

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Fátima Rui Ráice

**Avaliação da atividade antitumoral e
do mecanismo de ação de compostos
bases de Schiff e seus complexos
bimetálicos de Cu(II)**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2025

Fátima Rui Ráice

**Avaliação da atividade antitumoral e
do mecanismo de ação de compostos
bases de Schiff e seus complexos
bimetálicos de Cu(II)**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação
em Biociências da Fundação
Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto
Alegre como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em
Biociências.

Orientadora: Profa.Dra. Jenifer Saffi

Coorientadora: Profa.Dra. Adriana Castro Pinheiro

Porto Alegre
2025

Catologação na Publicação

Ráice, Fátima Rui

Avaliação da atividade antitumoral e do mecanismo de ação de compostos bases de Schiff e seus complexos bimetálicos de Cu(II) / Fátima Rui Ráice. -- 2025.
178 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2025.

Orientador(a): Jenifer Saffi ; coorientador(a): Adriana Castro Pinheiro.

1. Câncer colorretal. 2. Câncer de mama. 3. Quimioterapia. 4. Bases de Schiff. 5. Complexos bimetálicos de Cu (II). I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Toxicológica (GenTox) situado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). O mesmo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/Pesquisador Gaúcho 21/2551-0001945-0), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, code 001), a qual concedeu a bolsa de mestrado à estudante.

DEDICATÓRIA

*Dedico esta conquista à família Ráice, em especial aos meus pais e irmãos. Agradeço
por TUDO e por TANTO...*

Eclesiastes 3:1

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais e aos meus irmãos por todo o esforço, incentivo, ensinamentos e pelas incontáveis oportunidades que me concedem. Pouco disto seria possível sem a vossa mão segurando a minha.

Ao meu querido namorado Cleiton, pelo suporte inestimável e por ter aceitado trilhar nesta caminhada comigo. Obrigada pelo carinho, nos bons e piores momentos.

Às minhas orientadoras, Adriana Pinheiro e Jenifer Saffi, obrigada por confiarem em mim e por estarem sempre por perto contribuindo para ampliar os meus horizontes, tanto no espectro pessoal quanto profissional. A vossa paciência, incentivo e acolhimento foram bastante cruciais durante este processo.

À todos os meus colegas do laboratório GenTox. Em especial à Ianka, obrigada pela sua amizade, pela disponibilidade em transmitir os conhecimentos teóricos e práticos desde a base, pelos puxões de orelha, pelas risadas e lamentações em dias que os experimentos não colaboraram.

À Priscila, Thaís, Tamira e Paola, pelos dias divertidos, pelas conversas e momentos impactantes. Obrigada, meninas.

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

Kanimambo!

RESUMO

As bases de Schiff e seus complexos metálicos de cobre(II) têm sido amplamente investigadas pelas suas propriedades antitumorais, embora os mecanismos moleculares envolvidos na sua ação ainda não estejam completamente esclarecidos. Neste estudo, foram avaliadas as propriedades biológicas de dois ligantes do tipo bases de Schiff (**1a** e **1b**) e de seus respectivos complexos bimetálicos de Cu(II) (**2a** e **2b**), previamente sintetizados e caracterizados. O objetivo foi investigar seus efeitos citotóxicos, genotóxicos e pró-apoptóticos *in vitro* em linhagens celulares humanas de câncer colorretal (SW620 e HCT-116) e de câncer de mama (MCF-7). Como controle não tumoral, foram utilizados fibroblastos humanos (MRC-5), a fim de avaliar a seletividade dos compostos em relação às células tumorais. A atividade citotóxica foi analisada pelos ensaios de MTT, vermelho neutro e exclusão de azul de tripan. A capacidade antiproliferativa foi determinada por ensaio clonogênico. Para elucidar os mecanismos de atividade antitumoral, realizaram-se o ensaio cometa, para detecção de danos ao DNA, e a análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando a sonda MitoSOX™ Red. A progressão do ciclo celular e a indução de morte celular por apoptose foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados dos ensaios de viabilidade celular demonstraram que os compostos **1a** e **1b** apresentaram citotoxicidade para as linhagens HCT-116 e SW620 ($IC_{50} = 35\text{--}40\ \mu\text{M}$), com baixa atividade frente à linhagem MCF-7. Por outro lado, os complexos **2a** e **2b** mostraram citotoxicidade em todas as linhagens tumorais, incluindo MCF-7. Todos os compostos reduziram a proliferação celular e apresentaram alta seletividade em relação aos fibroblastos MRC-5 ($IC_{50} \geq 90\ \mu\text{M}$). Os compostos **1a**, **2a** e **2b** destacaram-se na indução de danos genotóxicos, enquanto **1b** e **2a** aumentaram significativamente a produção de ERO intracelulares. As bases de Schiff provocaram a parada do ciclo celular na fase S nas linhagens de câncer colorretal, enquanto os complexos metálicos induziram bloqueio na fase G2/M nas linhagens de câncer colorretal e de mama. Todos os compostos investigados induziram apoptose nessas linhagens. Em conclusão, os complexos de Cu(II) apresentaram um perfil farmacológico mais promissor em comparação com as bases de Schiff livres, sugerindo que a complexação com cobre potencializa a atividade antitumoral, com destaque para o câncer colorretal.

