um permissivo, caracterizado por inflamação crônica, remodelação da matriz extracelular (MEC) mediada por fibroblastos associados ao câncer (FAC) e recrutamento de macrófagos associados a tumores (TAM). Esses componentes do microambiente passam a secretar citocinas e outros fatores que promovem a sobrevivência, proliferação e disseminação das células tumorais (Zhang et al., 2024).

Figura 1 – Processo de formação de tumores.



Fonte: ZHANG et al., 2024, adaptado.

Também denominados de neoplasias, os tumores são classificados clinicamente em malignos ou benignos de modo que tumores benignos são considerados de baixo risco uma vez que possuem baixa capacidade de invasão podendo ser tratados cirurgicamente (Tian et al., 2024). Um tumor maligno, entretanto, possui as características fenotípicas do câncer propriamente dito, podendo espalhar-se pelo corpo necessitando-se comumente além do tratamento cirúrgico, quimioterapia e radioterapia (Lee et al., 2023; Patel, 2020).

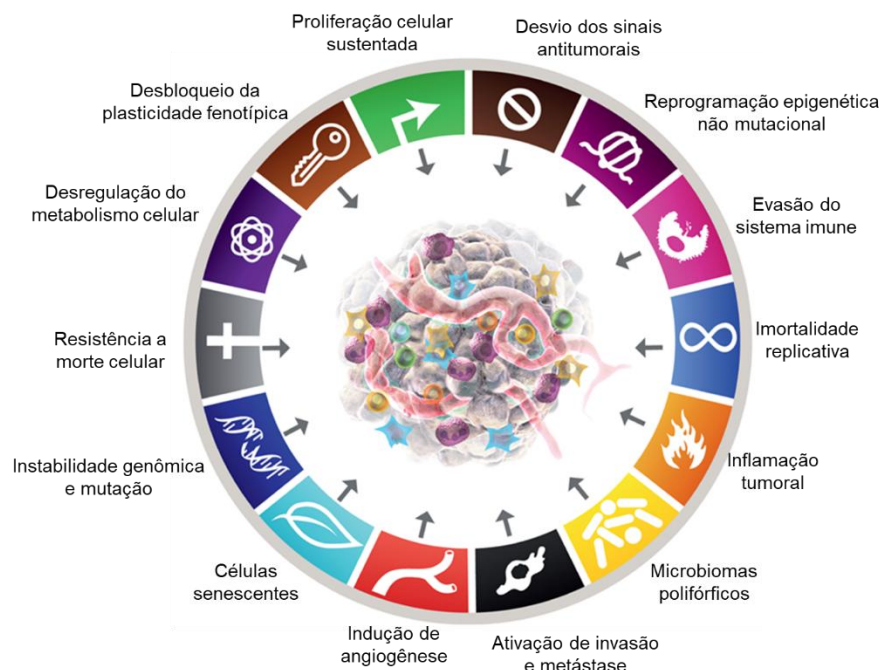
As transformações ocorridas em células cancerígenas conferem características heterogêneas que fazem cada tipo de câncer ser praticamente único, entretanto, existem as propriedades denominadas “*Hallmarks of cancer*” (Marcas do câncer) que reúnem seis características basais para que as células sejam proficientes na proliferação aumentada (Caon et al., 2020). Essas características foram determinadas inicialmente por Hanahan e Weinberg (2000) sendo elas: autonomia nos sinais proliferativos; insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento; evasão da

apoptose; replicação ilimitada; indução de angiogênese e a invasão de tecidos provocando a metástase (Hanahan; Weinberg, 2000).

Com os avanços dos estudos, os mesmos autores publicaram uma atualização dos “*hallmarks*” elevando a complexidade do tema, ou seja, o câncer deve ser considerado mais que células em proliferação, deve-se tomar em conta o microambiente tumoral onde as células do estroma associado ao tumor mudam progressivamente em reflexo a sinalização subjacente dando suporte para a formação de uma complexa rede que se aproxima da complexidade de órgãos que em última análise adquire a capacidade de disseminação (Hanahan; Weinberg, 2011). Os autores adicionam então duas características habilitadoras (instabilidade genômica e estado inflamatório) possuindo papéis cruciais para o desenvolvimento das seis marcas anteriores e duas novas características emergentes sendo a reprogramação do metabolismo energético e a evasão das defesas imunológicas (Hanahan; Weinberg, 2011).

Recentemente houve uma última atualização dos “*hallmarks*” onde foram adicionadas mais quatro características: desbloqueio da plasticidade fenotípica (capacidade de retornar a um estado celular progenitor); reprogramação epigenética não mutacional (modulação da expressão gênica por fatores puramente epigenéticos); microbiomas polimórficos (influência da microbiota para a progressão tumoral) e células senescentes, que normalmente são um obstáculo à tumorigênese pela parada estável do ciclo celular, podem contribuir em certas ocasiões na proliferação neoplásica através da sinalização parácrina de fatores associados à senescência (Hanahan, 2022). Assim as marcas do câncer (Figura 2) reúnem as características fundamentais para o desenvolvimento da doença sendo também norteador para o planejamento de terapias direcionadas.

Figura 2 – “Hallmarks of cancer”.



Fonte: HANAHAN, 2022, adaptado.

Em nível molecular, as alterações genéticas que provocam o surgimento das marcas do câncer ocorrem basicamente em duas classes de genes: os proto-oncogenes e os genes supressor de tumor. Proto-oncogenes são expressos normalmente em todas as células, entretanto podem ser ativados por diversos mecanismos genéticos como translocação, amplificação gênica e mutação, ou ainda por eventos epigenéticos que resultam em ganho de função, nesse estado os proto-oncogenes são denominados oncogenes (Lee; Muller, 2010; Torry; Cooper, 1991). Genes supressores de tumor são responsáveis pela regulação do crescimento descontrolado celular de modo que mutações podem ocasionar a perda de função permitindo a ocorrência do fenótipo transformado (Liu et al., 2015).

A proliferação celular impulsionada pelos oncogenes podem atuar através de fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento ou ainda atuando na transdução de sinal (Huang et al., 2021; Liu et al., 2022). Receptores mutados podem estar constitutivamente ativados mesmo na ausência de ligantes, por exemplo, receptores tirosina-quinase (RTKs); receptor do fator de crescimento epidêmico (EGFR); receptor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR) sendo a inibição desses receptores alvo de terapias (Patel et al., 2023; Saraon et al., 2021).

Genes supressor de tumor codificam proteínas responsáveis normalmente por reprimir a iniciação ou progressão tumoral (Westermarck; Hahn, 2008). Considerado como o guardião do genoma, o gene supressor de tumor p53 possui a função de manutenção do ciclo celular podendo parar a duplicação do DNA em repostas a possíveis danos de modo que nessas condições pode ainda aumentar a expressão de proteínas de reparo de DNA, caso o reparo não seja possível é responsável ainda pela indução de apoptose. Dessa forma as respostas mediadas pelo p53 previne a proliferação descontrolada, estando mutado em aproximadamente 50% dos tumores humanos (Li et al., 2020).

As terapias contra o câncer evoluem à medida que aumenta o seu entendimento. Tradicionalmente a remoção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia são as estratégias mais usuais contra a doença (MEE et al., 2023). A cirurgia foi o primeiro tratamento proposto podendo ter caráter preventivo, como a remoção de pólipos colorretais com potencial tumoral e também curativos na remoção de tumores localizados, tendo o método cirúrgico grande evolução com a modernização da anestesia e antisepsia (Cao et al., 2023; Wyld; Audisio; Poston, 2014).

A radioterapia utiliza radiação de alta energia, como raios X, raios gama, feixes de elétrons ou prótons, para causar danos ao DNA das células tumorais, esse método pode ser empregado como terapia única no tratamento de tumores bem localizados, ou em combinação com outras abordagens (Gao et al., 2023). Quando aplicada antes do tratamento principal, é chamada de terapia neoadjuvante; quando utilizada após o tratamento principal, é denominada terapia adjuvante, no entanto, a falta de seletividade em relação às células não cancerígenas é um desafio significativo, que deve ser cuidadosamente considerado na escolha do método de radioterapia a ser aplicado (Abshire; Lang, 2018; Baskar et al., 2012).

O conhecimento do câncer a nível molecular permitiu o desenvolvimento de terapias mais racionalmente direcionadas, assim a quimioterapia utiliza como base compostos com ação citotóxica para eliminar células cancerosas podendo ser curativo, paliativo ou utilizada em combinação com outras terapias (Devita; Chu, 2008). A exemplo, o tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrogênio que em 1970 foi o primeiro composto utilizado em ensaio clínico para o tratamento de câncer de mama, sua ação se baseia na ação antagonista aos receptores de estrogênio α (ER α) sendo usado também clinicamente para prevenção de

osteoporose em mulheres na pós-menopausa (Cronin-fenton; Damkier, 2018; Lee et al., 2008; Sonkin; Thomas; Teicher, 2024).

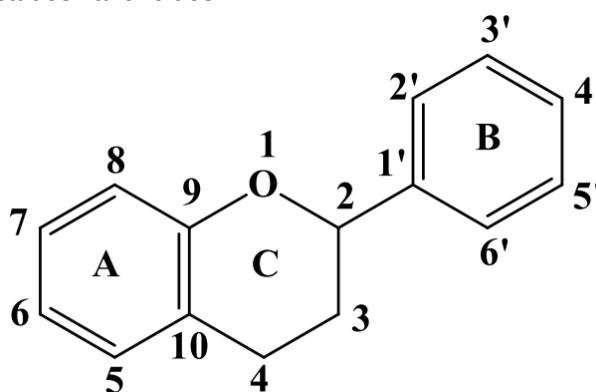
Nesse contexto, as estratégias de combate ao câncer devem levar em conta cada vez mais a sua heterogeneidade buscando-se alternativas que visam superar os desafios para frear a proliferação desordenada.

3.2 Flavonoides

A busca por novos compostos com potencial bioativo tem sido alvo de inúmeras pesquisas com foco na investigação em fontes naturais de modo que muitas substâncias isoladas de microrganismos, plantas, animais e vida marinha são usadas atualmente na clínica médica (Thomford et al., 2018).

Nesse contexto, flavonoides são compostos polifenólicos obtidos através de fonte naturais como vegetais, frutas, sementes, chás entre outros possuindo uma estrutura básica de $C_6-C_3-C_6$ com um anel heterocíclico (C) e dois anéis aromáticos (A e B) como representado na Figura 3 (Chen et al., 2023).

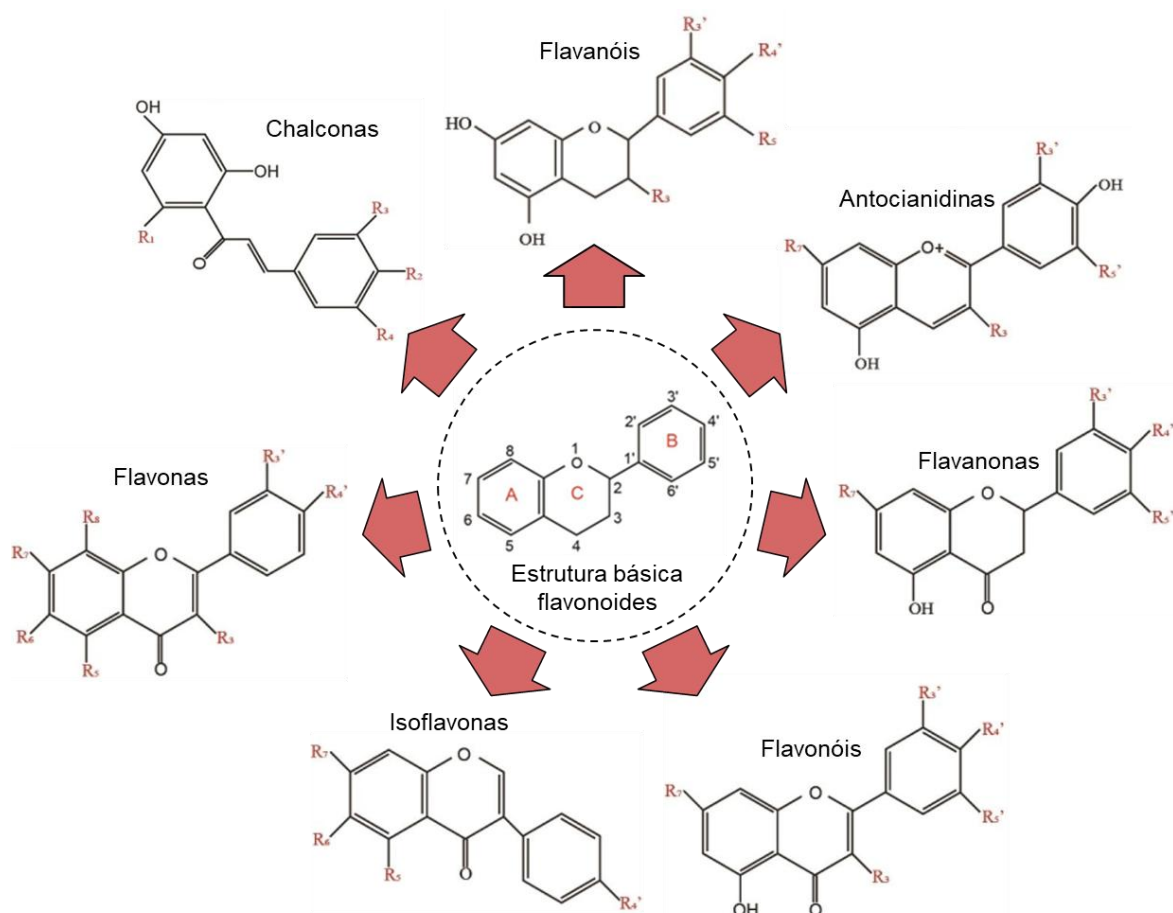
Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: CHEN et al., 2023, adaptado.

O processo de biossíntese dos flavonoides ocorre pela convergência das vias do chiquimato e do acetato resultando nas variadas classes de flavoides (Figura 4) que incluem as flavonas, flavonóis, flavanóis, isoflavonas, flavanonas e antocianinas sendo caracterizados de acordo com o padrão de ligação das hidroxilas (-OH) e de seus substituintes (Lan et al., 2023; Tizazu; Bekele, 2024; Tohge; De Souza; Fernie, 2017).

Figura 4 – Classes de Flavonoides e suas estruturas químicas.



Fonte: SHEN et al., 2022, adaptado.

Mais de 4 mil tipos de flavonoides já foram identificados sendo essa classe de compostos naturais cada vez mais investigada devido as variadas atividades biológicas como por exemplo antioxidante, cardioprotetora, antidiabética, neuroprotetora, antimicrobiana antiproliferativa entre outras (Bouyahya et al., 2024; Faleye; Lee; Lee, 2023; Khan et al., 2021; Ma et al., 2024; Pradhan et al., 2023; Wang; Chen, 2024; Zhao et al., 2024).

Muitas das propriedades dos flavonoides podem ser explicadas devido a capacidade de quelação de íons metálicos, diminuição da peroxidação lipídica através da inibição de radicais livres, e ligação com proteínas (Kumar; Mishra; Pandey, 2013; Rakha et al., 2022).

A produção de flavonoides e de inúmeros outros metabólitos é regulada por fatores externos como disponibilidade de água, temperatura, luz, radiação, etc. de modo a adaptar a melhor condição fisiológica da planta, muitos desses fatores são controlados para o desenvolvimento de métodos de cultivos com o objetivo de obter

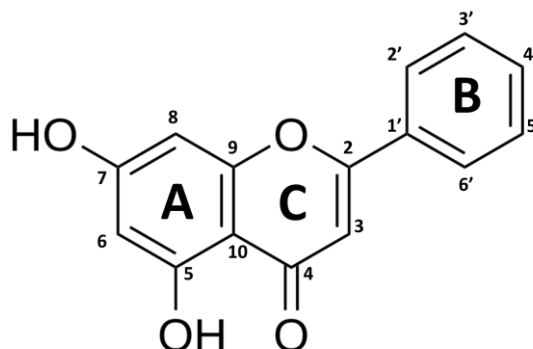
amostras vegetais mais seletivas em relação as substâncias de interesse (Ma *et al.*, 2024)

Dentro desse contexto, os flavonoides são substâncias bioativas com potencial para a aplicação em saúde sendo possíveis candidatos à fármacos.

3.2.1 Crisina

A crisina (PubChem CID 5281607) cujo nome IUPAC é 5,7-dihidroxiavone (Figura 5) é um flavonoide pertencente à classe das flavonas presente principalmente no mel (teor de até 5,3 mg/Kg) e na própolis podendo ser encontrado também em cogumelos, vegetais e no maracujá (*Passiflora sp.*) (Islam *et al.*, 2022; Kalogeropoulos *et al.*, 2013). Sendo isolada inicialmente em 1990, a crisina tornou-se alvo de estudos devido ao seu potencial terapêutico (Chadha *et al.*, 2017; Medina *et al.*, 1990).

Figura 5 – Estrutura química da crisina.



Fonte: Adangale; Wairkar, 2022, adaptado.

Em relação a outros flavonoides, a crisina possui grupos hidroxilas apenas no anel A sem substituintes no anel B, essa característica substitutiva exclusiva a torna alvo de estudos em relação a estrutura e atividade (Gao *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2019). A ausência de hidroxilas no anel B repercute em seu potencial antioxidante diminuído *in vitro* em comparação as outras flavonas como quercetina, luteolina e miricetina, entretanto, em modelos *in vivo* a crisina mostra-se como promissora no combate ao stress oxidativo (Mohammed *et al.*, 2023).

Em relação as suas atividades biológicas em estudos *in vitro* e *in vivo* reportados na literatura destaca-se efeitos como neuroprotetor (Mehri *et al.*, 2014), anti-inflamatório (Rehman *et al.*, 2014), antiasmático (Wadibhasme; Ghaisas; Thakurdesai, 2011), hepatoprotetor (Pingili *et al.*, 2019), antidepressivo (Filho *et al.*,

2016), antitumoral (Yang et al., 2014) etc. Além disso, a crisina também possui a capacidade de melhorar o efeito de outros medicamentos (Lee; Lee; Jung, 2021; Lim et al., 2017).

Apesar de seu potencial terapêutico, a crisina possui limitações como a baixa solubilidade em água, alta metabolização podendo resultar na diminuição da biodisponibilidade oral (Jung, 2016; Noh et al., 2016; Walle et al., 2001). Entre as propostas para superar tais desafios, a complexação da crisina com ciclodextrinas e a formulação de nanopartículas mostra-se como uma alternativa para melhorar a solubilidade em água e sua biodisponibilidade (Fenyvesi et al., 2020; Narayan et al., 2024; Oggero et al., 2023).