Palavras-chave: Compostos bases de Schiff, complexos bimetálicos de Cu(II), quimioterapia, potencial antitumoral, mecanismos de ação, câncer colorretal, câncer da mama.

ABSTRACT

Schiff bases and their copper(II) metal complexes have been widely investigated for their antitumor properties; however, the molecular mechanisms underlying their action remain not fully understood. In this study, two Schiff base compounds (**1a** and **1b**) and their respective bimetallic copper(II) complexes (**2a** and **2b**) were synthesized and characterized to evaluate their cytotoxic, genotoxic, and pro-apoptotic effects *in vitro* in human colorectal cancer cell lines (SW620 and HCT-116) and a breast cancer cell line (MCF-7). Human normal fibroblasts (MRC-5) were used as a non-tumor control. Cytotoxic activity was assessed using MTT, neutral red uptake, and trypan blue exclusion assays. The antiproliferative capacity was evaluated using a clonogenic assay. To investigate the mechanisms of action, the comet assay was performed to detect DNA damage, and the MitoSOX™ Red probe was used to assess the generation of reactive oxygen species (ROS). Cell cycle progression and apoptosis induction were analyzed by flow cytometry. The results showed that compounds **1a** and **1b** exhibited selective cytotoxicity towards HCT-116 and SW620 cell lines ($IC_{50} = 35\text{--}40\ \mu\text{M}$), with low activity against the MCF-7 cell line. In contrast, complexes **2a** and **2b** demonstrated cytotoxicity across all tumor cell lines, including the MCF-7 cell line. All compounds reduced cell proliferation and showed high selectivity for non-tumor fibroblasts ($IC_{50} \geq 90\ \mu\text{M}$). Compounds **1a**, **2a**, and **2b** were particularly effective in inducing genotoxic damage, while **1b** and **2a** significantly increased intracellular ROS production. The Schiff base compounds induced cell cycle arrest in the S phase, whereas the metal complexes caused G2/M phase arrest in colorectal cancer cell lines. All compounds induced apoptosis in the colorectal cancer cell models. In conclusion, the copper(II) complexes exhibited a more promising pharmacological profile compared to the isolated Schiff bases, suggesting that copper coordination enhances antitumor activity, particularly in the context of colorectal cancer.

Keywords: Schiff base compounds, bimetallic Cu(II) complexes, chemotherapy, anticancer potential, action mechanisms, colorectal cancer, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As principais marcas do câncer.	16
Figura 2. Fases da carcinogênese.	17
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo.	18
Figura 4. Esquema representativo da anatomia do intestino grosso.	19
Figura 5. Representação gráfica das taxas de incidência do câncer colorretal	21
Figura 6. Sequência adenoma- carcinoma do câncer colorretal..	23
Figura 7. Principais opções de regimes terapêuticos nas três linhas de tratamento do câncer colorretal metastático.	26
Figura 8. Morfologia da linhagem celular SW620.	28
Figura 9. Morfologia da linhagem celular HCT-116.	30
Figura 10. Esquema representativo da anatomia da mama normal feminina.	33
Figura 11.	34
Figura 12. Estágios da formação do câncer de mama..	35
Figura 13. Morfologia da linhagem celular de mama MCF-7.	38
Figura 14. Estrutura química dos fármacos de platina aprovados para uso clínico.	41
Figura 15. Estrutura química de bases de Schiff..	45
Figura 16. Geração, eliminação e papel das espécies reativas de oxigênio (ERO) nas lesões celulares.	53
Figura 17. Via intrínseca e extrínseca da apoptose..	54
Figura 18. Estrutura química dos complexos bimetálicos de Cu(II) (2a e 2b) contendo ligantes monodentados 2,4-di- <i>terc</i> -butil-6-[(2-metoxifenil)metiliminometil]fenol (1a) e 1-[(2-metoxifenil)metiliminometil]naftalen-2-ol (1b) de bases de Schiff.	64
Figura 19. Ensaio de viabilidade nas linhagens celulares MRC-5, SW620, HCT116 e MCF-7 tratadas com complexos 2a e 2b (1 – 100 µM) por 72 h medida pelo ensaio MTT..	67
Figura 20. Ensaio de viabilidade celular das linhagens MRC-5, SW620, HCT116 e MCF-7 tratadas com complexos 2a e 2b (1 – 100 µM) por 72 h medida pelo ensaio vermelho neutro.	68
Figura 21. Ensaio de viabilidade celular das linhagens MRC-5, SW620, HCT116 e MCF-7 tratadas com complexos 2a e 2b (1 – 100 µM) por 72 h medida pelo ensaio azul de Trypan..	71

Figura 22. Ensaio clonogênico nas células MRC-5 (A), HCT-116 (B), SW620 (C) e MCF-7 (D) expostas a 2a .	74
Figura 23. Ensaio clonogênico nas células MRC-5 (A), HCT-116 (B), SW620 (C) e MCF-7 (D) expostas a 2b	75
Figura 24. Análise da geração de ERO induzida pelo complexo 2a nas células MRC-5 (A), HCT-116 (B), SW620 (C) e MCF-7 (D) após 72 horas de tratamento.	77
Figura 25. Análise da geração de ERO induzida pelo complexo 2b nas células MRC-5 (A), HCT-116 (B), SW620 (C) e MCF-7 (D) após 72 horas de tratamento.	78
Figura 26. Efeitos genotóxicos dos complexos 2a e 2b nas linhas celulares após 2 horas de tratamento.	80
Figura 27. Efeitos genotóxicos dos complexos 2a e 2b nas linhas celulares após 24 horas de tratamento, avaliados pelo ensaio cometa alcalino.	81
Figura 28. Distribuição percentual das células MRC-5, HCT-116, SW620 e MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com o complexo 2a ..	83
Figura 29. Distribuição percentual das células MRC-5, HCT-116, SW620 e MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com o complexo 2b .	84
Figura 30. Análise representativa de citometria de fluxo para perfil de morte celular em linhagens após tratamento com os complexos 2a e 2b .	87
Figura 31. Quantificação de células apoptóticas tardia (* $P < 0,05$) e necróticas (# $P < 0,05$) em linhagens MRC-5, HCT-116, SW620 e MCF-7 após tratamento com os complexos 2a e 2b .	88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo comparativo das linhagens celulares SW620 e HCT-116 quanto às suas características morfológicas, genéticas e funcionais 30
- Tabela 2.** Classificação dos quimioterápicos quanto à estrutura química, exemplos e mecanismo de ação. 39
- Tabela 3.** Atividade citotóxica dos complexos de Cu(II) **2a** e **2b** expressada por valores de IC₅₀ e IS em células humanas normais e tumorais pelo ensaio MTT após 72 h de tratamento. 65
- Tabela 4.** Atividade citotóxica dos complexos de Cu(II) **2a** e **2b** expressada por valores de IC₅₀ e IS em células humanas normais e tumorais pelo método de vermelho neutro após 72 h. 67
- Tabela 5.** Atividade citotóxica dos complexos de Cu(II) **2a** e **2b** expressada por valores de IC₅₀ e IS em células humanas normais e tumorais pelo método de Azul de Trypan após 72 h de tratamento. 69
- Tabela 6.** Resumo comparativo dos efeitos biológicos e mecanismo de ação dos ligantes bases de Schiff (**1a** e **1b**) e seus respectivos complexos bimetálicos de Cu(II) (**2a** e **2b**). 91

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

5 FU- 5-fluorouracil

ACG-Colégio Americano de Gastroenterologia, do inglês: *American College of Gastroenterology*

AJCC-Comitê de Conjunto Americano do Câncer, do inglês: *American Joint Committee on Cancer*

APC- polipose adenomatosa do colon, do inglês: *Adenomatous Polyposis Coli*

Atox 1-Chaperona antioxidante 1, do inglês: *Antioxidant 1 copper chaperone*

BER- reparo por excisão de bases, do inglês: *Base Excision Repair*

BRCA1- gene 1 do câncer de mama, do inglês: *Breast Cancer gene 1*

BRCA2- gene 2 do câncer de mama, do inglês: *Breast Cancer gene 2*

CAN-Conselho de Alimentação e Nutrição

CCR- Câncer Colorretal

Ccs- Chaperona para superóxido Dismutase do Cobre, do inglês: *Copper Chaperone for Superoxide Dismutase*

CEA- *Antígeno carcinoembrionário*

CIN- Instabilidade Cromossômica, do inglês: *Chromosomal Instability*

circRNAs- RNAs circundantes (circRNAs, do inglês: *circular RNAs*)

CM- Câncer de Mama

Ctr- transportadores da família da taxa de clique, do inglês: *Click Through Rate*

DDR- resposta ao dano ao DNA, do inglês: *Damage DNA Repair*

DNA- ácido desoxirribonucleico, do inglês: *deoxyribonucleic acid*

DSB- reparo de quebras de fita dupla, do inglês: *Double Strand Break Repair*

ER- Receptor de estrogênio, do inglês: *Estrogen receptor*

ERO - espécies reativas de oxigênio

GLOBOCAN- Observação Global do Câncer, do inglês: *Global Cancer Observatory*

HCAAs - Aminas heterocíclicas, do inglês: *Heterocyclic Amines*

Hep-G2- carcinoma hepático humano

HER2- receptor 2 do crescimento epidérmico humano, do inglês: *human epidermal growth factor receptor 2*

HR- Recombinação homóloga, do inglês: *Homologous Recombination*

HT 116- carcinoma colorretal primário de cólon humano, do inglês: *Human Colorectal Carcinoma 116*

HT29-carcinoma colorretal primário de cólon humano, do inglês: *Human Colorectal Carcinoma 29*