3.3 Avaliação genotóxica e mutagênica de substâncias

Estudos toxicológicos avaliam a segurança de substância sendo de grande relevância em investigações pré-clínicas para avaliar os potenciais riscos que determinados compostos podem oferecer para a saúde humana e em que condições esses resultados ocorrem, sendo comumente a análise feita em função da concentração (Eaton; Gallagher, 2010; Verma et al., 2024)

São usados modelos de organismos, por exemplo, cebola, minhoca, peixe e microcrustáceos como bioindicadores sensíveis, rápidos, de fácil execução e baixo custo sendo também utilizados para estudar danos ambientais (ecotoxicidade) e para avaliar potenciais riscos ao ser humano e/ou para nortear outras aplicações como uso herbicida, antimicrobiano e antitumoral (Chowdhury; Mandal; Mondal, 2020; Herrero et al., 2012; Okumu et al., 2021; Yuan et al., 2024).

Dependendo do tempo de exposição do organismo em estudo, os ensaios são divididos em testes agudos que duram um curto período (em comparação ao tempo de vida do organismo teste), em torno de 24 a 96h ou crônicos que analisam a exposição por um maior período que pode abarcar parte ou todo o ciclo de vida do organismo testado. Os resultados geralmente são expressos em concentração letal média (CL₅₀) que é a concentração que causa a morte da metade dos organismos (Costa et al., 2008).

A citotoxicidade é a avaliação da capacidade de substâncias causarem danos em nível celular por mecanismos variados, como alteração na síntese de proteínas, produção de energia e/ou provocando o comprometimento da integridade das

membranas celulares, refletindo na divisão celular e sobrevivência. A citotoxicidade é uma avaliação fundamental na triagem de substâncias de interesse (Istifli et al., 2019; León-Mejía et al., 2021).

Os danos celulares causam alterações que podem resultar em efeitos mutagênicos e/ou genotóxicos (Choudhuri et al., 2021). Compostos genotóxicos são aqueles capazes de interagir com o material genético e/ou com estruturas que auxiliam na estabilidade genômica como o aparelho de fuso e as enzimas topoisomerase. Compostos genotóxicos causam alterações cromossômicas em relação ao número (poliploidia ou aneuploidia) ou na estrutura (quebras, deleções, rearranjos) que podem comprometer o processo de divisão celular, metabolismo basal e causar mutações (Maurici et al., 2005; Raghunath akash et al., 2022). As células possuem mecanismos de reparo para corrigir danos ao DNA prevenindo a ocorrência de mutações, entretanto, a depender da intensidade do dano exposto ou do tempo de exposição, o sistema de reparo pode falhar levando ao acúmulo desses danos e, eventualmente, podendo apresentar características mutagênicas (Manedo; Rocha, 2021; Costa, 2022).

A mutagenicidade refere-se à capacidade de um agente provocar ou aumentar a incidência de mutações permanentes na estrutura de DNA provocando alterações em genes pontuais ou regiões cromossômicas maiores, de modo que o metabolismo celular se torna ineficiente em reverter tais alterações (Maurici et al., 2005).

3.3.1 Toxicidade frente ao teste de *Artemia salina*

Este ensaio foi proposto inicialmente por Michael *et al.* (1956), entretanto, sua notoriedade ocorreu através do estudo de Meyer *et al.* (1982) quando realizou o estudo de toxicidade de extratos de plantas da família Euphorbiaceae sendo amplamente utilizado em estudos de avaliação toxicológica (Araya et al., 2024; Meyer et al., 1982; Michael; Thompson; Abramovitz, 1956).

A *Artemia salina* é um microcrustáceo da ordem Anostraca que sobrevivem em ambientes de água salgada comumente utilizados na alimentação para peixes devido ao seu valor nutritivo como fonte proteica e mineral (Marouane, 2017). Esta espécie reúne características interessantes para o seu uso em estudos de toxicidade como a facilidade de obtenção, praticidade na manipulação e baixo custo, seus cistos podem

ser adquiridos comercialmente podendo se estocados por longos períodos (Gajardo; Beardmore, 2012)

Para sua utilização, os cistos devem ser alocados em água salinizada com oxigenação adequada até a eclosão, dando origem ao estágio larval denominado de náuplios que são utilizados nos testes (Ntungwe et al., 2020).

Este microcrustáceo é sensível as variações no ambiente que está inserido, sendo assim utilizado em testes através da observação da viabilidade ou mortalidade frente à exposições de substâncias (Tzima et al., 2022). Por ser de baixo custo e relativamente rápido, os resultados do teste de *A. salina* é utilizado muitas vezes como triagem para direcionamento de outros estudos. (Rahamouz-Haghighi et al., 2022; Santos Pimenta et al., 2003).

3.3.2 Teste de *Allium cepa*

O teste de *Allium cepa* pode ser utilizado para determinar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de substâncias químicas isoladas, misturas complexas como extratos vegetais e amostras ambientais, sendo de simples execução e boa sensibilidade mostrando-se como um ótimo bioindicador (Grant, 1999; Leme; Marin-Morales, 2009).

Além disso, o rápido crescimento de suas raízes, alta proliferação celular, fácil aquisição, cromossomos de grande tamanho e em número reduzido ($2n=16$) são outras características que impulsionam o seu uso (Fiskesjö, 1985; Matsumoto et al., 2006; Siddiqui; Tabrez; Ahmad, 2011). Os resultados obtidos pelo teste de *A. cepa* apresentam boa correlação com resultados obtidos em células humanas (Barco et al., 2024; Leme; Marin-Morales, 2009; Xavier et al., 2021)

A citotoxicidade é avaliada com base no índice mitótico (IM), o qual indica a proliferação celular da raiz da cebola, sendo obtido pela contagem das células em processo de divisão celular, ou seja, em mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e o total de células incluindo as células que estão em intérfase.

A comparação do IM com o controle negativo indica a presença de citotoxicidade ou não, de modo que valores diminuídos indicam um processo citostático com a inibição da proliferação celular (Amanchi et al., 2023; Das et al., 2022).

A genotoxicidade pode ser obtida através da frequência das alterações cromossômicas (AC) também denominado de índice de alterações cromossômicas

(IAC) ocorridas durante o ciclo celular que podem ser induzidas por agentes clastogênicos os quais provocam quebra de DNA observando-se quebras, perdas e pontes cromossômicas. Outras AC são ocasionadas por agente aneugênicos que interferem no fuso mitótico provocando o aparecimento de C-metáfase, metáfase com aderências cromossômicas, anáfases multipolares, células binucleadas e metáfase poliploides (Leme; Marin-Morales, 2009).

A mutagenicidade é avaliada através da ocorrência de micronúcleos (MN) resultante da quebra de cromossomos ou do mal funcionamento do fuso mitótico durante a divisão celular indicando danos não reparáveis no material genético formando pequenas porções de cromatina de forma arredondada que pode ser encontrado perto do núcleo na célula em intérfase (Fenech, 2007; Fernandes; mazzeo; Marin-Morales, 2007).

A avaliação da genotoxicidade através das observações das aberrações cromossômicas utilizando o ensaio modelo de *A. cepa* foi avaliado pelo Programa internacional de Segurança Química (IPCS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) sendo considerado como um teste eficiente na avaliação de mistura complexas de substâncias ambientais sendo também utilizado na avaliação de substâncias derivadas de material vegetal e moléculas isoladas (Cabrera; Rodriguez, 1999; Schreiner et al., 2024).

3.4 Viabilidade celular e ensaio de MTT

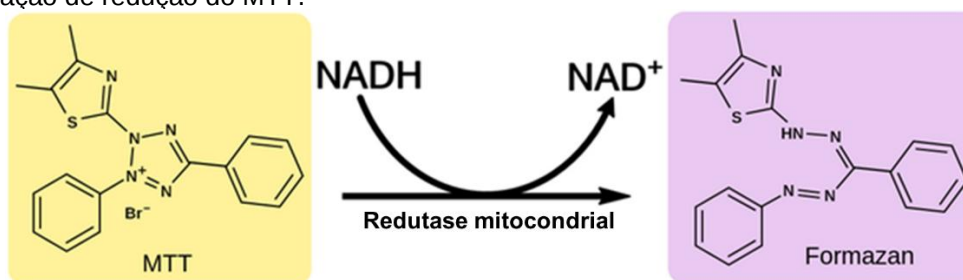
Ensaio de viabilidade celular possuem o objetivo de diferenciar a quantidade de células vivas em uma determinada população, sendo um dos parâmetros mais comumente utilizado em ensaios *in vitro* para a determinação de citotoxicidade de substâncias bioativas, avaliando-se o grau de alteração no metabolismo celular que pode acarretar em morte (Kenakin, 2012; Li et al., 2023; Van Nguyen; Alfaro, 2019).

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um dos testes mais utilizados para avaliação da viabilidade celular sendo proposto inicialmente por Mosmann (1983). O MTT é um sal de cor amarela sendo solúvel em meio aquoso e podendo permear membranas celulares (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018; Mosmann, 1983; Stepanenko; Dmitrenko, 2015).

O teste se baseia na capacidade celular em metabolizar o MTT através da redução por redutases mitocondriais para produzir cristais de formazam (Figura 6),

este sendo insolúvel em meio aquoso, pela clivagem do anel tetrazólio acumulando-se no citoplasma, o produto pode ser dissolvido em etanol e propanol sendo comumente utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO). O formazan pode ser quantificado por espectrofotometria sendo a sua formação proporcional à atividade enzimática e a viabilidade celular (Bahuguna et al., 2017; Srivastava et al., 2018; Vinken; Blaauboer, 2017).

Figura 6 – Reação de redução do MTT.



Fonte: Kamiloglu et al., 2020, adaptado.

É importante destacar algumas limitações desse ensaio que podem ser fatores limitantes como a formação de formazan extracelular resultante da interação com a substância teste; densidade celular; variação da viabilidade celular em função da composição do meio de cultura e interferentes que causam alteração da leitura colorimétrica, sendo indispensável a otimização desses parâmetros para obtenção de resultados mais fidedignos (Gasque et al., 2014; Ghasemi et al., 2021; Wang; Yu; Wickliffe, 2011).

3.5 Estudos *in silico*: ADMET e docking molecular

O caminho percorrido pelo medicamento até a sua disponibilidade para o uso no tratamento de doenças é longo e dispendioso, sendo um processo que pode levar décadas (12-15 anos) podendo custar até bilhões de dólares. Além disso, boa parte dos compostos candidatos à fármacos não avançam nos ensaios clínicos por apresentarem perfil farmacocinético desfavorável com efeitos tóxicos indesejáveis pela exposição sistêmica (Hughes et al., 2011; Möhrle, 2024; Singh et al., 2023; Singh, 2006).

Nesse contexto, técnicas *in silico* ou planejamento de fármacos auxiliado por computador (*Computer-Aided Drug Design* – CADD) tem auxiliado no processo de descobertas de novos fármacos, reduzindo tempo e custos desnecessários, sendo

utilizado tanto na triagem de moléculas promissoras para os ensaios experimentais como na otimização da estrutura química de fármacos já estabelecidos (Niazi; Mariam, 2023; Yu; Mackerell, 2017).

O CADD inclui múltiplas abordagens podendo ser classificado em dois grupos principais: Métodos baseados em estrutura – dependem das informações 3D do alvo molecular (proteínas, enzimas etc.). Exemplo desses métodos inclui a ancoragem molecular (*docking*) e a dinâmica molecular (Śledź; Caflisch, 2018); Métodos baseados em ligantes – são realizados com base em bibliotecas com as informações físico-químicas de um conjunto de ligantes com atividade biológica comprovada. Um exemplo é a busca por similaridade QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) que usa modelos matemáticos para identificar correlações estatísticas entre a estrutura da molécula e atividades biológicas (Baig et al., 2018).

A previsão dos parâmetros farmacocinéticos ADMET (absorção; distribuição; metabolização; excreção e toxicologia) de compostos pode ser realizada através de plataformas online como o SwissADME; PROTOX 3 e Gusar com a simulação de suas propriedades físico-químicas estabelecendo relações quantitativas com seus efeitos biológicos (Ajeet et al., 2016; Banerjee et al., 2024; Marcucci et al., 2022).

Um dos parâmetros *in silico* mais utilizados para julgar se determinado composto possui perfil farmacocinético adequado é baseado no estudo de Lipinski e colaboradores onde foi analisado mais de 2000 fármacos observando-se o nível de similaridade físico-química (Lipinski et al., 1997), conhecida como a “Regra dos cinco”. Ela determina que um candidato à fármaco deve possuir:

- ✓ Massa molar menor que 500g/mol
- ✓ Número de aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10
- ✓ Número de doadores de ligação de hidrogênio inferior ou igual a 5
- ✓ Coeficiente de partição n-octanol/água (cLogP) inferior ou igual a 5

Adicionalmente, Veber e colaboradores verificaram que para uma biodisponibilidade oral ideal o composto precisa apresentar ligações rotacionais menor ou igual a 10 com área de superfície topológica polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å² (Veber et al., 2002).

É importante destacar a ocorrência de exceções à regra dos cinco como encontrado em antibióticos, antifúngicos e vitaminas (Ivanović et al., 2020; Lipinski et al., 2001). Entretanto, na triagem computacional, a violação de duas ou mais propriedades indica possíveis problemas de biodisponibilidade, sendo estes

candidatos a fármacos menos preferíveis para o seguimento em outros estudos (Thirumal Kumar et al., 2022; Varma; Perumal; Panchagnula, 2006).

O *docking* molecular, ou atracamento molecular, é definido como uma análise computacional capaz de avaliar o grau de interação entre um composto e um alvo biológico (proteína, DNA, RNA, enzima, etc) através da simulação de interação intermoleculares como por exemplo ligação de hidrogênio; interações de van der Waals; interações eletrostáticas e ligações covalentes na formação de um complexo estável (Aguayo-ortiz; Fernández-de Gortari, 2016).

Para a análise é necessário a obtenção da estrutura tridimensional do ligante e do seu alvo (normalmente uma proteína) podendo ser obtidos em bases de dados como PubChem e o PDB (*Protein Data Bank*) respectivamente (Oner et al., 2023). O PDB é um dos maiores bancos de dados públicos contendo proteínas com estrutura resolvida através de técnicas como cristalografia de raios X e RMN. Na ausência de dados experimentais, a estrutura pode ser obtida ainda por técnicas computacionais como modelagem por homologia (Golonko et al., 2019; Sikic; Tomic; Carugo, 2010).

O procedimento para a análise do *docking* é composto basicamente por duas etapas: predição da conformação do ligante no seu sítio de complexação através de algoritmos de busca e avaliação do grau de afinidade do complexo com base em funções de pontuação analisando o grau das interações intermoleculares (Zulkifli et al., 2023).

A análise das diversas possibilidade das orientações e conformações (graus de liberdade) possíveis para um ligante no seu alvo para atracamento deve ser realizado de tal maneira para encontrar-se o mínimo global de energia, ou seja, o estado termodinâmico mais estável sendo experimentalmente equivalente. Entretanto, aproximações introduzidas de acordo com a viabilidade computacional causam desvios nessa predição (Kitchen et al., 2004; Liu et al., 2018).

O docking molecular pode ser realizado considerando: proteína rígida e ligante fixado em uma conformação rígida, considerando os graus de liberdade translacional e rotacional; proteína rígida e ligante flexível com todos os graus de liberdade; proteína totalmente ou parcialmente flexível e ligante flexível considerando todos os graus de liberdade (Fischer et al., 2014; Lin; Li; Lin, 2020).

Os métodos de busca são classificados basicamente em três categorias: sistemático, determinístico e métodos de busca estocástica (Menchaca et al., 2020).

Algoritmos de busca sistemática analisam o ligante a partir da construção de seus fragmentos explorando todos os graus de liberdade de forma incremental a partir do aumento do número de rotações livres e os ângulos formados a cada parte adicionada até a formação completa do ligante (Brooijmans; Kuntz, 2003).

Nos algoritmos de busca determinístico o estado inicial determina a movimentação que pode ser realizado para gerar o próximo estado, sendo geralmente igual ou menor que a energia do estado inicial. Além disso, o ligante pode ser analisado por métodos de simulação por dinâmica molecular que buscam conformações através de pequenas modificações no nível atômico avaliando-se o comportamento molecular (Brooijmans; Kuntz, 2003; Ruiz-Tagle et al., 2017).

O método de busca estocástica é realizado através de mudanças randômicas nos graus de liberdade do ligante. Entretanto, esse tipo de algoritmo não garante a convergência para a melhor solução, sendo necessário execuções adicionais do algoritmo para otimização dos resultados (Torres et al., 2019).

A exemplo de método de busca estocástica, algoritmos genéricos são inspirados na teoria da evolução de Darwin, de modo que o ligante é tratado como um cromossomo composto por seus genes representado pelos possíveis graus de liberdade (rotação de ligação e posicionamento do ligante no espaço) sendo alteradas ao longo do tempo com as melhores pontuações selecionadas (Moitessier et al., 2008).

Outro exemplo, o método de Monte Carlo, gera de forma aleatória conformações do ligante por meio de rotações de suas ligações de modo que a conformação obtida é testada em um critério de seleção baseada em energia. As conformações subsequentes são geradas a partir das seleções anteriormente aprovadas para a obtenção de um conjunto de configurações representativas. A principal vantagem desse método é a capacidade de testar um grande volume de possibilidades (Meng et al., 2011; Paquet; Viktor, 2015).

Nesse contexto, a utilização de estratégias computacionais possui contribuição fundamental para o direcionamento nos estudos de compostos com potencial para fármacos e como auxílio no entendimento de seus efeitos biológicos.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção da crisina

A crisina utilizada no presente estudo foi doada pelo professor Dr. Francisco das Chagas Alves Lima do Laboratório de Quântica Computacional & Planejamento de Fármaco, Universidade Estadual do Piauí (UESPI) com certificação expedida por Sm Empreendimentos Farmacêuticos LTDA obtendo uma pureza de 99%.

4.2 Teste de *A. salina*

O teste foi realizado baseado na metodologia proposta por Meyer et al., (1982) com adaptações. Os cistos de *Artemia salina* foram adquiridos em mercado local de Teresina – (PI), Brasil. A eclosão foi realizada com 50 mg de cistos, sendo incubados em solução salina preparada com sal marinho artificial (OceanTech®) utilizando-se 30g em 1L de água destilada mantida sob constante aeração e iluminação artificial durante 24h a 25°C. Após a eclosão, o ensaio seguiu com a diluição seriada da crisina preparada com solução salina em DMSO 0,5% + Tween 80 1% variando as concentrações pela metade de 1000 µM à 31,25 µM com 5 mL em cada tubo de ensaio em triplicata, também foram preparados os controles com apenas solução salina (SA) e o controle DMSO 0,5% + Tween 1% sem substância teste (CV). Foram selecionados 10 náuplios viáveis e adicionados aos tubos de ensaio sendo posteriormente mantidos ao abrigo da luz por 24h e 48h mantendo-se a mesma temperatura de eclosão. Ao fim dos períodos de exposição os náuplios mortos foram contados e a concentração letal média (CL₅₀) foi definida por regressão não linear. A toxicidade foi determinada com base na escala de McLaughlin et al. (1993) que classifica a toxicidade de extratos frente ao ensaio de *A. salina* com base na CL₅₀ (µg/ml) da seguinte forma: valores acima de 1000, não tóxicos; entre 1000 e 500, baixa toxicidade; entre 500 e 100, toxicidade moderada e valores menores com CL₅₀ < 100 µg/ml são considerados muito tóxicos.