IARC-Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, do inglês: *International Agency for Research on Cancer*

IDH-Índice de Desenvolvimento Humano

INCA- Instituto Nacional do Câncer

KRAS - Oncogene homólogo viral do Sarcoma de rato Kristen, do inglês: *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*

MCF7- carcinoma de mama humano, do inglês: *Michigan Cancer Foundation-7*

MLH1- *MutL Homolog 1*

MMR-Reparo de incompatibilidades de DNA ou erro de pareamento, do inglês: *Mismatch Repair*

mRNA- RNA mensageiro

MSH- Genes homólogos, do inglês: *MutS Homolog*

MSI- Instabilidade de Microssatélites, do inglês: *Microsatellite Instability*

MSI-H - Alta instabilidade de microssatélites, do inglês: *Microsatellite Instability-High*

NER- reparo por excisão de nucleotídeos, do inglês: *Nucleotide Excision Repair*

NHEJ- reparo por junção de extremidades não-homólogas, do inglês: *Non-Homologous End Joining*

NOs- compostos N-nitrosos, do inglês: *N-nitroso Compounds*

PAHs -Hidrocarbonetos aromáticos, do inglês: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*

PG- Receptor de progesterona

RNA- ácido ribonucleico

SEER - Vigilância, Epidemiologia e Resultados, do inglês: *Surveillance, Epidemiology and End Results Program*

SW480- adenocarcinoma de cólon humano, do inglês: *Southwestern 480*

SW620 - adenocarcinoma de cólon humano, do inglês: *Southwestern 620*

Top1 - topoisomerase 1

Top2- topoisomerase 2

TOPO - topoisomerases

TP53- Proteína supressora de tumor, do inglês: *Tumor Protein p53*

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Câncer: Definição, estatística, tipologia e tratamento	13
1.2. Câncer Colorretal	17
1.2.1. Epidemiologia, fatores de risco, fisiopatologia e tratamento do câncer colorretal	18
1.2.2. Linhagem celular SW620	26
1.2.3. Linhagem celular HCT-116	28
1.2.4. Comparação entre as linhagens celulares: SW620 e HCT-116	30
1.3. Câncer de mama	31
1.3.1. Anatomia da mama	31
1.3.2. Epidemiologia, fatores de risco, subtipos moleculares e tratamento do câncer de mama	32
1.3.3. Linhagem celular MCF-7	36
1.4. Tratamento do câncer: Quimioterapia	38
1.5. Cobre e sua importância na biologia	41
1.6. Bases de Schiff e Complexos de Cobre (II) na terapia anticâncer	44
1.6.1. Estrutura e propriedades	44
1.7. Complexos bimetálicos de Cu(II) derivados de bases de Schiff na terapia anticâncer	46
1.8. Mecanismo de ação antitumoral de bases de Schiff e seus respectivos complexos de Cu(II)	47
1.8.1. Interação com o DNA	48
1.8.2. Inibição de enzimas-chave	49
1.8.3. Indução de espécies reativas de oxigênio (ERO)	50
1.8.4. Indução de apoptose pela via intrínseca	52
1.8.5. Ativação da parada do ciclo celular	54
2. JUSTIFICATIVA	56
3. OBJETIVOS	57
3.1. Objetivo geral:	57
3.2. Objetivos Específicos	57
CAPÍTULO I	58
4. PERSPECTIVAS FUTURAS	128
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
CURRICULUM VITAE (LATTES)	142

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado é composta de: **Introdução**, a qual traz uma revisão da literatura contendo os principais tópicos conceituais envolvidos neste trabalho. Esta seção aborda os aspectos epidemiológicos e clínicos dos cânceres de mama e colorretal, os modelos celulares utilizados para seu estudo, os tratamentos quimioterápicos convencionais, além da atividade antitumoral e dos mecanismos de ação de bases de Schiff e seus complexos com Cu(II). Em relação a este tópico, são abordadas com maior profundidade a interação dos compostos com DNA, estresse oxidativo pela produção de ERO, a inibição de enzimas-chave como as topoisomerasas, indução da parada do ciclo celular e indução de morte celular por apoptose pela via intrínseca, visto que são o ponto focal de estudo desta dissertação.

Subsequentemente são apresentado o seguinte capítulo:

CAPÍTULO I: Artigo Original - submetido ao periódico *Journal of Medicinal Chemistry*, Impactor Factor 6.8, intitulado: ***Cytotoxic Schiff Base Derivatives Disrupt DNA and Induce S-Phase Arrest and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells***

Ao final, é apresentada as **Perspectivas futuras** geradas por este trabalho.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: Definição, estatística, tipologia e tratamento

O câncer é uma doença genética heterogênea e multifatorial caracterizada pela ocorrência de uma série de alterações moleculares intimamente associadas com

mutações (1). Estas mutações resultam de uma falha do sistema de controle genético, ocasionando a transformação de células normais em células tumorais (2). A disfunção dos sistemas desencadeia a proliferação celular descontrolada, desregulada e caótica das células tumorais, favorecendo a formação de massas tumorais e podendo iniciar a invasão celular de tecidos e órgãos próximos e acessíveis (3).

Considera-se que a maior questão na fisiologia do câncer é a distinção entre tumores malignos dos benignos (4). O tumor benigno, como por exemplo uma verruga, é aquele que permanece em sua localização original e não se espalha pelos tecidos circundantes, nem para outras partes do corpo. Por outro lado, o tumor maligno é aquele proveniente de uma proliferação e invasão anormal de células nos tecidos circundantes ou comprometimento à distância (metástase) através do sistema circulatório ou linfático (5). Normalmente, apenas os tumores malignos são designados de câncer devido à sua alta capacidade de interferir nas funções vitais do organismo (6).

O reconhecimento do modelo molecular de múltiplos estágios no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer resulta de alterações e mutações progressivas no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês: *deoxyribonucleic acid*) da célula, impulsionadas por características fenotípicas denominadas de marcas do câncer, conforme descritas por Hanahan e Weinberg (2021) (**Figura 1**), que desempenham um papel importante na progressão tumoral (**Figura 1**) (7,8).

O sistema de estadiamento TNM padronizado pelo Comitê de Conjunto Americano do Câncer (AJCC, do inglês: *American Joint Committee on Cancer*), tornou-se referência na classificação padrão de câncer usando critérios relacionados ao tamanho e extensão do tumor (estágio T), linfonodos regionais (estágio N) e a presença ou não de metástases distantes (estágio M) para definir o prognóstico e determinar o estágio do câncer (9). Além de fornecer uma previsão e linguagem padronizada para refletir a carga tumoral, o sistema TNM permite com que pesquisadores de diferentes origens comuniquem-se entre si e comparem grupos de pacientes diagnosticados e tratados durante tempos variados nos últimos anos (10).

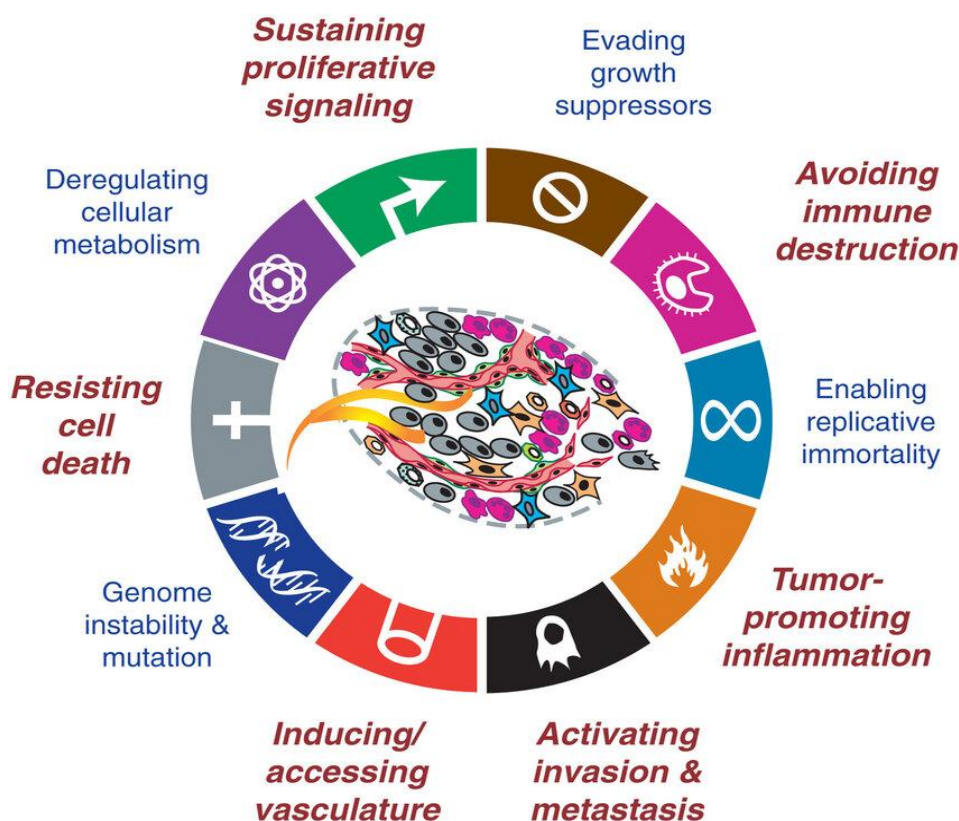


Figura 1. As principais marcas do câncer. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

O processo de formação do câncer designado de carcinogênese, também conhecido por tumorigênese ou oncogênese, caracteriza-se pelo seu crescimento de forma organizada, geralmente lento e expansivo, podendo levar muito tempo para que uma célula cancerígena se prolifere e dê origem a um tumor nítido (11). Nesse contexto, as células cancerosas são diferentes das células normais por apresentarem potencial proliferativo ilimitado, autossuficiência para os sinais de crescimento e resistência aos sinais antiproliferativos e apoptóticos (12).