4.3 Ensaio de *A. cepa*

O teste de *A. cepa* foi realizado conforme descrito por Fiskesjö (1993). Bulbos de uma única variedade de *A. cepa* foram adquiridos no comércio local, inicialmente foram higienizados em água corrente com a casca superficial removida, e foram submetidas à germinação em água mineral por 72h em temperatura controlada em torno de 25 °C ao abrigo da luz. Após a germinação, os bulbos com raízes com pelo menos 1,5 cm de comprimento foram colocados nas soluções de tratamento com crisina nas concentrações 250, 125 e 62,5 µM, além do controle veículo (DMSO 0,5% + Tween 80 1%) e controle positivo (0,6 µg/mL de CuSO₄) em um período de exposição de 24h.

Após o período de tratamento de 24h as raízes foram fixadas em etanol/ácido (3:1) por 24h e mantido sob refrigeração (2-8 °C), após esse período o fixador foi trocado por etanol 70% e estocado sob refrigeração (2-8 °C). Para a confecção das lâminas, foi realizado a hidrólise das raízes em HCL 1M por 20 min com incubação em reativo de Schiff por 2h e por fim as raízes foram coradas com solução de orceína acética 2%.

O potencial citotóxico foi avaliado pelo índice mitótico (IM) baseado no número de células em divisão para cada 1000 células observadas de acordo com a Equação 1.

$$IM = \frac{\text{nº de células em mitose}}{\text{nº total de células observadas}} \times 100\% \quad (1)$$

O potencial genotóxico foi avaliado a partir do índice de alterações cromossômicas (Mícronúcleo, C-metáfase, ponte, quebra e atrasos) de acordo com a Equação 2.

$$IAC = \frac{\text{nº de células com alterações}}{\text{nº total de células analisadas}} \times 100\% \quad (2)$$

Foram avaliadas em microscópio óptico 5000 células por concentração (1000 células por replicada) em quintuplicada para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade.

4.4 Cultura de células

As linhagens celulares B16-F10 (melanoma murino); U87 (glioblastoma humano); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) e MCF-10 (epitélio mamário humano não tumoral) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, mantidas em estufa com atmosfera de CO₂ a 5% a 37°C.

4.5 Ensaio de MTT

A análise da viabilidade celular pelo ensaio de MTT foi realizado de acordo com Mosmann (1983). As células (5×10^3 / 100µL) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂ com crisina diluída em DMSO (0,3 – 0,5%) nas respectivas linhagens de células em diluição seriada durante 68h: B16F10 (125 – 0,97 µM); U87 (200 – 1,56 µM); MCF-7 (200 – 3,12 µM) e MCF-10 (200 – 3,125 µM); o ensaio de combinação foi realizado na linhagem MCF-7 com o quimioterápico cisplatina (100 – 0,78 µM) e doxorrubicina (9-0 – 0,14 µM) mantendo uma concentração fixa de crisina a 50 µM. Após esse período foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL) com uma nova incubação nas mesmas condições durante 4h. Ao final do tratamento retirou-se o sobrenadante de cada poço e os cristais de formazam foram dissolvidos com 100 µL de DMSO durante 30 min e as absorbâncias foram medidas em leitor de microplaca (GloMax® Discover Microplate Reader) a 550 nm. A concentração capaz de diminuir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) foi determinada por regressão não linear.

4.6 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos. A seletividade da crisina foi realizada de acordo com Suffines e Pezzuto (1991). O IS da crisina foi obtido a partir da razão entre os valores da IC₅₀

das células não tumorais e IC_{50} das células tumorais ($IS = IC_{50}$ célula não tumoral / IC_{50} célula tumoral).

4.7 Avaliação dos parâmetros ADMET

Para a predição das propriedades farmacocinéticas da crisina e os fármacos antineoplásicos doxorrubicina e ciclofosfamida utilizou-se as seguintes plataformas online: SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>); Protox-3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/>) e Gusar (<https://www.way2drug.com/gusar/>). As plataformas mencionadas possuem bancos de dados com resultados experimentais associados à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e avaliações toxicológicas de compostos conhecidos. Assim a combinação das propriedades das estruturas já conhecidas possibilita a previsão desses e outros parâmetros para novos compostos.

4.8 Ancoragem molecular

Para a ancoragem molecular a estrutura química da crisina foi obtida da plataforma PubChem (CID: 5281607). As proteínas foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB) sendo elas: CDK1 (6gu6); CDK2 (3pxy); CDK6 (5l2s); ER- α (7uj8); EGFR (6s9b); VEGFR-2 (4asd) e aromatase (3s7s). Os alvos foram selecionados com base em uma avaliação preliminar realizada na plataforma SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) e também com base nos resultados experimentais de proliferação celular.

Inicialmente foi realizado o redocking com os ligantes co-cristalizados utilizando-se as coordenadas do próprio ligante (Tabela 1) em uma caixa padrão 40x40x40. O redocking foi considerado validado para um valor obtido de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) menor ou igual a 2 angstroms (MOITESSIER et al., 2008).

Tabela 1 - Coordenadas utilizadas do docking.

Alvo	ID PDB	x	y	z
CDK1	6gu6	23.643	21.815	-1.902
CDK2	3pxy	64.760	80.541	-84.826
CDK6	5l2s	23.152	35.980	-7.062
ER-α	7uj8	20.967	-28.064	12.370
EGFR	6s9b	-51.495	21.789	-0.213
VEGFR-2	4asd	-24.622	-0.388	-10.929
CYP19A1	3s7s	86.083	54.277	46.177

Fonte: Autoria própria.

Após o download das proteínas, o estado de protonação foi ajustado para 7,4 utilizando o servidor online APBS-PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>), a seguir a proteína e o ligante foi preparada utilizando o programa AutoDockTools v 1.5.6 sendo adicionado os hidrogênios polares e as cargas de Gasteiger. Após a preparação, o *docking* foi realizado utilizando-se o programa Autodock Vina (Trott; Olson, 2010). As análises dos resultados e as interações entre proteína e ligante foram feitas com os programas ChimeraX e Biovia Discovery Studio (BDS) (Baroroh, S.S.I., M.BIOTEK. et al., 2023; Meng et al., 2023).

4.9 Estatística

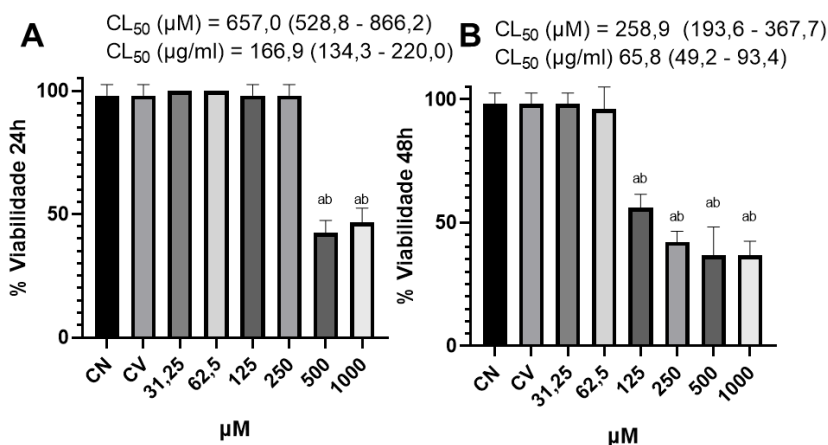
As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 9.5.1. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) Onde-Way ou Two-way com pós teste de Turkey, considerando $p < 0,05$, com nível de confiança de 95%. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade da crisina frente ao teste de *A. salina*

As menores taxas de viabilidade para os dois períodos de exposição foram 1000 e 500 μM com valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação ao controle veículo (CV) e o controle negativo (CN) (Figura 7). Para o período de 48h as concentrações de 250 e 125 μM apresentaram uma redução na viabilidade de 56 e 42% respectivamente, apresentando diferença estatística entre CV e CN. A concentração letal média (CL_{50}) para os períodos de 24 e 48h foram determinados em 657,0 μM (166,9 $\mu\text{g/mL}$) e 258,9 μM (65,8 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente, assim a toxicidade da crisina foi classificada como toxicidade moderada (24h) e muito tóxica (48h). Não houve diferença estatística na viabilidade entre o CV e CN.

Figura 7 – Toxicidade da crisina em diferentes concentrações (μM) nos tempos de 24 (A) e 48h (B) por meio do Bioensaio de Viabilidade em *Artemia salina*.



Valores são as médias $\pm$ desvio padrão. ANOVA one-way com pós teste de Tukey, ^a $p < 0,05$ comparado com o controle veículo (CV) formado por DMSO 0,5% e Tween 80 1,0%; ^b $p < 0,05$ comparado com solução salina 30 g/L (CN). Cada concentração foi executada em triplicada (10 náuplios vivos/tubo). CL_{50} : concentração letal média.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Efeitos toxicogenéticos da crisina em *A. cepa*

A análise da citotoxicidade através da avaliação do índice mitótico no período de 24h (Tabela 2) revelou que nas concentrações de 250 e 125 μM houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle veículo e ao controle positivo

sendo menor e maior respectivamente. Na concentração de 62,5 μM houve diferença estatística apenas em relação ao controle positivo.

Em relação as fases do ciclo celular, o número de intérfases nas concentrações de 250 e 125 μM foram superiores em relação ao controle veículo, já em relação ao controle positivo todas as concentrações foram inferiores com diferença estatística. As três concentrações apresentaram diferença significativa em prófase em relação a ambos os controles, com redução para as concentrações de 250 e 125 μM e aumento para a concentração de 62,5 μM .

Tabela 2 - Avaliação do índice mitótico (IM) e das diferentes fases do ciclo celular após 24hs de tratamento com a crisina em células meristemáticas vegetais.

Análise	Tratamento (24h)				
	CV	CP	250 μM	125 μM	62,5 μM
IM	35,1 $\pm$ 0,7 ^b	13,3 $\pm$ 1,6 ^a	23,5 $\pm$ 2,6 ^{a,b}	28,9 $\pm$ 2,4 ^{a,b}	38,5 $\pm$ 2,5 ^b
Intérfase	649,0 $\pm$ 7,4 ^b	866,8 $\pm$ 16,2 ^a	764,6 $\pm$ 25,8 ^{a,b}	710,6 $\pm$ 24,3 ^{a,b}	614,8 $\pm$ 24,7 ^b
Prófase	305,4 $\pm$ 6,9 ^b	99,6 $\pm$ 12,1 ^a	206,2 $\pm$ 19,2 ^{a,b}	229 $\pm$ 26,9 ^{a,b}	355,2 $\pm$ 20,8 ^{a,b}
Metáfase	12,8 $\pm$ 3,1	11,8 $\pm$ 3,3	11,2 $\pm$ 1,5	20,8 $\pm$ 10,6	12 $\pm$ 4,6
Anáfase	6,4 $\pm$ 1,5	10,8 $\pm$ 2,6	6,2 $\pm$ 1,9	10,8 $\pm$ 3,6	3,8 $\pm$ 0,8 ^b
Telófase	26,4 $\pm$ 3,2 ^b	11,0 $\pm$ 5,6 ^a	11,8 $\pm$ 6,1 ^a	28,8 $\pm$ 8,7 ^b	14,2 $\pm$ 5,1 ^a

Valores são as médias $\pm$ desvio padrão. CV: controle veículo (DMSO 0,5% + Tween 80 1%); CP: controle positivo (CuSO_4 ; 0,6 $\mu\text{g/ml}$); IM: índice mitótico. ANOVA two-way com pós teste de Tukey com $p < 0,05$. ^a diferença estatística significativa em relação ao CV e ^b diferença estatística em relação ao CP.

Fonte: Autoria própria.

As aberrações cromossômicas observadas não foram estatisticamente diferentes em relação ao controle veículo, ocorrendo diferença apenas em relação ao controle positivo em todas as concentrações testadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação da genotoxicidade das diferentes concentrações de Crisina em células de *A. cepa*.

AC	Tratamento (24h)				
	CV	CP	250 μ M	125 μ M	62,5 μ M
MN	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	3,40 $\pm$ 1,14 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b
C-met	0,20 $\pm$ 0,45 ^b	4,80 $\pm$ 0,84 ^a	0,20 $\pm$ 0,45 ^b	0,20 $\pm$ 0,45 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b
PN	0,20 $\pm$ 0,45 ^b	5,00 $\pm$ 2,35 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,40 $\pm$ 0,55 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b
QR	0,20 $\pm$ 0,45 ^b	10,20 $\pm$ 0,84 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	0,20 $\pm$ 0,45 ^b
AT	0,20 $\pm$ 0,00 ^b	10,00 $\pm$ 1,58 ^a	0,40 $\pm$ 0,89 ^b	0,60 $\pm$ 0,55 ^b	0,80 $\pm$ 1,30 ^b
TAC	0,80 $\pm$ 1,10 ^b	33,40 $\pm$ 4,56 ^a	0,60 $\pm$ 0,89 ^b	1,20 $\pm$ 1,30 ^b	1,00 $\pm$ 1,73 ^b

Valores são as médias $\pm$ desvio padrão. CV – controle veículo (DMSO 0,5% + Tween 80 1%); CP – controle positivo (CuSO₄; 0,6 μ g/ml); AC – alterações cromossômicas; MN – micronúcleo; C-met – C-metáfase; PN – ponte cromossômica; QR – quebra; AT – atraso; TAC – total de aberrações cromossômicas. ANOVA two-way com pós teste de Tukey com $p < 0,05$. ^b diferença estatística em relação ao CP.

Fonte: Autoria própria.

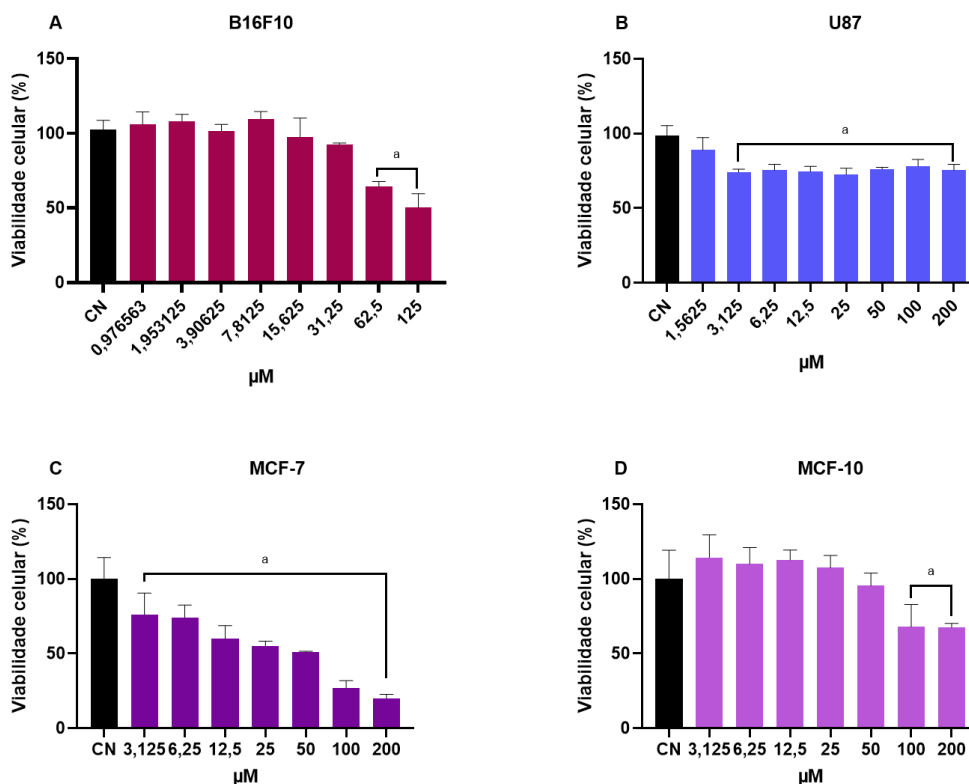
5.3 Avaliação da viabilidade celular da crisina no ensaio de MTT

A viabilidade celular na linhagem B16F10 após 72 h de tratamento demonstrou que a crisina provocou uma redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (CN) nas maiores concentrações de 62,5 e 125 μ M. Na maior concentração a viabilidade celular foi em torno de 50% e não sendo possível estimar o valor de IC₅₀ (Figura 8A). Na linhagem U87 todas as concentrações do intervalo 3,125 – 200 μ M causaram uma redução significativa em relação ao CN, entretanto, mais uma vez não foi possível estimar o valor de IC₅₀ de modo que a viabilidade celular em 200 μ M foi determinada em $75,3 \pm 4,0\%$ (Figura 8B).

De modo distinto, na linhagem MCF-7 foi possível calcular o valor de IC₅₀ em 53,4 μ M, com uma redução significativa na viabilidade celular em comparação com o CN em todas as concentrações testadas no intervalo 3,125 – 200 μ M. A viabilidade foi determinada em $19,9 \pm 2,8\%$ para a maior concentração (Figura 8C).

Para a linhagem MCF-10 o valor de IC_{50} estimado foi de 120,8 μM com redução da viabilidade celular de maneira significativa em relação ao controle negativo nas maiores concentrações de 100 e 200 μM (Figura 8D). O índice de seletividade foi calculado em 2,2 para a linhagem MCF-7 (Tabela 4).

Figura 8 – Viabilidade celular em diferentes linhagens celulares (A-E) em exposição de 72 h à crisina.



Valores são as médias $\pm$ desvio padrão. ANOVA one-way com pós teste de Tukey ^a $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (CN) formado por DMSO (0,3-0,5%). Cada concentração foi executada em triplicada.

Fonte: Autoria própria.