A nível celular, o desenvolvimento do câncer (ou tumor) é visto como um processo que envolve eventos moleculares, celulares e epigenéticos, que é tipicamente categorizado em três etapas, nomeadamente: iniciação, promoção, progressão e metástase (**Figura 2**). Até a fase de progressão e metástase, as células que passaram por iniciação e promoção adquirem múltiplas mutações necessárias para invadir os tecidos circundantes e adjacentes através do sistema sanguíneo ou linfático, caracterizado pela metástase, marcando o início e a evolução do câncer invasivo, até o surgimento das manifestações clínicas da doença (13–15).

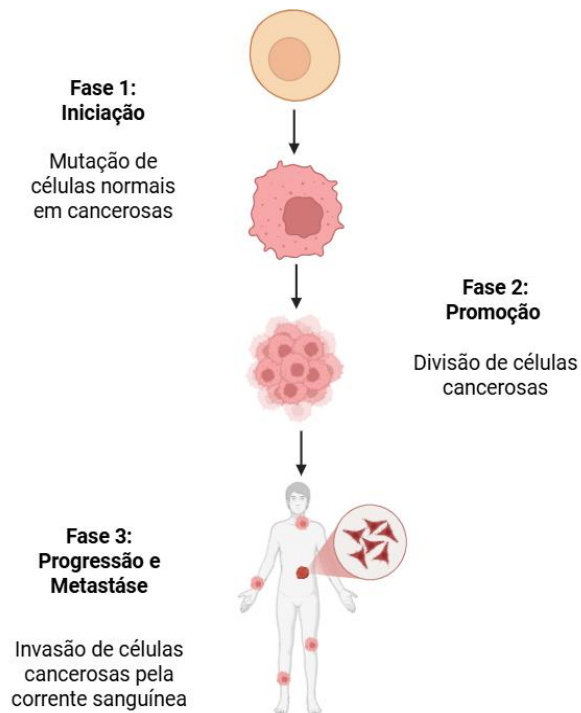


Figura 2. Fases da carcinogênese. A formação do câncer envolve a fase de iniciação, promoção e progressão/metástase. Criado pela autora (Biorender; <https://app.biorender.com>).

Compreender o estágio de progressão é crucial para o desenvolvimento de intervenções que interrompam o processo carcinogênico. Ao direcionar os fatores que promovem o crescimento das células cancerígenas e interromper as vias que as sustentam por meio de agentes quimioterápicos eficazes, pode ser possível impedir ou retardar a transformação de células pré-cancerosas em malignas (16).

O câncer é considerado uma das principais causas de elevadas taxas de internação e mortalidade no mundo (17,18). Nos homens, o câncer de próstata é a segunda maior causa de incidência e morte, seguido do câncer de cólon e reto, com cerca de 2,1 milhões (14,2%) e 1,6 milhões (10,4%) novos casos, respectivamente (19).

A **Figura 3** mostra que no Brasil, entre os diferentes tipos de câncer, o câncer de mama, o câncer do pulmão, traqueia e brônquios e o câncer colorretal são os mais incidentes e prevalentes, sendo responsáveis por cerca de 2,3 milhões (24%) e 890 mil (9,4%) de novos casos diagnosticados e mortes por câncer entre as mulheres (2,7,10).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.760	26,5%	Homens	Mulheres	Mama feminina	2.410	22,4%
Estômago	1.200	11,5%			Colo do útero	1.980	18,4%
Traqueia, brônquio e pulmão	880	8,5%			Cólon e reto	740	6,9%
Cólon e reto	690	6,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	650	6,0%
Cavidade oral	440	4,2%			Estômago	630	5,9%
Leucemias	440	4,2%			Leucemias	350	3,3%
Fígado	430	4,1%			Ovário	340	3,2%
Sistema nervoso central	320	3,1%			Fígado	320	3,0%
Esôfago	270	2,6%			Glândula tireoide	320	3,0%
Laringe	260	2,5%			Sistema nervoso central	270	2,5%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma (números arredondados para múltiplos de 10). Fonte: Retirado da estatística do Instituto Nacional do Câncer-INCA (2023).

A informação acima reflete a significativa carga do câncer na população mundial, evidenciando a necessidade de estudar estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento. No próximo tópico, abordaremos com mais detalhes as características, fatores de risco, particularidades do câncer colorretal e de mama, mais prevalentes em homens e mulheres, respectivamente, incluindo suas implicações clínicas, modelos de linhagens celulares específicas e avanços na abordagem terapêutica.

1.2. Câncer Colorretal

O cólon e o reto constituem o intestino grosso, designado o segmento final do sistema gastrointestinal. Juntamente com o intestino delgado, ambos órgãos formam alguns dos maiores tecidos do corpo humano e apresentam funções fisiologicamente distintas devido às suas diferenças anatômicas celulares (20). O cólon, em particular, é um tecido responsável pela regulação intestinal composto por múltiplos nervos, como o vago e pélvico, que coordenam as atividades motoras e secretoras (21).

Anatomicamente, o cólon se divide em duas regiões: cólon direito (que inclui metade direita do cólon transversal, ceco, cólon ascendente) que tem a função de absorver água e nutrientes; e o cólon esquerdo (composto pela metade esquerda cólon transversal esquerdo, cólon descendente e cólon sigmóide) responsável pelo armazenamento e excreção de resíduos fecais por movimento mecânico (20,22,23). O reto, por sua vez, localiza-se na parte posterior da cavidade pélvica, se unindo ao cólon

sigmoide e termina na junção anorretal, logo a seguir ao ânus com 15-20 cm, por onde é feita a excreção das fezes, a sua principal função fisiológica (24,25) (**Figura 4**).

Esta segmentação anatômica também está diretamente relacionada à classificação dos diferentes subtipos de câncer colorretal (CCR) que se distribuem em três regiões: cólon proximal, colon distal e reto (26). Cerca de 50% dos casos de CCR tem origem a partir de alterações genéticas e epigenéticas acumuladas do lado direito do cólon proximal, que é embriologicamente derivado do intestino médio, e tumores de lado esquerdo do reto (cólon distal e reto) que são derivados do intestino posterior embriológico (27).

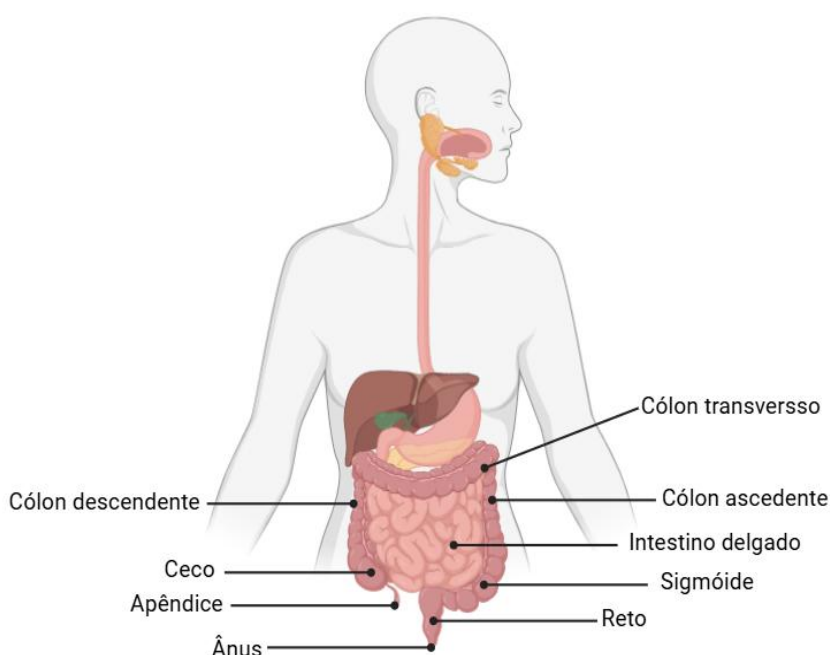


Figura 4. Esquema representativo da anatomia do intestino grosso. O intestino é composto pelo ceco, apêndice, cólon (dividido entre colón ascendente, transverso e descendente), reto e canal anal. Fonte: Criada pela autora (Biorender; <https://app.biorender.com>).

1.2.1. Epidemiologia, fatores de risco, fisiopatologia e tratamento do câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) ou de cólon e reto é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado e a terceira maior causa de morte entre as mulheres e homens, globalmente (11), devido aos programas de rastreamento tardio, a estratégia terapêutica e o aumento das taxas de incidência (28). Este câncer faz parte da lista dos

tumores gastrointestinais, que têm início no sistema digestivo, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (29).

Na década de 1950, o câncer colorretal era relativamente raro em determinadas populações de países ocidentais. No entanto, atualmente, é considerada a segunda causa mais comum de morte a nível mundial (30). Os últimos dados globais do câncer colorretal divulgados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês: *International Agency for Research on Cancer*), elaboradas pela Observação Global do Câncer (GLOBOCAN, do inglês: *Global Cancer Observatory*) (<https://gco.iarc.who.int/en>), mostraram que o número de mortes por CCR foi de 0,94 (9.4%) milhões de pessoas (31,32) (**Figura 5**).

No entanto, as projeções até 2045 não são nada animadoras, pois sugerem que a taxa de incidência e mortalidade por câncer de cólon e reto terão aumentado 70,5% e 71,5% impulsionadas pelo envelhecimento e crescimento populacional, respectivamente (33,34), variando geograficamente e significativamente entre os países e regiões com baixo e alto índice de desenvolvimento humano (29) (IDH). A distribuição global estimada da incidência por CCR, ajustada por idade e considerando ambos os sexos e todas as idades, para os próximos anos está representada na **Figura 5**.