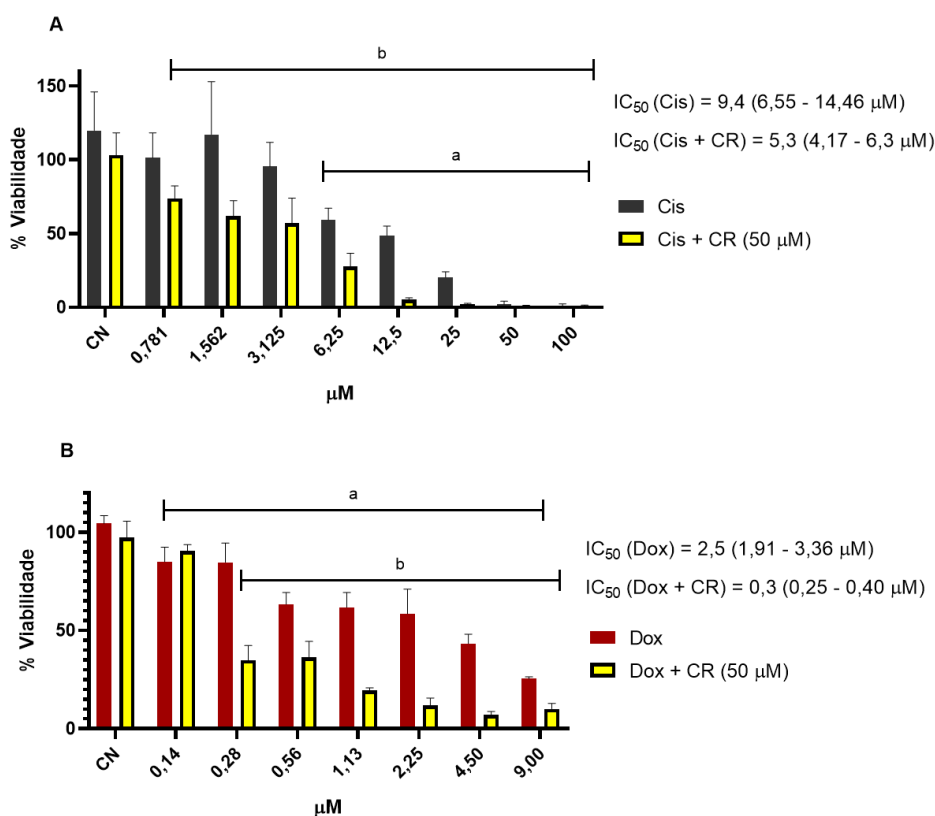
Tabela 4 – Concentração Inibitória 50% (IC_{50}) da crisina frente à diferentes linhagens celulares com exposição de 72h.

Linhagem	IC_{50} (μM)	Índice de seletividade (SI)
B16F10	> 125	-
U87	> 200	-
MCF-7	53,4 (23,7 – 133,5)	2,2
MCF-10	120,8 (39,53 – 785,1)	-

Fonte: Autoria própria.

A combinação da crisina com quimioterápicos, na linhagem MCF-7 (Figura 9), promoveu a diminuição dos valores de IC_{50} para doxorrubicina (2,5 para 0,3 μM) e cisplatina (9,4 para 5,3 μM). Para a associação com cisplatina todas as concentrações demonstraram diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo. Para a doxorrubicina, essa diferença só não ocorreu na menor concentração.

Figura 9 - Viabilidade de células MCF-7 em concentração fixa de crisina (50 μM) associada a cisplatina (A) e doxorrubicina (B).



Valores são as médias $\pm$ desvio padrão. IC_{50} : Concentração inibitória de 50% $\pm$ intervalo de confiança (95%). ANOVA one-way com pós teste de Tukey ^a $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (CN) formado por DMSO (0,5%). Cada concentração foi executada em triplicada.

Fonte: Autoria própria.

5.4 Predições das propriedades ADMET para a crisina

Os parâmetros de interesse farmacológico da Crisina foram determinados de modo *in silico* com base na ferramenta online SwissADME (Tabela 5). Para a crisina foi determinada uma alta absorção gastrointestinal, com permeabilidade à barreira hematoencefálica e inibição de três enzimas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4). A crisina não violou nenhuma das regras prevista para compostos candidatos a fármacos. Em relação aos aspectos toxicológicos, foi prevista

nefrotoxicidade e toxicidade respiratória sendo determinado ainda um efeito mais potente através da via intravenosa ($DL_{50} = 194,8 \text{ mg/Kg}$) (Tabela 6).

Tabela 5 – Propriedades *in silico* da Crisina (CR), Doxorubicina (DOX) e Ciclofosfamida indicadas pelo SwissADME.

Propriedades físico-químicas	CR	DOX	CIC
Peso molecular (PM)	254,24 g/mol	543.52 g/mol	261.09 g/mol
Nº de átomos aceptores para ligação de H	4	12	4
Nº de átomos doadores para ligação de H	2	6	1
Área de superfície polar topológica (TPSA)	70,67 Å ²	206.07 Å ²	51,38 Å ²
Coeficiente partição octanol-água Log $P_{o/w}$	2,55	0.52	1.23
Propriedades Farmacocinéticas			
Absorção Gastrointestinal (GI)	Alta	Baixa	Alta
Permeabilidade à barreira hematoencefálica (BHE)	Sim	Não	Sim
Substrato glicoproteína P (P-gp)	Não	Sim	Não
Inibidor CYP1A2	Sim	Não	Não
Inibidor CYP2C19	Não	Não	Não
Inibidor CYP2C9	Não	Não	Não
Inibidor CYP2D6	Sim	Não	Não
Inibidor CYP3A4	Sim	Não	Não
Semelhança a fármaco			
Lipinski	Sim; 0 violação	Não; 3 violações	Sim; 0 violação
Ghose	Sim	Não; 2 violações	Sim
Veber	Sim	Não; 1 violação	Sim
Egan	Sim	Não; 1 violação	Sim
Muegge	Sim	Não; 3 violações	Sim
Pontuação de biodisponibilidade	0,55	0,17	0,55

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6 - Parâmetros toxicológicos da Crisina (CR), Doxorubicina (DOX) e Ciclofosfamida previstos através do PROTOX 3 e GUSAR.

Parâmetro	CR	DOX	CIC
Hepatotoxicidade	Inativo	Inativo	Inativo
Neurotoxicidade	Inativo	Ativo	Ativo
Nefrotoxicidade	Ativo	Ativo	Ativo
Toxicidade respiratória	Ativo	Ativo	Ativo

Cardiotoxicidade	Inativo	Ativo	Inativo
Carcinogenicidade	Inativo	Inativo	Ativo
Mutagenicidade	Inativo	Ativo	Ativo
Citotoxicidade	Inativo	Ativo	Inativo
Imunotoxicidade	Inativo	Ativo	Inativo
DL ₅₀ (mg/Kg) SC	3271,0	27,7	107,4
DL ₅₀ (mg/Kg) Oral	849,7	110,8	104,6
DL ₅₀ (mg/Kg) IP	844,4	6,4	166,0
DL ₅₀ (mg/Kg) IV	194,8	27,8	309,8

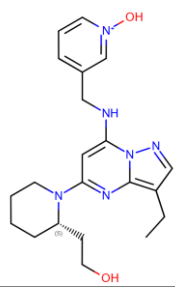
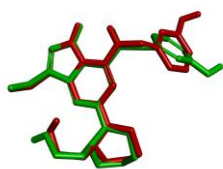
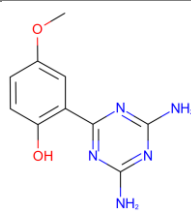
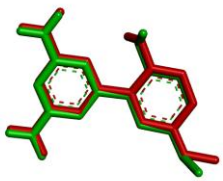
DL₅₀ – Dose letal média; SC – Subcutâneo; IP – Intraperitoneal; IV – Intravenoso

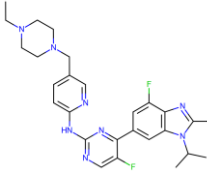
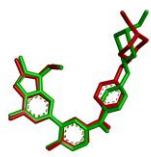
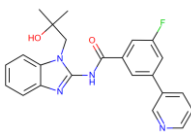
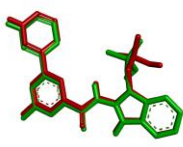
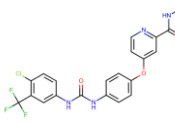
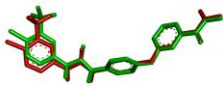
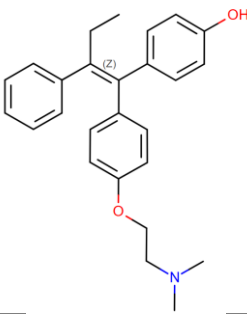
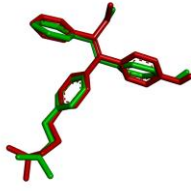
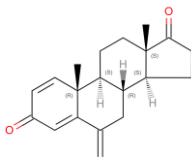
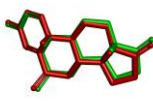
Fonte: Autoria própria.

5.5 Ancoragem molecular dos alvos selecionados

A tabela 7 demonstra os redockings dos alvos selecionados juntamente com seus ligantes co-cristalizados a partir do banco de dados PDB. Foi obtido um valor de RMSD < 2 Å para todas as análises indicando a viabilidade do processo de ancoragem para outros ligantes de interesse.

Tabela 7 - Resultado dos RMSD's após o redocking.

Alvo	Ligante de referência	Estrutura química do ligante de referência	RMSD (Å)	Sobreposição do ligante de referência com o resultado do redocking
CDK1	Dinaciclib		1,25	
CDK2	JWS		0,44	

CDK6	Abemaciclibe		1,36	
EGFR	L1H		0,36	
VEGF R-2	Sorafenibe		0,61	
ER-α	4-Hidroxitamoxi feno		0,99	
CYP19 A1	Exemestano		0,23	

Vermelho: Ligante na posição original; Verde: Ligante após o redocking. **JWS**: 2-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methoxyphenol; **L1H**: 3-fluoranyl-~{N}-[1-(2-methyl-2-oxidanyl-propyl)benzimidazol-2-yl]-5-pyridin-3-yl-benzamide.
 Fonte: Autoria própria.

As afinidades de ligação da crisina para os alvos selecionados (Tabela 8) manteve-se dentro da faixa de (-7,8) – (-10,2) kcal/mol sendo o maior apresentado superior inclusive que a afinidade de ligação do ligante de referência para CDK2 (-9,0 kcal/molL).

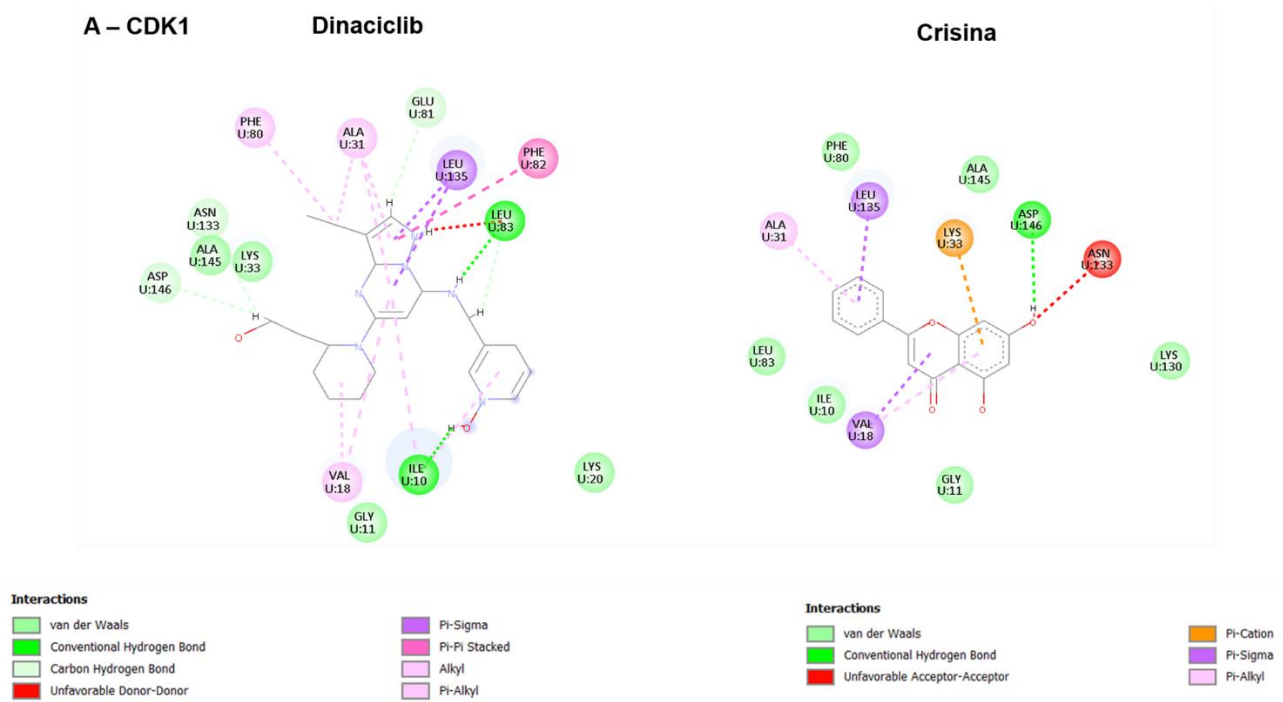
Tabela 8 - Afinidades de ligação da crisina e ligantes de referência.

Alvo	Afinidade de ligação do ligante de referência (kcal/mol)		Afinidade de ligação da Crisina (kcal/mol)
CDK1	Dinaciclib	-8,8	-8,1
CDK2	JWS	-9,0	-10,2
CDK6	Abemaciclibe	-10,1	-8,5
EGFR	L1H	-9,3	-7,8
VEGFR2	Sorafenibe	-12,0	-9,0
ER-α	4-Hidroxitamoxifeno	-9,6	-8,2
CYP19A1	Exemestano	-10,6	-8,3

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 10 é possível observar a conservação de interações entre os ligante Dinaciclib e Crisina por meio dos aminoácidos GLY11; ILE;10; ASP146; LYS33; ALA31; PHE80; LEU83 e ASN133. Em ambos os casos foi apresentado uma interação não favorável.

Figura 10 - Interações moleculares resultantes da ancoragem com a proteína CDK1.

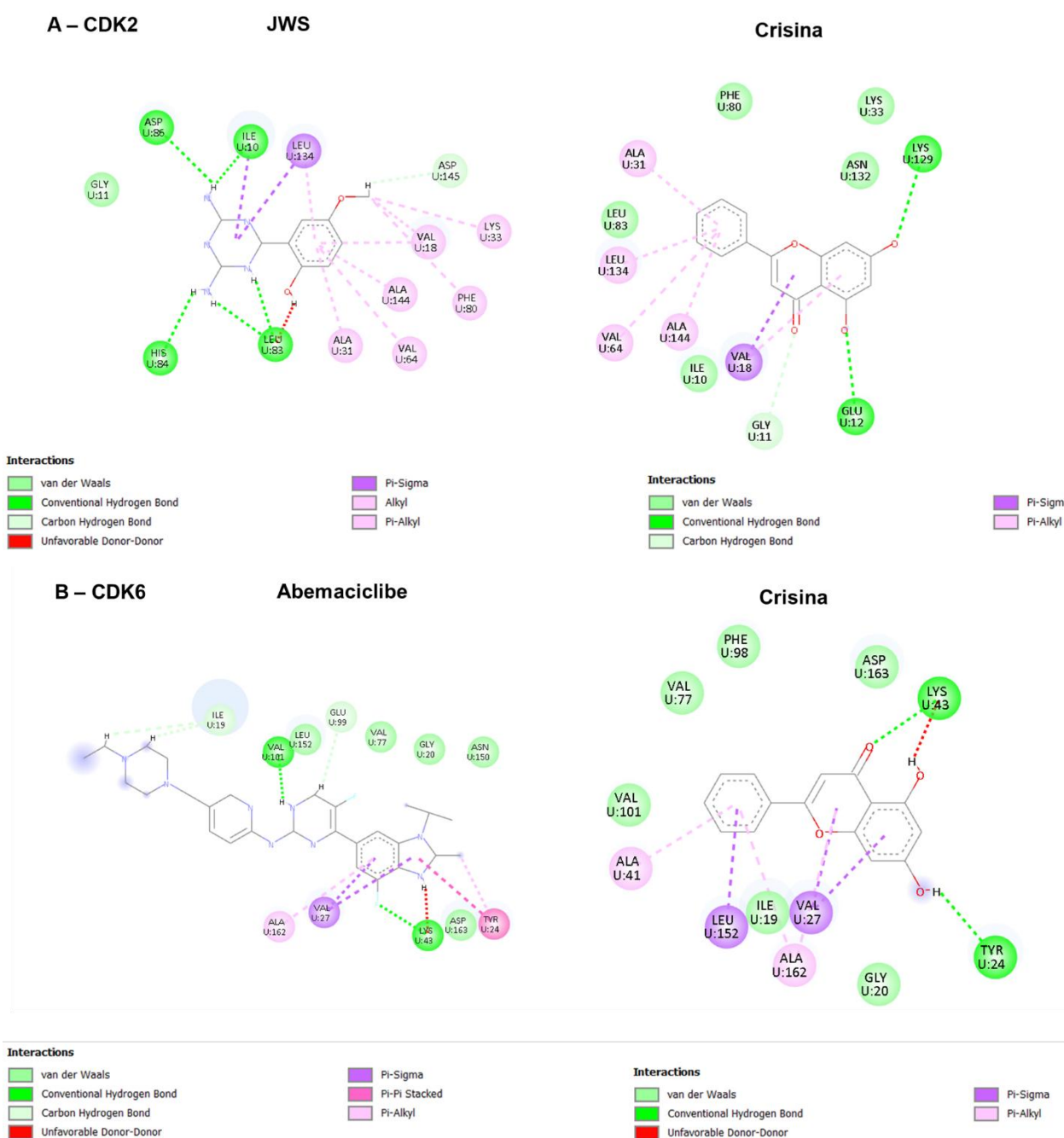


Fonte: Autoria própria.

Em relação as interações conservadas no alvo CDK2 (Figura 11) é possível destacar: GLY11; LEU83; ALA31; VAL64; ALA144; PHE80; LYS33; LEU134; VAL18

e ILE10. Além disso, uma interação não favorável no ligante de referência JWS deixou de existir na interação com a Crisina. Na proteína CDK6 persistiram as interações ALA162; VAL27; LYS43; ASP163; TYR24; GLY20; VAL77; VAL101 e ILE19. A interação não favorável foi conservada em ambos os alvos no mesmo aminoácido LYS43.

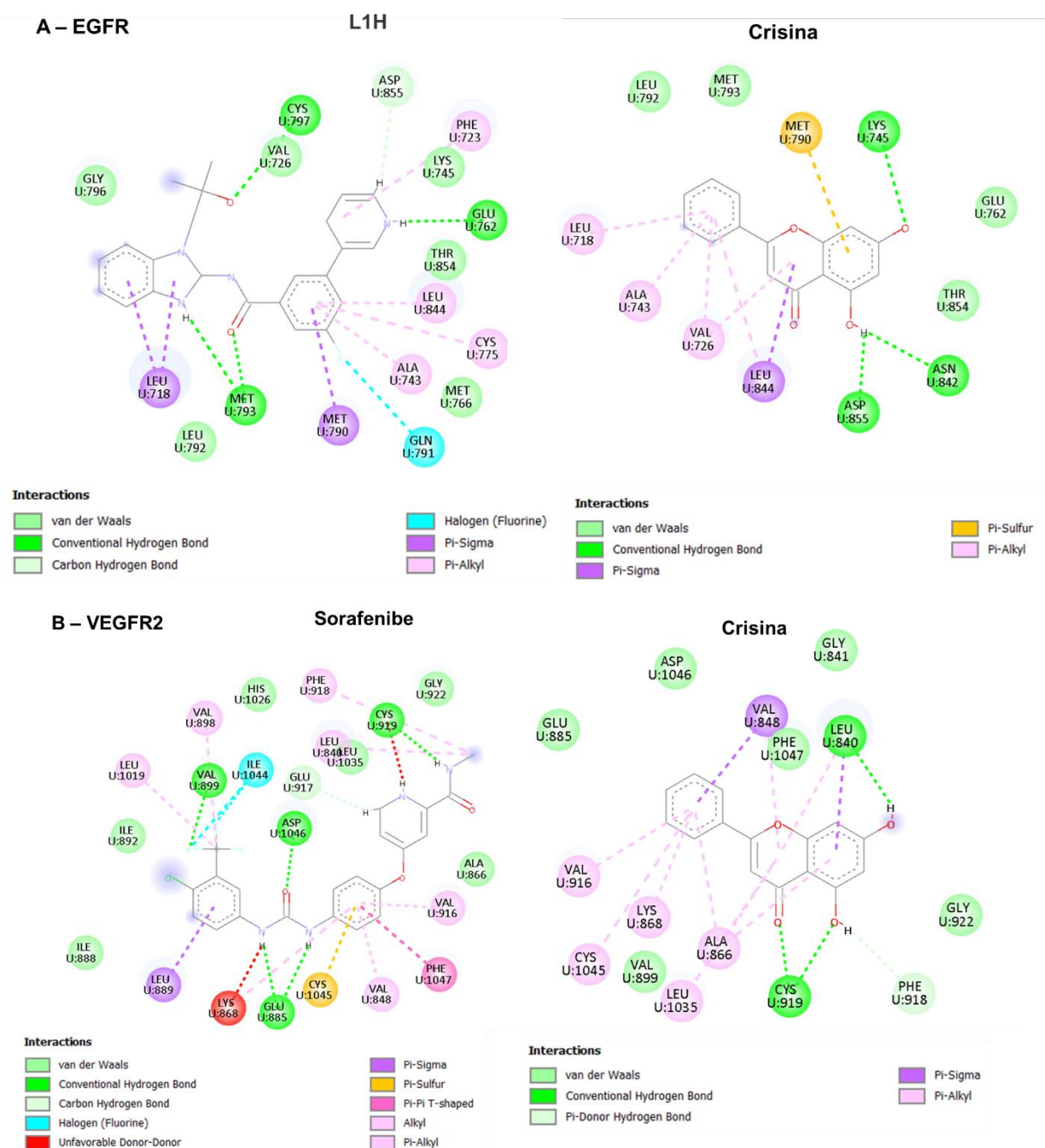
Figura 11 - Interações moleculares resultantes da ancoragem com as proteínas CDK2 (A) e CDK6 (B).



Fonte: Autoria própria.

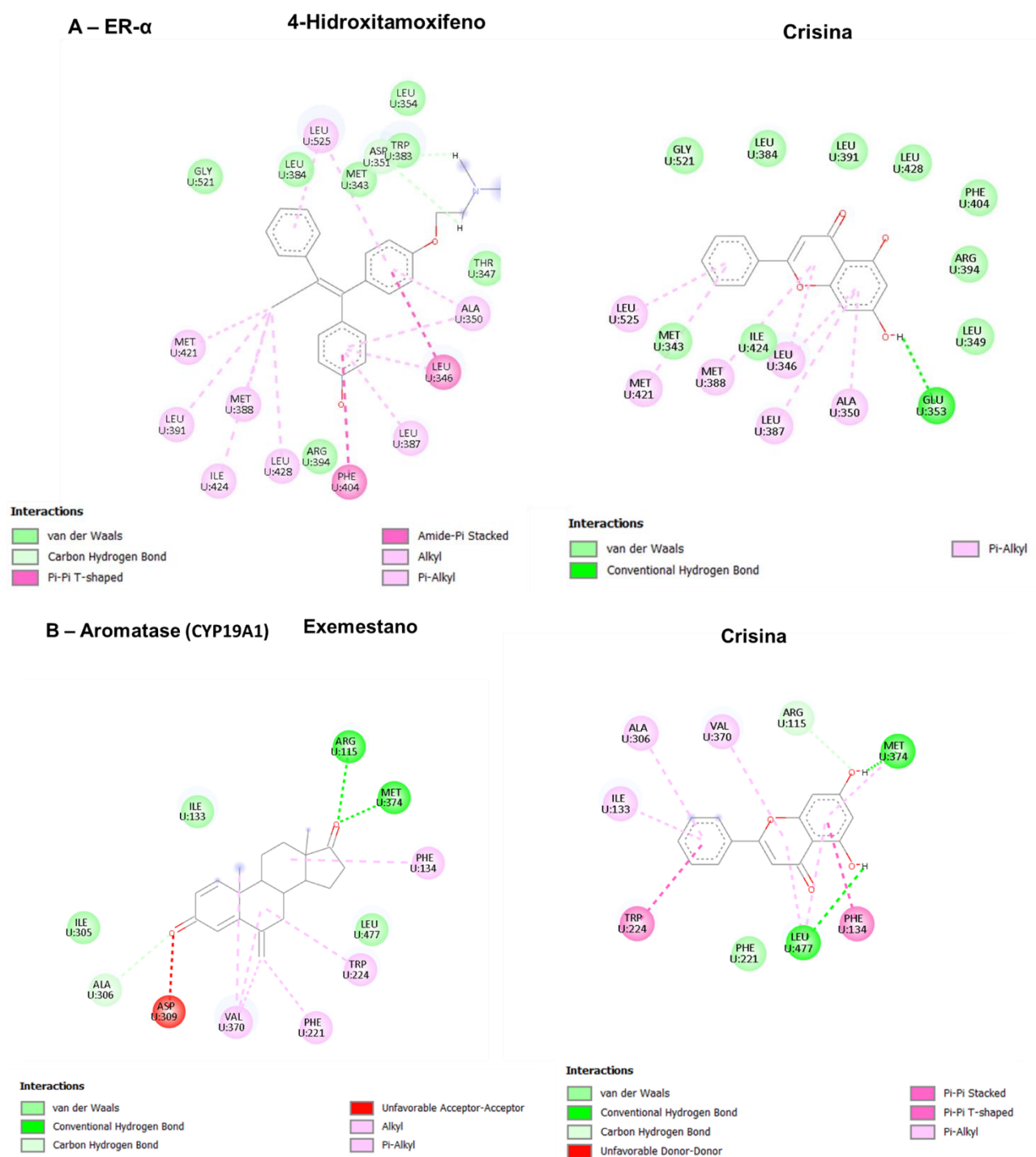
Para o receptor EGFR (Figura 12) foram mantidas na crisina interações nos aminoácidos ALA743; LEU844; THR854; GLU762; LYS745; ASP855; VAL726; LEU792; MET793 E MET790. Já para o ligante VEGFR2 é possível identificar as seguintes associações conservadas na crisina: VAL848; PHE1047; VAL916; ALA866; GLY922; LEU1035; LEU840; ASP1046; LYS868; GLU885 e CYS1045.

Figura 12 - Interações moleculares resultantes da ancoragem com as proteínas EGFR (A) e VEGFR2 (B).



Os contatos mantidos (Figura 13) no ER- α para a crisina em relação ao composto 4-hidroxitamoxifeno foram: PHE404; LEU387; LEU346; ALA350; MET343; LEU525; LEU384; GLY521; MET421; LEU391; ILE424; MET388; LEU428 e ARG394. Em relação a enzima aromatase foram conservadas nove interações nos aminoácidos PHE221; TRP224; LEU477; PHE134; MET374; ARG115; ILE133; ALA306 e VAL370.

Figura 13 - Interações moleculares resultantes da ancoragem com as proteínas ER- α (A) e Aromatase (B).



6 DISCUSSÃO

A análise toxicológica de substâncias bioativas é essencial em estudos de compostos com potencial atividade antitumoral, uma vez que permite uma avaliação para demonstrar em que concentração esses efeitos podem ocorrer (Giolito et al., 2020; Lisboa et al., 2019).

O ensaio de *Artemia salina* pode ser utilizado para a avaliação de diversos tipos de amostras como compostos isolados, extratos, nanopartículas, amostras complexas para avaliação ecotoxicológica, entre outros. Sendo um ensaio de fácil manuseio e baixo custo, permite uma avaliação inicial, podendo ser correlacionado com efeitos citotóxicos e antitumorais (Albarano et al., 2022; Cardoso et al., 2024; De Lima et al., 2019; Muthukrishnan; Senthil Kumar; Rao, 2017).

A crisina foi classificada de acordo com a escala de McLaughlin *et al.* (1993) com toxicidade moderada no período de 24h ($CL_{50} = 657,0 \mu M = 166,9 \mu g/ml$) e muito tóxica no período de 48 h ($CL_{50} = 258,9 \mu M = 65,8 \mu g/ml$). Entretanto é importante destacar que a escala leva em consideração extratos, onde o efeito resultante pode depender da combinação dos efeitos de vários compostos constituintes.

A crisina foi considerada não tóxica para o ensaio de *A. salina* em outros estudos (Kharsany et al., 2019) quando complexada com ciclodextrinas, onde apresentou uma taxa de letalidade de 4,15% quanto testada à 1mg/mL (3937 μM aproximadamente em conversão direta). A formação de complexo de ciclodextrinas pode diminuir a toxicidade de substâncias, sendo atribuído ao seu aspecto hidrofílico com liberação gradual do composto complexado em sua cavidade (Geng et al., 2021; Manivannan et al., 2014).

Entre as concentrações avaliadas no teste de *A. salina*, a concentração de 250 μM apresentou diferença estatística em relação ao CN na análise de 48 h, entretanto seu efeito foi ausente na análise de 24 h. Assim para a análise em *A. cepa* foi definido as diluições a partir de 250 μM para verificar possíveis alterações citotóxicas e/ou genotóxicas nesse sistema teste. A avaliação dos efeitos toxicológicos da crisina no ensaio de *Allium cepa* revelou um efeito citotóxico nas concentrações 250 e 125 μM através da diminuição do índice mitótico em relação ao CV. A redução do IM está relacionado ao aumento do número de interfases nas respectivas concentrações, indicando que as células estão levando mais tempo que normalmente levariam para iniciar o processo de divisão celular (mitose). Esse efeito também pode ser observado

pela diminuição do número de prófases nas respectivas concentrações (Leme; Marin-Morales, 2009; Wijeyaratne; Wickramasinghe, 2020). As alterações na intérfase que levam a redução do índice mitótico podem ocorrer devido a diminuição da disponibilidade de ATP, acarretando em uma inibição da síntese de DNA, ou ainda pode acontecer um bloqueio na fase G2 através de danos não reparados no DNA, de modo a impedir a célula de iniciar a mitose (González-Fernández; Hernández; López-Sáez, 1985; Pandey; Kumar; Roy, 2014; Schneiderman; Dewey; Highfield, 1971; Sudhakar; Ninge Gowda; Venu, 2001; Van't hof, 1968).

Foi evidenciado o efeito da crisina em induzir a parada do ciclo celular em G₂/M em linhagens tumorais causando também morte por apoptose, sendo relatada como um possível composto candidato à medicamento antineoplásico (Sassi et al., 2018; Zhang; Zhao; Wang, 2009).

Na avaliação das aberrações cromossômicas no teste de *A. cepa*, não houve alterações significativas em relação ao controle veículo, demonstrando que a crisina não possui potencial genotóxico, diferentemente, fármacos antineoplásicos exibem atividade genotóxica quando avaliados pelo mesmo sistema teste (Mišík et al., 2014). Nesse sentido, a citotoxicidade da crisina combinada com o potencial genotóxico dos quimioterápicos pode nortear aplicações contra o câncer (Tedesco et al., 2012). Além disso, o potencial indutor da parada do ciclo celular da crisina tem sido explorado para potencializar o uso de medicamentos antitumorais usuais da prática clínica como a doxorrubicina e 5-fluorouracil (Gao et al., 2013; Lee; Lee; Jung, 2020; Li et al., 2015).

Dado os efeitos citotóxicos observados para a crisina, também foi analisado seu potencial antiproliferativo. Entre as análises realizadas no ensaio de viabilidade por MTT não foi possível estimar o valor de IC₅₀ para as linhagens B16F10 e U87 visto que não houve efeito apreciável nas maiores concentrações. Na investigação de (Mahdi et al., 2023) em células da linhagem U87, a crisina na maior concentração analisada (12,5 µM) foi capaz de reduzir a viabilidade celular para (80,5%) sendo próximo ao encontrado no presente trabalho (74,5%) na mesma concentração. Nesse estudo, os autores utilizaram uma estratégia de formulação da crisina em ciclodextrina provocando a diminuição da viabilidade celular para 20,1% em 12,5 µM.

Entre as linhagens celulares utilizadas no ensaio de viabilidade, um maior efeito citotóxico foi observado para a linhagem MCF-7 com um valor de IC₅₀ = 53,4 µM de modo que o índice de seletividade foi determinado em 2,2 comparado a linhagem não tumoral MCF-10 (IC₅₀ = 120,8 µM). Além disso, a linhagem MCF-7 foi a única com

diferença significativa em relação ao CN em todas as concentrações analisadas, sendo mais um possível indicativo de maior sensibilidade aos efeitos da crisina dentre as linhagens testadas. Esse achado está de acordo com o trabalho de (Ramos et al., 2024) onde foi avaliado a atividade citotóxica da crisina frente a linhagem MCF-7 ($IC_{50} = 52,35 \mu M$) no período de 48 h e para a linhagem tumoral de mama (MDA-MB-231) com valor de $IC_{50} = 74,50 \mu M$ com um índice de seletividade igual a 2,08 e 2,07 respectivamente. Os autores identificaram ainda o aumento de caspase-9 como indicativo de morte por apoptose, também sendo demonstrado em outros trabalhos como sendo o efeito preferível de morte celular (Kumar et al., 2024; Samarghandian et al., 2016).

É relatado a ação da crisina em vias chaves de proliferação tumoral (Shahbaz et al., 2023). Seu potencial em inibir a via Nrf2 foi associada ao aumento da taxa de apoptose, sendo uma estratégia favorável em combinação com a quimioterapia, visto que o fator de transcrição Nrf2 é responsável por regular genes associados a promover proteção contra os danos celulares provocados por medicamentos antineoplásicos (Sabzichi et al., 2017; Zimta et al., 2019). Além disso, foi mostrado o efeito da crisina em induzir a parada do ciclo celular (MCF-7) em G_0/G_1 acompanhado pela diminuição de ciclina D1. Adicionalmente, a crisina é capaz ainda de aumentar os níveis da proteína Bax (pró-apoptótica) e diminuir os níveis da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Ghosh et al., 2023).

Os resultados apresentados para crisina até o momento indicaram uma toxicidade a depender da concentração, além de um maior efeito antiproliferativo em células MCF-7. Dessa forma, buscou-se entender sua possível ação em combinação com quimioterápicos sendo associada com doxorrubicina e cisplatina.

A combinação da crisina em uma concentração fixa de $50 \mu M$ provocou a diminuição nos valores de IC_{50} em ambos os casos de 9,45 para $5,3 \mu M$ em relação a doxorrubicina e de 2,5 para $0,3 \mu M$ no caso das cisplatina.

Assim como apresentado no presente trabalho, uma redução no IC_{50} em torno de 50% foi observada para células de carcinoma oral SCC-25 e CAL-27 após a combinação de cisplatina com $56 \mu M$ de crisina, resultando no aumento de danos oxidativos e indução de apoptose (Chen; Li; Jiang, 2023). Em células HepG2, a combinação promoveu apoptose com acúmulo de p53 após um pré-tratamento com crisina por 2h (Li et al., 2015b).

O uso combinado de quimioterápicos com substâncias bioativas pode ser uma estratégia de quebra de resistência com o aumento da sensibilidade de tumores, com consequente redução do uso do fármaco e menos efeitos tóxicos (Leung et al., 2008; Wang et al., 2018).

A crisina foi capaz de sensibilizar células de câncer de pulmão (H157, H1975 e H460) aumentando o efeito citotóxico da doxorrubicina através da diminuição dos níveis de GSH provocando um aumento no estresse oxidativo celular (Brechbuhl et al., 2012).

O conjunto de resultados apresentados até o momento evidencia o potencial citotóxico e antiproliferativo da crisina, assim pensando em aplicações futuras buscou-se entender as propriedades desse composto em análises *in silico* para verificar se ela cumpre pré-requisitos fundamentais indicados para candidatos a fármacos. Foi possível observar na predição *in silico* para a crisina que ela cumpre todas as previsões de semelhanças à fármacos assim como o quimioterápico ciclofosfamida. É importante mencionar que a violação desses parâmetros não exclui a possibilidade da aplicação clínica, como exemplo, a doxorrubicina viola todos os parâmetros previstos e mesmo assim é um medicamento antineoplásico amplamente utilizado contra células tumorais. Também é importante destacar que os parâmetros de semelhanças à fármacos são direcionados para biodisponibilidade oral, entretanto, ainda sim a maioria dos fármacos seguem os parâmetros pré-definido por Lipinski bem como suas variações (Singh et al., 2022; Walters, 2012; Yadav et al., 2021).

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos, a crisina é indicada com ação inibitória em relação as enzimas hepáticas do citocromo P450 (CYP) que são responsáveis pelo metabolismo por mais de 80% dos medicamentos (Banerjee et al., 2020). Foi relatado experimentalmente sua ação em inibir a isoforma CYP1A2 sendo mais potente entre todos os flavonoides testados (Lee et al., 1998). Seu efeito inibitório foi correlacionado com seu padrão de hidroxilas (Tsyrllov; Mikhailenko; Gelboin, 1994). Outros trabalhos também evidenciam o mesmo efeito sendo sugerido o uso da crisina como um agente contra a intoxicação por paracetamol (Bojić et al., 2019; Pingili; Pawar; Challa, 2019). A inibição das enzimas da CYP possui um efeito na quimioterapia visto que pode elevar a toxicidade do tratamento pelo acúmulo de compostos não metabolizados. Entretanto o efeito inibitório também pode ser utilizado como estratégia para garantir a biodisponibilidade de fármacos que são mais rapidamente metabolizados (Iacopetta et al., 2023; Mittal et al., 2015).

A maioria dos medicamentos quimioterápicos possuem elevada toxicidade podendo ser um fator limitante no seu uso, sendo a avaliação do fator risco/benefício um ponto chave para a escolha do melhor tratamento (Corey et al., 2020; Fisusi; Akala, 2019). Para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos da crisina, a plataforma Protox 3 indicou que ela possui uma menor toxicidade geral em comparação com os quimioterápicos selecionados sendo o status ativo/inativo definido pela probabilidade dessa atividade ter mais ou menos que 50% de chances de ocorrer (Banerjee et al., 2024).

A crisina é descrita com ação oposta sobre a sua possível nefrotoxicidade, sendo relatado seus efeitos protetores em modelo animal contra intoxicação renal por cádmio (Cd) e capacidade protetora frente o uso dos quimioterápicos bortezomibe e ciclofosfamida ao mesmo órgão alvo. Além disso, a crisina tem a capacidade de modular o efeito de enzimas (SOD, CAT, GPx e GSH) responsáveis pela atividade antioxidante (Kankiliç et al., 2024; Şimşek et al., 2023; temel et al., 2020). A crisina também é relatada possuindo efeitos protetores em células do tecido pulmonar contra cádmio e cisplatina por seus efeitos antioxidantes. Adicionalmente também é demonstrado seus efeitos em diminuir a toxicidade induzida em outros órgãos como cérebro, coração e fígado (Akaras et al., 2023; Oladipo et al., 2023; Samarghandian; Farkhondeh; Azimi-Nezhad, 2017). Assim, os alertas negativos apresentados aparentemente parecem não demonstrar a inviabilidade do uso da crisina.

A toxicidade prevista pela base de dados Gusar está de acordo com os resultados apresentados, uma vez que a crisina apresentou toxicidade reduzida comparada aos quimioterápicos doxorrubicina e ciclofosfamida. A toxicidade aguda oral da crisina foi relatada em modelo animal (camundongo) não sendo possível estimar seu valor ($DL_{50} > 4000$ mg/kg) de modo que ela foi considerada como tendo baixo potencial tóxico (Balta et al., 2015).

De modo semelhante, a avaliação da toxicidade oral da crisina em ratos Sprague Dawley permitiu determinar uma DL_{50} de 4350 mg/kg. No estudo subcrônico, a administração diária da substância na dose de 1000 mg/kg ao longo de 90 dias levou a alterações nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos, com impacto mais evidente no fígado e nos rins. Em contrapartida, a exposição à dose de 500 mg/kg não resultou em efeitos adversos relevantes (YAO et al., 2019). Assim, as análises previstas para a crisina indicam o seu baixo potencial tóxico dentro de valores limites.

A baixa toxicidade estipulada para a crisina foi explorada contra os efeitos genotóxicos provocados pela quimioterapia convencional. Sassi et al., (2021) demonstraram o efeito protetor da crisina, após um pré-tratamento de 24 h, reduzindo os efeitos genotóxicos causados pelo quimioterápico Mitomicina-C em camundongos Balb/C. Foi relatado a diminuição dos danos ao DNA avaliado pelo teste cometa em células do fígado e dos rins dos animais. Além disso, também foi analisado as aberrações cromossômicas em célula da medula óssea, de modo que o grupo tratado com crisina não apresentou aberrações quando comparados ao grupo controle negativo e a combinação de crisina e mitomicina-C foi capaz de diminuir o número de aberrações quando comparado ao uso do quimioterápico isolado. Efeitos similares antígeno-tóxicos ao quimioterápico carboplatina também foram mostrados por Jan e colaboradores (2022), pela análise de células da medula óssea de camundongos Balb/C.

Receptores de estrogênio são expressos em mais de 70% dos cânceres de mama e são essenciais para o início e progressão. O 17- β -estradiol atua como um regulador da expressão de c-Myc e ciclina D1 contribuindo para o início do ciclo celular da G1 para fase S de modo que compostos inibidores de ER são amplamente estudados na literatura como estratégia no combate ao câncer de mama (Acharya et al., 2019; Dashputra et al., 2024; Jeselsohn et al., 2015; Li et al., 2020; Majumder et al., 2024).

A ancoragem da crisina com o alvo ER- α apresentou uma ligação de hidrogênio em GLU353 sendo conservadas as seguintes interações (pi-alkyl) em relação ao ligante de referência 4-Hidroxitamoxifeno: LEU387, LEU346, ALA350, LEU525, MET421. A maioria dessas interações (excluindo apenas (LEU350) foram mantidas no *docking* do fármaco tamoxifeno, incluindo do mesmo tipo para GLU353 (ligação de hidrogênio) sendo uma interação mais forte (HAMZA ABDULLAHI et al., 2023). Esse padrão de interação também foi mantido para o fármaco modulador de ER- α bazedoxifeno (excluindo-se a interação LEU525) (KUMAR et al., 2024).

O envolvimento dos resíduos MET421 e LEU387 nos contatos (especialmente ligações de hidrogênios) desempenham um importante papel na afinidade de ligação com ER- α . Para a crisina, essas interações foram do tipo pi que também contribuem para ligação à medida que o número de interações aumenta. Dessa forma, interações estabelecidas juntamente com as semelhanças apresentadas podem contribuir para um efeito inibitório da crisina frente ao ER- α (Dashputra et al., 2024).

Apesar da similaridade de contatos da crisina em relação aos inibidores citados, a crisina também é relacionada como um fitoestrogênio, ou seja, um composto natural com ação estrogênica sobre o ER- α , podendo contribuir para a proliferação de células tumorais (Van meeuwen et al., 2007; Ye; shaw, 2019). Essa ação é relacionada à similaridade estrutural como o compartilhamento de grupos fenólicos ao grupamento Ar-OH existente no 17- β -estradiol (Manas et al., 2004; Morissette; Litim; Di paolo, 2018).

Lu e colaboradores (2020) avaliaram a atividade estrogênica da crisina sendo identificado um aumento na proliferação celular de MCF-7 em concentrações nanomolares (1-100nM) juntamente com um aumento na expressão de ER- α com o tratamento de 100nM. Dessa forma, o efeito da associação entre crisina e ER- α deve ser analisado com cautela necessitando de mais investigações.

A aromatase é uma enzima pertencente à família do citocromo P450 codificada pelo gene CYP19A1 (Simpson et al., 1994). Ela é responsável por catalisar a desmetilação do carbono 19 de hormônios andrógenos resultando na aromatização e formação de estrogênios de 18 carbonos: androstenediona, testosterona e 16-hidroxitestosterona são substratos fisiológicos da aromatase convertidos em estradiol, estrona e estriol respectivamente (Di nardo; Gilardi, 2013; Eissa; Gohar, 2023). A atividade da aromatase é intensificada em mulheres na pós-menopausa agindo como um sistema compensador da inativação dos ovários através do aumento de produção de hormônios andrógenos regulados a partir de estímulos do hipotálamo, sendo a inativação dessa enzima alvo farmacológico (Chan; Petrossian; Chen, 2016; Rosenfield; Bordini, 2010).

Todas as associações moleculares da crisina foram conservadas na aromatase em relação ao ligante de referência exemestano, com destaque para duas interações mais fortes de hidrogênio (LEU477 e MET374), além de interações do tipo pi: TRP224; ILE133; PHE134; ALA306 e VAL370. Compostos inibidores de aromatase têm potencial para diminuir os níveis de estrogênio com a possibilidade de interromper ou adiar o aparecimento do câncer de mama. O exemestano é um fármaco inibidor irreversível utilizado para tratar câncer de mama dependente de estrogênio (Kalidas; Brown, 2005; Lombardi, 2002; Verhoog; Spies, 2024).

As interações conservadas na crisina indicam a similaridade no posicionamento na aromatase em relação ao ligante de referência, sendo do mesmo tipo para MET374 (ligação de hidrogênio) uma interação mais forte que isoladamente em relação as

outras interações hidrofóbicas possui maior contribuição para a afinidade de ligação (GHOSH et al., 2012).

Além disso, a interação com VAL370 indica seu posicionamento próximo a uma fenda hidrofóbica compacta onde compostos volumosos podem ter dificuldade de acessar o sítio de ligação. De modo contrário, compostos pequenos e rígidos podem ter acesso mais fácil a cavidade interna da aromatase (Ghosh et al., 2012; Suvannang et al., 2011).

A crisina é relatada como um composto promissor na inibição da aromatase. Seo e colaboradores (2024) avaliaram o potencial inibidor de vários flavonoides, com a crisina apresentando um IC₅₀ de 8,65 µM, sendo o melhor resultado no grupo das flavonas avaliada. Certas características estruturais dos flavonoides influenciam no seu poder inibitório como a presença de saturação da ligação C₂-C₃ e a ausência de hidroxilas nos carbonos C₃, C₅ e C₆ (Figura 3) em que estas diminuem a atividade inibitória pela formação de ligações de hidrogênio com o oxigênio da carbonila (Seo et al., 2024).

Em modelo animal, a crisina foi capaz de diminuir a expressão de aromatase em ovários de fêmeas BALB/c com o tratamento de 100mg/Kg, entretanto, um aumento significativo foi observado ao tratar os animais com 50mg/Kg sugerindo que a eficácia inibitória da crisina está relacionada em concentrações específicas devendo ser avaliado o risco/benefício (Alqaisi; Abbas; Alshawawreh, 2024).

Os dados apresentados demonstram o potencial de inibição da crisina para aromatase, podendo ser uma estratégia viável contra o câncer de mama dependente de estrogênio. Entretanto, a concentração ideal deve ser investigada devido a sua possível ação estrogênica. Além disso, sua ação também pode ser aproveitada na quimioprevenção, uma vez que seus efeitos colaterais são inferiores em relação aos fármacos inibidores utilizados na clínica (Bajgai et al., 2011; Balam; Ahmadi; Ghorbani, 2020).

Entre as CDK's selecionadas, a crisina demonstrou uma maior afinidade de ligação pela CDK2 (-10,2 kcal/mol) resultado superior inclusive do que o ligante de referência JWS (-9,0 kcal/mol). Apresentou dois contatos para ligação de hidrogênio (GLU12 e LYS129) e as interações pi que se conservaram foram: ALA31; VAL64; ALA144; LEU134 e VAL18. O ligante JWS648 é um inibidor de CDK que compete pelo sítio ativo do ATP, causando interferência no processo de fosforilação dos alvos das CDK's (Betzi et al., 2011; Kumari; Brahma; Maruthi, 2023). Assim a associação

da crisina com a CDK2 pode contribuir para o interrompimento do ciclo celular na fase G2/M (Zhang; Zhao; Wang, 2008, 2009).

O receptor VEGFR possui um papel crucial no crescimento de tumores e na metástase através da indução da formação de novos vasos levando a um aumento no acesso a nutrientes, sendo um alvo terapêutico importante contra o câncer de mama (Madu et al., 2020). As interações da crisina com VEGFR revelaram duas ligações de hidrogênio (CYS919 e LEU840) sendo a segunda conservada em relação ao inibidor sorafenibe. Além disso, foram mantidas as seguintes interações pi: VAL848; VAL916; ALA866; LEU1035; LYS868 e CYS1045. Essas semelhanças em relação ao inibidor de referência podem indicar a crisina como um composto capaz de inibir VEGFR. Todos esses contados também foram observados na interação de derivados de benzenossulfonamidas (Hassan et al., 2024).

Em uma análise similar com o flavonoide quercetina, foi obtido uma afinidade eletrônica de ligação de -8,4 kcal/mol, próximo ao da crisina aqui apresentado (-9,0 kcal/mol). Entretanto, as interações foram diferentes da crisina, mantendo semelhança apenas com o ligante de referência, revelando que pequenas alterações estruturais podem causar outro perfil de interação mesmo mantendo uma afinidade de ligação favorável (Maran; Gangadharan; Emerson, 2022).

A crisina é relatada contendo ação contra a angiogênese, sendo capaz de inibir a proliferação e migração de células endoteliais da umbilical humana em meio de cultura adicionado de VEGF (8 ng/mL) (TIAN et al., 2014). De modo similar, a crisina preveniu um crescimento de vasos da membrana corioalantóide de galinha induzido por lipopolissacarídeo (Lin et al., 2006).

A ancoragem molecular indica a ação inibitória da crisina diretamente pelo contato VEGFR, entretanto, sua ação também está relacionada na regulação da sinalização PI3K/Akt; regulação negativa da via JAK1/STAT3 e expressão de VEGFR e VEGFR2 (Wei; Zhang, 2024).

Apesar de possuir a menor afinidade de ligação em relação a todos os alvos analisados, a ligação de hidrogênio feita por LYS745 é essencial para favorecer a inibição de EGFR (Engelhardt et al., 2019). Além disso, a interação com LYS745 é relatado como um alvo potencial para superar a resistência ao inibidor de EGFR osimertinibe (Ferlenghi et al., 2021; Zhao et al., 2022).

Derivados de crisina são descritos como uma estratégia inibitória de EGFR contra células de câncer de mama. (Debnath et al., (2019) realizaram substituições no

mesmo grupamento hidroxila que interage com LYS745 sendo obtido um aumento na citotoxicidade de 3,2 vezes em relação a crisina não modificada em células MDA-MB-231. Além disso, em uma análise de ancoragem os autores também identificaram a conservação a interação com LYS745 no alvo EGFR. Em uma outra síntese com substituições no mesmo grupamento do estudo anterior, (LIU et al., (2021) identificaram que o derivado foi capaz de inibir significativamente a fosforilação de EGFR.

A avaliação preliminar toxicológica da crisina indica um potencial tóxico que pode ser direcionado para a atividade antiproliferativa de células cancerígenas indicando uma melhor ação contra células mcf-7 com potencial para o uso combinado dos quimioterápicos cisplatina e doxorrubicina. Os estudos *in silico* indicam ainda seu potencial na ação contra alvos hormonais no câncer de mama, entretanto cabe-se destacar a necessidade de investigações *in vivo* para avaliar sua ação de forma mais ampla, ou seja, a investigação de doses ideais que possam favorecer a atividade antitumoral.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente demonstram os efeitos tóxicos da crisina avaliado no ensaio de *A. salina* acompanhado de citotoxicidade em células meristemáticas vegetais na avaliação do teste de *A. cepa*, entretanto não foi observado efeitos genotóxicos. A atividade antiproliferativa da crisina demonstrou uma maior seletividade para linhagem MCF-7 indicando também um aumento na potência de quimioterápicos quando realizado a associação. A análise ADMET demonstrou que a crisina possui propriedades farmacocinéticas favoráveis para ser um candidato à fármaco com toxicidade prevista baixa. Os resultados de ancoragem molecular mostram que a crisina possui interações importantes relacionado as terapias hormonais no câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ABSHIRE, D.; LANG, M. K. The Evolution of Radiation Therapy in Treating Cancer. **Seminars in oncology nursing**, v. 34, n. 2, p. 151–157, 1 maio 2018.
- ACHARYA, R. et al. Structure Based Multitargeted Molecular Docking Analysis of Selected Furanocoumarins against Breast Cancer. **Scientific Reports** **2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 31 out. 2019.
- ADANGALE, S. C.; WAIRKAR, S. Potential therapeutic activities and novel delivery systems of chrysin-a nature's boon. **Food Bioscience**, v. 45, p. 101316, 2022.
- AGUAYO-ORTIZ, R.; FERNÁNDEZ-DE GORTARI, E. Overview of Computer-Aided Drug Design for Epigenetic Targets. **Epi-Informatics: Discovery and Development of Small Molecule Epigenetic Drugs and Probes**, p. 21–52, 1 jan. 2016.
- AJEET et al. Antitarget Interaction, Acute Toxicity and Protein Binding Studies of Quinazolinone Sulphonamides as GABA1 Antagonists. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 1, p. 48, 1 jan. 2016.
- AKARAS, N. et al. The protective effects of chrysin on cadmium-induced pulmonary toxicity; a multi-biomarker approach. **Environmental science and pollution research international**, v. 30, n. 38, p. 89479–89494, 1 ago. 2023.
- ALBARANO, L. et al. Genotoxicity in *Artemia* spp.: An old model with new sensitive endpoints. **Aquatic Toxicology**, v. 252, p. 106320, 1 nov. 2022.
- ALQAISSI, K. M.; ABBAS, M. A.; ALSHAWAWREH, R. Chrysin's dose-dependent effects on steroidogenesis in female BALB/c mice: In vivo study of adrenal, ovarian, and uterine hormone regulation. **PHARMACIA**, v. 71, p. 1–9, 1 jan. 2024.
- ALSHETAILI, A. S. et al. Preparation, optimization, and characterization of chrysin-loaded TPGS-b-PCL micelles and assessment of their cytotoxic potential in human liver cancer (Hep G2) cell lines. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 246, p. 125679, 15 ago. 2023.
- AMANCHI, N. R. et al. Determination of Mitotic Index and Evaluation of Cytogenotoxicity of Oxyfluorfen Using *Allium Cepa* Root Tip Meristematic Cells. **Journal of Advanced Zoology**, v. 44, n. 2, p. 207–212, 7 out. 2023.
- ANAND, U. et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes & Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1367, 1 jul. 2022.
- ARAYA, X. et al. Assessment of the *Artemia salina* toxicity assay as a substitute of the mouse lethality assay in the determination of venom-induced toxicity and preclinical efficacy of antivenom. **Toxicon: X**, v. 22, p. 100195, 1 jun. 2024.

BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. Online: Apr 8-2017, 8 abr. 2017.

BAI, H. et al. Genetic mutation profiling reveals biomarkers for targeted therapy efficacy and prognosis in non-small cell lung cancer. **Heliyon**, v. 10, n. 6, p. e27633, 30 mar. 2024.

BAIDOUN, F. et al. Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. **Current drug targets**, v. 22, n. 9, p. 998–1009, 19 nov. 2021.

BAIG, M. H. et al. Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 6, p. 740, 19 out. 2018.

BAJGAI, S. P. et al. Hybrid flavan-chalcones, aromatase and lipoxygenase inhibitors, from *Desmos cochinchinensis*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 16, p. 2062–2067, 1 nov. 2011.

BALAM, F. H.; AHMADI, Z. S.; GHORBANI, A. Inhibitory effect of chrysin on estrogen biosynthesis by suppression of enzyme aromatase (CYP19): A systematic review. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03557, 1 mar. 2020.

BALTA, C. et al. Chrysin attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF- β /Smad signaling pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 94–101, 5 out. 2015.

BANERJEE, P. et al. SuperCYPsPred—a web server for the prediction of cytochrome activity. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W580, 2020.

BANERJEE, P. 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.

BARCO, F. et al. Biodosimetry of UV radiation through the detection of cytogenetic endpoints in *Allium cepa* meristems. **Radiation Measurements**, v. 176, p. 107213, 1 ago. 2024.

BAROROH, S.SI., M.BIOTEK., U. et al. Molecular interaction analysis and visualization of protein-ligand docking using Biovia Discovery Studio Visualizer. **Indonesian Journal of Computational Biology (IJCB)**, v. 2, n. 1, p. 22–30, 21 jul. 2023.

BASKAR, R. et al. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International journal of medical sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 27 fev. 2012.

BETZI, S. et al. Discovery of a potential allosteric ligand binding site in CDK2. **ACS chemical biology**, v. 6, n. 5, p. 492, 20 maio 2011.

BIERUT, L. J. Genetic Vulnerability and Susceptibility to Substance Dependence. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 618–627, 24 fev. 2011.

BOJIĆ, M. et al. The Effect of Flavonoid Aglycones on the CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8 and CYP2D6 Enzymes Activity. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3174, 1 set. 2019.

BOUYAHYA, A. et al. Clinical applications and mechanism insights of natural flavonoids against type 2 diabetes mellitus. **Heliyon**, v. 10, n. 9, 15 maio 2024.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 1 maio 2024.

BRECHBUHL, H. M. et al. Chrysin enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in human lung epithelial cancer cell lines: The role of glutathione. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2012.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, p. 335–373, 2003.

BROWN, J. S. et al. Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 1142, 2023.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211–214, 19 maio 1999.

CANEDO, A.; ROCHA, T. L. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. **Science of The Total Environment**, v. 762, p. 144084, 25 mar. 2021.

CAO, F. et al. Berberine: An inspiring resource for the treatment of colorectal diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115571, 1 nov. 2023.

CAON, I. et al. Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan. **Seminars in Cancer Biology**, v. 62, p. 9–19, 1 maio 2020.

CARDOSO, F. L. A. et al. Cytotoxicity and genotoxic impacts of LAPONITE® on murine adipose stem cells. **Applied Clay Science**, v. 261, p. 107572, 1 dez. 2024.

CHAN, H. J.; PETROSSIAN, K.; CHEN, S. Structural and functional characterization of aromatase, estrogen receptor, and their genes in endocrine-responsive and – resistant breast cancer cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, p. 73–83, 1 jul. 2016.

CHEN, J.; LI, Q.; JIANG, Y. Chrysin promotes Cisplatin-induced apoptosis via oxidative DNA damage in oral squamous cell carcinoma. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 108, p. 104623, 1 jun. 2023.

CHEN, S. et al. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. **Molecules**, v. 28, n. 13, 1 jul. 2023.

CHINEMBIRI, T. N. et al. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 8, p. 11679–11721, 2014.

CHOUDHURI, S. et al. A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 345, p. 109531, 25 ago. 2021.

CHOWDHURY, J.; MANDAL, T. K.; MONDAL, S. Genotoxic impact of emerging contaminant amoxicillin residue on zebra fish (*Danio rerio*) embryos. **Heliyon**, v. 6, n. 11, p. e05379, 1 nov. 2020.

COREY, B. et al. Young Women With Breast Cancer: Treatment, Care, and Nursing Implications. **Clinical journal of oncology nursing**, v. 24, n. 2, p. 139–147, 1 abr. 2020.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COSTA, P. M. Current aspects of DNA damage and repair in ecotoxicology: a mini-review. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 31, n. 1, 1 jan. 2022.

CRONIN-FENTON, D. P.; DAMKIER, P. Tamoxifen and CYP2D6: A Controversy in Pharmacogenetics. **Advances in Pharmacology**, v. 83, p. 65–91, 1 jan. 2018.

DAS, R. et al. Cytotoxic and Cytostatic Effects of Leaf Aqueous Extract of *Crinum asiaticum* in *Allium cepa* Root Apical Meristem Cells. **CYTOLOGIA**, v. 87, n. 2, p. 107–112, 25 jun. 2022.

DASHPUTRA, A. et al. Evaluation of tamoxifen analogues as potential estrogen receptor alpha inhibitors for breast cancer treatment: A computational approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 414, p. 126209, 15 nov. 2024.

DE LIMA, R. M. T. et al. Toxic, cytogenetic and antitumor evaluations of [6]-gingerol in non-clinical in vitro studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 115, p. 108873, 1 jul. 2019.

DEBNATH, S. et al. In silico design, synthesis and activity of potential drug-like chrysin scaffold-derived selective EGFR inhibitors as anticancer agents. **Computational Biology and Chemistry**, v. 83, p. 107156, 1 dez. 2019.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 1 nov. 2008.

DI NARDO, G.; GILARDI, G. Human aromatase: perspectives in biochemistry and biotechnology. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 92–101, fev. 2013.

DORATO, M. A.; BUCKLEY, L. A. Toxicology in the drug discovery and development process. **Current protocols in pharmacology**, v. Chapter 10, 2006.

EATEMADI, A. et al. Synthesis and Characterization of Chrysin-loaded PCL-PEG-PCL nanoparticle and its effect on breast cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1915–1922, 1 dez. 2016.

EATON, D. L.; GALLAGHER, E. P. General Overview of Toxicology. **Comprehensive Toxicology: Second Edition**, v. 1–14, p. 1–46, 1 jan. 2010.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2–3, p. 193–236, 1 fev. 2002.

EISSA, M. A.; GOHAR, E. Y. Aromatase enzyme: Paving the way for exploring aromatization for cardio-renal protection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 168, p. 115832, 1 dez. 2023.

ENGELHARDT, H. et al. Start Selective and Rigidify: The Discovery Path toward a Next Generation of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 10272–10293, 27 nov. 2019.

FALEYE, O. S.; LEE, J. H.; LEE, J. Selected flavonoids exhibit antibiofilm and antibacterial effects against *Vibrio* by disrupting membrane integrity, virulence and metabolic activities. **Biofilm**, v. 6, p. 100165, 15 dez. 2023.

FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, p. 421926, 13 nov. 2018.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols** 2007 **2:5**, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, 3 maio 2007.

FENYVESI, F. et al. Cyclodextrin Complexation Improves the Solubility and Caco-2 Permeability of Chrysin. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 16, 1 ago. 2020.

FERLENGHI, F. et al. A sulfonyl fluoride derivative inhibits EGFR L858R/T790M/C797S by covalent modification of the catalytic lysine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 225, p. 113786, 5 dez. 2021.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 1 jul. 2007.

FILHO, C. B. et al. Neurochemical factors associated with the antidepressant-like effect of flavonoid chrysin in chronically stressed mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 791, p. 284–296, 15 nov. 2016.

FISCHER, M. et al. Incorporation of protein flexibility and conformational energy penalties in docking screens to improve ligand discovery. **Nature Chemistry** 2014 **6:7**, v. 6, n. 7, p. 575–583, 25 maio 2014.

FISUSI, F. A.; AKALA, E. O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 3, 22 jan. 2019.

GAJARDO, G. M.; BEARDMORE, J. A. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. **Frontiers in physiology**, p. 185, 2012.

GAO, A. M. et al. Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 1, p. 100–108, 25 out. 2013.

GAO, S. et al. Developing nutritional component chrysin as a therapeutic agent: Bioavailability and pharmacokinetics consideration, and ADME mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112080, 1 out. 2021.

GAO, Z. et al. Improving the efficacy of combined radiotherapy and immunotherapy: focusing on the effects of radiosensitivity. **Radiation Oncology**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2023.

GASQUE, K. C. D. S. et al. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 381–385, 2014.

GENG, Q. et al. Improved antifungal activity and reduced aquatic toxicity of fludioxonil by complexation with β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1246, p. 131167, 15 dez. 2021.

GERSTBERGER, S.; JIANG, Q.; GANESH, K. Metastasis. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1564, 13 abr. 2023.

GHASEMI, M. et al. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 1 dez. 2021.

GHOSH, D. et al. Novel aromatase inhibitors by structure-guided design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 8464–8476, 11 out. 2012.

GHOSH, N. et al. pH-responsive and targeted delivery of chrysin via folic acid-functionalized mesoporous silica nanocarrier for breast cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 631, p. 122555, 25 jan. 2023.

GIOLITO, M. V. et al. Antitumor activity of new chemical compounds in triple negative mammary adenocarcinoma models. **Future Science OA**, v. 6, n. 3, p. FSOA442, 1 mar. 2020.

GOLONKO, A. et al. Another look at phenolic compounds in cancer therapy the effect of polyphenols on ubiquitin-proteasome system. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 291–311, 1 abr. 2019.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; HERNÁNDEZ, P.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F. Effect of caffeine and adenosine on G2 repair: mitotic delay and chromosome damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 149, n. 2, p. 275–281, 1 abr. 1985.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 107–112, 19 maio 1999.

HAIT, W. N. Anticancer drug development: the grand challenges. **Nature Reviews Drug Discovery** **2010** **9**:4, v. 9, n. 4, p. 253–254, abr. 2010.

HAMZA ABDULLAHI, S. et al. In-silico design of some pyrazolopyridine analogs as breast cancer inhibitors: QSAR modeling, molecular docking, MD simulation, and pharmacological features profiling. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 100, n. 8, p. 101053, 1 ago. 2023.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HASSAN, R. M. et al. Novel benzenesulfonamides as dual VEGFR2/FGFR1 inhibitors targeting breast cancer: Design, synthesis, anticancer activity and in silico studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 152, p. 107728, 1 nov. 2024.

HAZAZI, A. et al. Signaling pathways in HPV-induced cervical cancer: Exploring the therapeutic promise of RNA modulation. **Pathology - Research and Practice**, v. 263, p. 155612, 1 nov. 2024.

HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, n. 1–2, p. 20–24, 18 mar. 2012.

HUANG, X. L. et al. Role of receptor tyrosine kinases mediated signal transduction pathways in tumor growth and angiogenesis—New insight and futuristic vision. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 180, p. 739–752, 1 jun. 2021.

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239, mar. 2011.

IACOPETTA, D. et al. Impact of Cytochrome P450 Enzymes on the Phase I Metabolism of Drugs. **Applied Sciences** **2023**, Vol. **13**, Page **6045**, v. 13, n. 10, p. 6045, 15 maio 2023.

ISLAM, M. M. et al. Polyphenol chrysin for management of skin disorders: Current status and future opportunities. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 5, p. 102026, 1 jul. 2022.

ISTIFLI, E. S. et al. Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity. **Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds**, 2 ago. 2019.

IVANOVIĆ, V. et al. Lipinski's rule of five, famous extensions and famous exceptions. **Chemia Naissensis**, v. 3, n. 1, p. 171–181, 2020.

JAN, B. L. et al. Protective effect of chrysin, a flavonoid, on the genotoxic activity of carboplatin in mice. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 2146–2152, 2022.

JESELSON, R. et al. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology** 2015 **12:10**, v. 12, n. 10, p. 573–583, 30 jun. 2015.

JUNG, J. Emerging Utilization of Chrysin Using Nanoscale Modification. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, n. 1, p. 2894089, 1 jan. 2016.

KALIDAS, M.; BROWN, P. Aromatase Inhibitors for the Treatment and Prevention of Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 6, n. 1, p. 27–37, 1 abr. 2005.

KALOGEROPOULOS, N. et al. Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 378–385, 1 maio 2013.

KAMILOGLU, S. et al. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 332–349, 1 set. 2020.

KANKILIÇ, N. A. et al. The ameliorative effects of chrysin on bortezomib-induced nephrotoxicity in rats: Reduces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation damage, apoptotic and autophagic death. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 190, 1 ago. 2024.

KENAKIN, T. P. Safety Pharmacology. **Pharmacology in Drug Discovery**, p. 211–227, 1 jan. 2012.

KHAN, J. et al. Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effects and Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic Concerns. **Molecules** 2021, Vol. 26, Page 4021, v. 26, n. 13, p. 4021, 30 jun. 2021.

KHAN, S. U. et al. Unveiling the mechanisms and challenges of cancer drug resistance. **Cell Communication and Signaling** 2024 **22:1**, v. 22, n. 1, p. 1–26, 12 fev. 2024.

KHARSANY, K. et al. The new buzz: Investigating the antimicrobial interactions between bioactive compounds found in South African propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 238, p. 111867, 28 jun. 2019.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery** 2004 3:11, v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004.

KUMAR, A. et al. Estrogen receptor alpha (ER- α) antagonistic activity of phytoconstituents from *Potentilla atrosanguinea* and *Potentilla fulgens* in breast cancer. **Fitoterapia**, v. 177, p. 106123, 1 set. 2024.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2018, n. 6, p. 469–471, 1 jun. 2018.

KUMAR, S. et al. Binding investigation of chrysin and flavone with promoter DNA sequence d(CACGTG)₂: Multi spectroscopic studies and cytotoxic evaluation. **Journal of Molecular Structure**, p. 140765, 16 nov. 2024.

KUMAR, S.; MISHRA, A.; PANDEY, A. K. Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using in vitro models. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, 30 maio 2013.

KUMARI, N.; BRAHMA, M.; MARUTHI, M. Targeting immune checkpoints for cancer therapy. **Treatment Landscape of Targeted Therapies in Oncology: Challenges and Opportunities**, p. 95–134, 1 jan. 2023.

LAN, H. N. et al. Biological valorization of lignin to flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 64, p. 108107, 1 maio 2023.

LEE, D. H. et al. Comparative analysis of benign and malignant parotid gland tumors: A retrospective study of 992 patients. **American Journal of Otolaryngology**, v. 44, n. 2, p. 103690, 1 mar. 2023.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. a003236, 2010.

LEE, H. et al. Structure-Related Inhibition of Human Hepatic Caffeine N³-Demethylation by Naturally Occurring Flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 9, p. 1369–1375, 1 maio 1998.

LEE, S.; LEE, S. K.; JUNG, J. Potentiating activities of chrysin in the therapeutic efficacy of 5-fluorouracil in gastric cancer cells. **Oncology Letters**, v. 21, n. 1, p. 24, 1 jan. 2020.

LEE, S.; LEE, S. K.; JUNG, J. Potentiating activities of chrysin in the therapeutic efficacy of 5-fluorouracil in gastric cancer cells. **Oncology letters**, v. 21, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2021.

LEE, W. L. et al. The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifene. **Taiwanese journal of obstetrics & gynecology**, v. 47, n. 1, p. 24–31, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 1 jul. 2009.

LEÓN-MEJÍA, G. et al. Cytotoxicity as a Fundamental Response to Xenobiotics. **Cytotoxicity - New Insights into Toxic Assessment**, 15 set. 2021.

LEUNG, E. L. et al. Cisplatin alters nitric oxide synthase levels in human ovarian cancer cells: involvement in p53 regulation and cisplatin resistance. **British Journal of Cancer** **2008 98:11**, v. 98, n. 11, p. 1803–1809, 27 maio 2008.

LI, J. et al. Research progress on the effect of autophagy-lysosomal pathway on tumor drug resistance. **Experimental Cell Research**, v. 389, n. 2, p. 111925, 15 abr. 2020a.

LI, X. et al. Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of Hep G2 cells by up-regulating p53. **Chemico-Biological Interactions**, v. 232, p. 12–20, 5 maio 2015.

LI, Y. et al. The Relationship between Pharmacological Properties and Structure-Activity of Chrysin Derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 19, n. 7, p. 555–568, 25 abr. 2019.

LI, Y. et al. Novel Pyrrolopyridone Bromodomain and Extra-Terminal Motif (BET) Inhibitors Effective in Endocrine-Resistant ER+ Breast Cancer with Acquired Resistance to Fulvestrant and Palbociclib. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 13, p. 7186–7210, 9 jul. 2020.

LI, Y. et al. High-throughput screening of ancient forest plant extracts shows cytotoxicity towards triple-negative breast cancer. **Environment International**, v. 181, p. 108279, 1 nov. 2023.

LIM, H. K. et al. Chrysin Increases the Therapeutic Efficacy of Docetaxel and Mitigates Docetaxel-Induced Edema. **Integrative cancer therapies**, v. 16, n. 4, p. 496–504, 1 dez. 2017.

LIN, C. M. et al. Chrysin inhibits lipopolysaccharide-induced angiogenesis via down-regulation of VEGF/VEGFR-2(KDR) and IL-6/IL-6R pathways. **Planta medica**, v. 72, n. 8, p. 708–714, jun. 2006.

LIN, X.; LI, X.; LIN, X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. **Molecules** **2020, Vol. 25, Page 1375**, v. 25, n. 6, p. 1375, 18 mar. 2020.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, 15 jan. 1997.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 1 mar. 2001.

LISBOA, T. et al. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 64, 2019.

LIU, S. et al. Rapid testing of candidate oncogenes and tumour suppressor genes in signal transduction and neoplastic transformation. **Advances in Biological Regulation**, v. 83, p. 100841, 1 jan. 2022.

LIU, Y. et al. Targeting Tumor Suppressor genes for Cancer Therapy. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 37, n. 12, p. 1277, 1 dez. 2015.

LIU, Y. M. et al. Synthesis, characterization and preliminary biological evaluation of chrysin amino acid derivatives that induce apoptosis and EGFR downregulation. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 23, n. 1, p. 39–54, 2021.

LIU, Z. et al. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, v. 203, p. 139–150, 1 jul. 2018.

LOMBARDI, P. Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 2–3, p. 326–337, 18 jul. 2002.

LU, J. J. et al. Molecular docking simulation and in vitro studies on estrogenic activities of flavonoids from leaves of *Carya cathayensis* Sarg. **Steroids**, v. 163, p. 108726, 1 nov. 2020.

MA, J. et al. Extraction of flavonoids from black mulberry wine residues and their antioxidant and anticancer activity in vitro. **Heliyon**, v. 10, n. 10, 30 maio 2024.

MADU, C. O. et al. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 15, p. 4474, 2020.

MAHDI, W. A. et al. Formulation of multicomponent inclusion complex of cyclodextrin-amino acid with Chrysin: Physicochemical characterization, cell viability and apoptosis assessment in human primary glioblastoma cell line. **International Journal of Pharmaceutics: X**, v. 6, p. 100211, 15 dez. 2023.

MAJUMDER, R. et al. A Virtual Drug Discovery Screening Illuminates Campesterol as a Potent Estrogen Receptor Alpha Inhibitor in Breast Cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, n. 12, p. 10321–10335, 27 jun. 2024.

MALEY, C. C.; REID, B. J. Natural selection in neoplastic progression of Barrett's esophagus. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 6, p. 474–483, 1 dez. 2005.

MANAS, E. S. et al. Understanding the Selectivity of Genistein for Human Estrogen Receptor- β Using X-Ray Crystallography and Computational Methods. **Structure**, v. 12, n. 12, p. 2197–2207, 1 dez. 2004.

MANI, R.; NATESAN, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 145, p. 187–196, 1 jan. 2018.

MANIVANNAN, C. et al. Investigation on the inclusion and toxicity of acriflavine with cyclodextrins: A spectroscopic approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 164–170, 25 mar. 2014.

MARAN, M.; GANGADHARAN, S.; EMERSON, I. A. Molecular dynamics study of quercetin families and its derivative compounds from *Carica papaya* leaf as breast cancer inhibitors. **Chemical Physics Letters**, v. 793, p. 139470, 16 abr. 2022.

MARCUCCI, M. C. et al. Molecular Dereplication and In Vitro and In Silico Pharmacological Evaluation of *Coriandrum sativum* against Neuroblastoma Cells. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5389, 1 set. 2022.

MAROUANE, C. H. O. T. T. Aspects of life history of *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda) from Algeria reared in different conditions of salinity. **Vie et Milieu-life and Environment**, v.67, n.1, p.15-20, 2017

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148–158, 2006.

MAURICI, D. et al. Genotoxicity and mutagenicity. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. SUPPL. 1, p. 117–130, 1 jul. 2005a.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C.; SMITH, D. L. Simple Bench-Top Bioassays (Brine Shrimp and Potato Discs) for the Discovery of Plant Antitumor Compounds. **ACS symposium series**, p. 112–137, 5 maio 1993.

MEE, T. et al. The use of radiotherapy, surgery and chemotherapy in the curative treatment of cancer: results from the FORTY (Favourable Outcomes from RadioTherapY) project. **The British journal of radiology**, v. 96, n. 1152, 1 nov. 2023.

MEHRI, S. et al. Chrysin Reduced Acrylamide-Induced Neurotoxicity in Both in vitro and in vivo Assessments. **Iranian Biomedical Journal**, v. 18, n. 2, p. 101, 2014.

MENCHACA, T. M. et al. Past, Present, and Future of Molecular Docking. **Drug Discovery and Development - New Advances**, 6 fev. 2020.

MENG, E. C. et al. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. **Protein Science**, v. 32, n. 11, p. e4792, 1 nov. 2023.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146, 11 nov. 2011.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 5, p. 31–34, 1982.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. **Science**, v. 123, n. 3194, p. 464–464, 16 mar. 1956.

MIŠÍK, M. et al. Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: Possible impact on the environment. **Environmental Research**, v. 135, p. 196–203, 1 nov. 2014.

MITTAL, B. et al. Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 71, p. 77–139, 1 jan. 2015.

MOHAMMED, H. A. et al. Chrysin, The Flavonoid Molecule of Antioxidant Interest. **ChemistrySelect**, v. 8, n. 48, p. e202303306, 22 dez. 2023.

MÖHRLE, J. J. How long does it take to develop a new drug? **The Lancet Regional Health - Europe**, v. 43, p. 100998, 1 ago. 2024.

MOITESSIER, N. et al. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. Suppl 1, p. S7, mar. 2008.

MORISSETTE, M.; LITIM, N.; DI PAOLO, T. Natural Phytoestrogens: A Class of Promising Neuroprotective Agents for Parkinson Disease. **Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products: Natural Product Drug Discovery**, p. 9–61, 1 jan. 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MUTHUKRISHNAN, S.; SENTHIL KUMAR, T.; RAO, M. V. Anticancer activity of biogenic nanosilver and its toxicity assessment on *Artemia salina*- evaluation of mortality, accumulation and elimination: An experimental report. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1685–1695, 1 abr. 2017.

N, E. N. et al. *Artemia* species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 6 abr. 2020.

NARAYAN, H. et al. Effect of amorphous chrysin loading in hydrophobically modified Pluronic F68 nanomicelles on its anticancer activity, stability and oral bioavailability. **RSC Pharmaceuticals**, v. 1, n. 4, p. 716–726, 13 ago. 2024.

NAZ, S. et al. Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. **Life sciences**, v. 235, 15 out. 2019.

NIAZI, S. K.; MARIAM, Z. Computer-Aided Drug Design and Drug Discovery: A Prospective Analysis. **Pharmaceuticals 2024, Vol. 17, Page 22**, v. 17, n. 1, p. 22, 22 dez. 2023.

NOH, K. et al. Pharmacokinetic Interaction of Chrysin with Caffeine in Rats. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 446, 1 jul. 2016.

OGGERO, J. et al. PEGylation of Chrysin Improves Its Water Solubility while Preserving the In Vitro Biological Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 49, p. 19817–19831, 13 dez. 2023.

OKUMU, M. O. et al. Artemia salina as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. **Toxicon: X**, v. 12, p. 100082, 1 nov. 2021.

OLADIPO, M. O. et al. PROTECTIVE EFFECT OF CHRYSIN AGAINST CISPLATIN INDUCED PULMONARY TOXICITY IN WISTER RATS. **World Cancer Research Journal**, v. 10, 2023.

ONER, E. et al. Investigation of antiviral substances in Covid 19 by Molecular Docking: In Silico Study. **African health sciences**, v. 23, n. 1, p. 23–36, 2023.

OŻAROWSKI, M.; KARPIŃSKI, T. M. Extracts and Flavonoids of Passiflora Species as Promising Anti-inflammatory and Antioxidant Substances. **Current pharmaceutical design**, v. 27, n. 22, p. 2582–2604, 26 maio 2021.

PANDEY, H.; KUMAR, V.; ROY, B. K. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using Allium cepa L. as a test plant. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 300–308, 1 jan. 2014.

PAQUET, E.; VIKTOR, H. L. Molecular Dynamics, Monte Carlo Simulations, and Langevin Dynamics: A Computational Review. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 183918, 2015.

PATEL, A. Benign vs Malignant Tumors. **JAMA Oncology**, v. 6, n. 9, p. 1488–1488, 1 set. 2020.

PATEL, S. A. et al. Molecular Mechanisms and Future Implications of VEGF/VEGFR in Cancer Therapy. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 30, 1 jan. 2023.

PINGILI, R. B. et al. A comprehensive review on hepatoprotective and nephroprotective activities of chrysin against various drugs and toxic agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 308, p. 51–60, 1 ago. 2019.

PINGILI, R. B.; PAWAR, A. K.; CHALLA, S. R. Effect of chrysin on the formation of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, a toxic metabolite of paracetamol in rats and isolated rat hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 302, p. 123–134, 1 abr. 2019.

PRADHAN, S. et al. A report on green extraction procedures for separation of flavonoids and its bio activities. **Journal of Herbal Medicine**, v. 41, p. 100716, 1 set. 2023.

RAGHUNATH AKASH, M. et al. Genotoxic chemotherapy. **International Journal of Pharmacognosy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 65–73, 1 jan. 2022.

RAHAMOUZ-HAGHIGHI, S. et al. Phytochemical screening and Cytotoxicity assessment of Plantago lanceolata L. root extracts on Colorectal cancer cell lines

and Brine shrimp larvae and determination of the median lethal dose in mice. **South African Journal of Botany**, v. 149, p. 740–747, 1 set. 2022.

RAKHA, A. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic potential of dietary flavonoids: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 156, p. 113945, 1 dez. 2022.

RAMOS, P. S. et al. Effect of quercetin and chrysin and its association on viability and cell cycle progression in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 179, p. 117276, 1 out. 2024.

REHMAN, M. U. et al. Alleviation of hepatic injury by chrysin in cisplatin administered rats: probable role of oxidative and inflammatory markers. **Pharmacological reports : PR**, v. 66, n. 6, p. 1050–1059, 2014.

ROSENFELD, R. L.; BORDINI, B. Evidence that obesity and androgens have independent and opposing effects on gonadotropin production from puberty to maturity. **Brain Research**, v. 1364, p. 186–197, 10 dez. 2010.

RUIZ-TAGLE, B. et al. Evaluating the use of local search strategies for a memetic algorithm for the protein-ligand docking problem. **Proceedings - International Conference of the Chilean Computer Science Society, SCCC**, v. 2017- October, p. 1–12, 2 jul. 2017.

SABZICHI, M. et al. Chrysin loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) triggers apoptosis in MCF-7 cancer cells by inhibiting the Nrf2 pathway. **Process Biochemistry**, v. 60, p. 84–91, 1 set. 2017.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Inhibitory and Cytotoxic Activities of Chrysin on Human Breast Adenocarcinoma Cells by Induction of Apoptosis. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. Suppl 4, p. S436, 2016.

SAMARGHANDIAN, S.; AFSHARI, J. T.; DAVOODI, S. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. **Clinics**, v. 66, n. 6, p. 1073–1079, 1 jun. 2011.

SAMARGHANDIAN, S.; FARKHONDEH, T.; AZIMI-NEZHAD, M. Protective effects of chrysin against drugs and toxic agents. **Dose-Response**, v. 15, n. 2, p. 1–10, 1 abr. 2017.

SANTOS PIMENTA, L. P. et al. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, n. 2–3, p. 209–212, 1 jan. 2003.

SARAON, P. et al. Receptor tyrosine kinases and cancer: oncogenic mechanisms and therapeutic approaches. **Oncogene 2021 40:24**, v. 40, n. 24, p. 4079–4093, 2 jun. 2021.

SASSI, A. et al. Chrysin, a natural and biologically active flavonoid suppresses tumor growth of mouse B16F10 melanoma cells: In vitro and In vivo study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 10–19, 1 mar. 2018.

SASSI, A. et al. Protective Effect of Chrysin, a Dietary Flavone against Genotoxic and Oxidative Damage Induced by Mitomycin C in Balb/C Mice. **Nutrition and Cancer**, v. 73, n. 2, p. 329–338, 2021.

SCHNEIDERMAN, M. H.; DEWEY, W. C.; HIGHFIELD, D. P. Inhibition of DNA synthesis in synchronized Chinese hamster cells treated in G1 with cycloheximide. **Experimental Cell Research**, v. 67, n. 1, p. 147–155, 1 jul. 1971.

SCHREINER, G. E. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. using *Allium cepa* L. assay. **Pharmacological Research - Natural Products**, v. 2, p. 100011, 1 mar. 2024.

SEO, J. I. et al. Evaluating flavonoids as potential aromatase inhibitors for breast cancer treatment: In vitro studies and in silico predictions. **Chemico-Biological Interactions**, v. 392, p. 110927, 1 abr. 2024.

SHAHBAZ, M. et al. Chrysin a promising anticancer agent: recent perspectives. **International Journal of Food Properties**, v. 26, n. 1, p. 2294–2337, 22 set. 2023.

SHEN, N. et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 383, p. 132531, 30 jul. 2022.

SIDDIQUI, A. H.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 179, n. 1–4, p. 241–253, 3 ago. 2011.

SIKIC, K.; TOMIC, S.; CARUGO, O. Systematic Comparison of Crystal and NMR Protein Structures Deposited in the Protein Data Bank. **The Open Biochemistry Journal**, v. 4, p. 83, 22 set. 2010.

SIMPSON, E. R. et al. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342–355, 1 jun. 1994.

ŞİMŞEK, H. et al. Beneficial effects of Chrysin on Cadmium-induced nephrotoxicity in rats: Modulating the levels of Nrf2/HO-1, RAGE/NLRP3, and Caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. **Gene**, v. 875, p. 147502, 30 jul. 2023.

SINGH, M. B. et al. A comparative study of 5- fluorouracil, doxorubicin, methotrexate, paclitaxel for their inhibition ability for Mpro of nCoV: Molecular docking and molecular dynamics simulations. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 99, n. 12, p. 100790, 1 dez. 2022.

SINGH, N. et al. Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups. **Frontiers in Drug Discovery**, v. 3, p. 1201419, 24 maio 2023.

SINGH, S.; KHANNA, V. K.; PANT, A. B. Development of In Vitro Toxicology: A Historic Story. **In Vitro Toxicology**, p. 1–19, 1 jan. 2018.

SINGH, S. S. Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 2, p. 165–182, 2 fev. 2006.

ŚLEDŹ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 48, p. 93–102, 1 fev. 2018.

SONKIN, D.; THOMAS, A.; TEICHER, B. A. Cancer treatments: Past, present, and future. **Cancer genetics**, v. 286–287, p. 18–24, 1 ago. 2024.

SRIVASTAVA, S. et al. Principles for In Vitro Toxicology. **In Vitro Toxicology**, p. 21–43, 1 jan. 2018.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193–203, 15 dez. 2015.

SUDHAKAR, R.; NINGE GOWDA, K. N.; VENU, G. Mitotic Abnormalities Induced by Silk Dyeing Industry Effluents in the Cells of *Allium cepa*. **CYTOLOGIA**, v. 66, n. 3, p. 235–239, 25 set. 2001.

SUVANNANG, N. et al. Molecular Docking of Aromatase Inhibitors. **Molecules** **2011**, Vol. 16, Pages 3597–3617, v. 16, n. 5, p. 3597–3617, 28 abr. 2011.

TEDESCO, S. B. et al. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. **Environmental Contamination**, 29 fev. 2012.

TEMEL, Y. et al. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 3, p. 325–337, 1 mar. 2020.

THIRUMAL KUMAR, D. et al. Understanding the activating mechanism of the immune system against COVID-19 by Traditional Indian Medicine: Network pharmacology approach. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 129, p. 275–379, 1 jan. 2022.

THOMFORD, N. E. et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences** **2018**, Vol. 19, Page 1578, v. 19, n. 6, p. 1578, 25 maio 2018.

TIAN, R. et al. Benign and malignant classification of breast tumor ultrasound images using conventional radiomics and transfer learning features: A multicenter retrospective study. **Medical Engineering & Physics**, v. 125, p. 104117, 1 mar. 2024.

TIAN, S. S. et al. Flavonoids from the leaves of *Carya cathayensis* Sarg. inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. **Fitoterapia**, v. 92, n. 1, p. 34–40, 1 jan. 2014.

TIZAZU, A.; BEKELE, T. A review on the medicinal applications of flavonoids from aloe species. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 10, p. 100135, 1 abr. 2024.

TOHGE, T.; DE SOUZA, L. P.; FERNIE, A. R. Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 15, p. 4013–4028, 9 set. 2017.

TORRES, P. H. M. et al. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2 set. 2019.

TORRY, D. S.; COOPER, G. M. Proto-Oncogenes in Development and Cancer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 25, n. 3, p. 129–132, 1 abr. 1991.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

TSYRLOV, I. B.; MIKHAILENKO, V. M.; GELBOIN, H. V. Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1205, n. 2, p. 325–335, 13 abr. 1994.

TZIMA, Chrysoula S.; BANTI, Christina N.; HADJIKAKOU, Sotiris K. Assessment of the biological effect of metal ions and their complexes using *Allium cepa* and *Artemia salina* assays: a possible environmental implementation of biological inorganic chemistry. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 611–629, 2022.

VAN MEEUWEN, J. A. et al. (Anti)estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 221, n. 3, p. 372–383, 15 jun. 2007.

VAN NGUYEN, T.; ALFARO, A. C. Applications of flow cytometry in molluscan immunology: Current status and trends. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 94, p. 239–248, 1 nov. 2019.

VAN'T HOF, J. The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristems. **Experimental Cell Research**, v. 51, n. 1, p. 167–176, 1 jun. 1968.

VARMA, M. V.; PERUMAL, O. P.; PANCHAGNULA, R. Functional role of P-glycoprotein in limiting peroral drug absorption: optimizing drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 4, p. 367–373, 1 ago. 2006.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 6 jun. 2002.

VERHOOG, N. J. D.; SPIES, L. M. L. The anti-aromatase and anti-estrogenic activity of plant products in the treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 243, p. 106581, 1 out. 2024.

VERMA, S. K. et al. The posterity of Zebrafish in paradigm of in vivo molecular toxicological profiling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 171, p. 116160, 1 fev. 2024.

VINKEN, M.; BLAAUBOER, B. 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, 1 mar. 2017.

WADIBHASME, P. G.; GHASIAS, M. M.; THAKURDESAI, P. A. Anti-asthmatic potential of chrysin on ovalbumin-induced bronchoalveolar hyperresponsiveness in rats. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 5, p. 508–515, maio 2011.

WALLE, T. et al. Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. **British journal of clinical pharmacology**, v. 51, n. 2, p. 143–146, fev. 2001.

WALTERS, W. P. Going further than Lipinski's rule in drug design. **Expert opinion on drug discovery**, v. 7, n. 2, p. 99–107, fev. 2012.

WANG, H. et al. Luteolin sensitizes the antitumor effect of cisplatin in drug-resistant ovarian cancer via induction of apoptosis and inhibition of cell migration and invasion. **Journal of ovarian research**, v. 11, n. 1, 19 nov. 2018.

WANG, K.; CHEN, X. Protective effect of flavonoids on oxidative stress injury in Alzheimer's disease. **Natural Product Research**, 2024.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2147–2151, 1 dez. 2011.

WEI, Q.; ZHANG, Y. H. Flavonoids with Anti-Angiogenesis Function in Cancer. **Molecules**, v. 29, n. 7, p. 1570, 1 abr. 2024.

WESTERMARCK, J.; HAHN, W. C. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 152–160, 1 abr. 2008.

WHO – World Health Organization. **Cancer**, 2024. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 2 dez. 2024

WIJEYARATNE, W. M. D. N.; WICKRAMASINGHE, P. G. M. U. Chromosomal Abnormalities in Allium cepa Induced by Treated Textile Effluents: Spatial and Temporal Variations. **Journal of Toxicology**, v. 2020, p. 8814196, 2020.

WYLD, L.; AUDISIO, R. A.; POSTON, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology** 2014 12:2, v. 12, n. 2, p. 115–124, 11 nov. 2014.

XAVIER, M. N. et al. Allium cepa used as a dosimetry system in nuclear and radiological emergencies. **The European Physical Journal Plus** 2021 136:6, v. 136, n. 6, p. 1–11, 22 jun. 2021.

YADAV, R. et al. Virtual screening, ADMET prediction and dynamics simulation of potential compounds targeting the main protease of SARS-CoV-2. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 39, n. 17, p. 6617–6632, 2021.

YANG, B. et al. Chrysin inhibits metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells by modulating matrix metalloproteinase-10, epithelial to mesenchymal transition, and PI3K/Akt signaling pathway. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 34, n. 1, p. 105–112, jan. 2014.

YAO, W. et al. Toxicological evaluation of a flavonoid, chrysin: morphological, behavioral, biochemical and histopathological assessments in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 601–612, 14 nov. 2019

YE, H.; SHAW, I. C. Food flavonoid ligand structure/estrogen receptor- α affinity relationships – toxicity or food functionality? **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, p. 328–336, 1 jul. 2019.

YU, W.; MACKERELL, A. D. Computer-Aided Drug Design Methods. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1520, p. 85, 2017.

YUAN, Y. et al. Toxicological effects induced by two carbamates on earthworms (*Eisenia fetida*): Acute toxicity, arrested regeneration and underlying mechanisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 269, p. 115824, 1 jan. 2024.

ZHANG, Q.; ZHAO, X. H.; WANG, Z. J. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 2042–2053, 1 jun. 2008.

ZHANG, Q.; ZHAO, X. H.; WANG, Z. J. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 5, p. 797–807, 1 ago. 2009.

ZHANG, S. et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2024 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–36, 19 jun. 2024.

ZHAO, H. Y. et al. Overcoming C797S mutation: The challenges and prospects of the fourth-generation EGFR-TKIs. **Bioorganic Chemistry**, v. 128, p. 106057, 1 nov. 2022.

ZHAO, J. et al. Ultrahigh pressure enhances the extraction efficiency, antioxidant potential, and hypoglycemic activity of flavonoids from Chinese sea buckthorn leaves. **LWT**, v. 207, p. 116671, 1 set. 2024.

ZIMTA, A. A. et al. The Role of Nrf2 Activity in Cancer Development and Progression. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1755, 1 nov. 2019.

ZULKIFLI, M. H. et al. In silico toxicity studies of traditional Chinese herbal medicine: A mini review. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 80, p. 102588, 1 jun. 2023.