Estimated number of new cases from 2022 to 2045, Both sexes, age [0-85+]
World

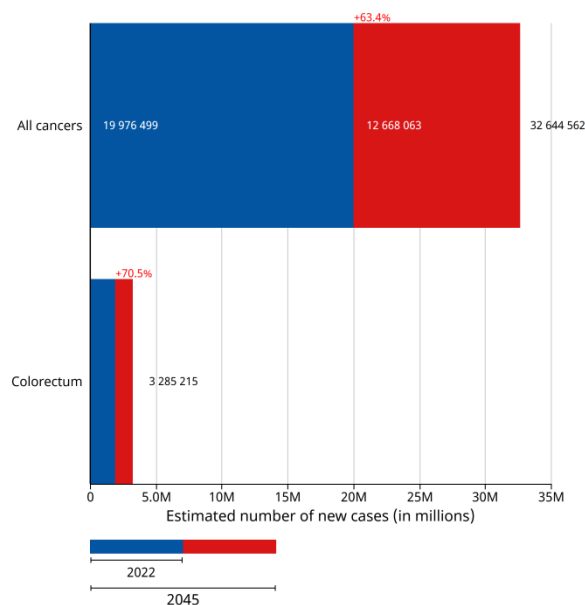


Figura 5. Representação gráfica das taxas de incidência do câncer colorretal, ajustadas por idade e padronizadas para população mundial, em ambos os sexos de 2022-2045. Fonte: GLOBOCAN (2024). Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/>. Acesso em 09 jul. 2025.

A incidência e mortalidade por CCR sempre foi consideravelmente mais elevada em países com alto IDH em relação aos baixos índices de IDH, devido à exposição e prevalência frequente de fatores de risco que serão discutidos posteriormente no presente trabalho. No entanto, atualmente, tanto os países de renda baixa assim como de média e alta renda, apresentam taxas de incidência e mortalidade exacerbadas de 80% e 85%, respectivamente. As regiões populacionais que foram estimadas com alto risco de mortalidade padronizada por idade e sexo incluem a Europa (30,4%), Oceania (29,8%) e América do Norte (26,2%), seguida de regiões como a África (95,0%), América Latina (74%) e Ásia (70,8%) com baixo risco. Adicionalmente, as disparidades entre a faixa etária, sexo e raça também contribuem para a incidência, prognóstico e mortalidade (29).

O CCR é tido como uma doença do envelhecimento (10), pois a idade média de início deste tipo de câncer é de 60 anos, onde na maioria das vezes, o sistema imunológico do indivíduo já se encontra comprometido (35). Porém, nos últimos anos, devido a mudança de estilo de vida e dieta em direção à ocidentalização, a população mais jovem também tem sido acometida por esta doença (36), sendo mais comum em homens do que em mulheres em todas as populações estudadas. Ademais, os dados do Programa Vigilância, Epidemiologia e Resultados (SHEER, do inglês: *Surveillance, Epidemiology and End Results Program*) indicam que existe disparidades entre as raças e as etnias associadas ao risco cumulativo geral do CCR (37). Entre indivíduos com menos de 45 anos, a taxa entre pessoas negras é de quase 50 por 100.000 habitantes, em comparação com a raça branca que está em torno de 37,0 por 100.000 habitantes. Esta diferença está relacionada às contribuições genéticas e biológicas, desigualdade no acesso ao sistema de saúde, alimentação, comorbidades, e atraso no diagnóstico (38,39).

Tanto os fatores de risco modificáveis e não modificáveis têm uma contribuição gritante no desenvolvimento, incidência e sobrevivência do CCR (40). A dieta alimentar destaca-se como um dos principais fatores, especialmente devido ao consumo excessivo de carne vermelha e processada, gordura animal e baixa ingestão de fibras (41), tornando o cólon e o reto dois órgãos susceptíveis à influência da dieta (42).

Segundo um estudo de coorte realizado por Johnson e colaboradores, o processamento e o consumo frequente e excessivo de carne vermelha aumenta o risco de desenvolver o câncer de cólon proximal em homens e de câncer retal em mulheres (43%). Em dieta ocidental, a ingestão de carne média necessária de carne vermelha é de 220g/dia, sendo estimado um risco aumentado para CCR de até 16% para cada 100g/dia de carne vermelha e de 22% para cada 50g/dia em carnes processadas (44). Substâncias como hidrocarbonetos aromáticos (PAHs, do inglês: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*), as aminas heterocíclicas (HCAs, do inglês: *Heterocyclic Amines*) e os compostos N-nitrosos (NOX, do inglês: *N-nitroso Compounds*), liberam toxinas durante o cozimento de carne em alta temperatura (45). Por outro lado, o excesso de gordura animal e a baixa ingestão de fibras podem promover a secreção biliar, favorecer a disbiose bacteriana intestinal e gerar inflamação crônica resultando no início da oncogênese (46,47).

O desenvolvimento do CCR está intimamente relacionado a uma série de mecanismos fisiopatológicos, como a proliferação celular anormal, diferenciação celular, resistência à morte celular por via da apoptose, invasão de estruturas adjacentes por células tumorais e metástase a distância, além do metabolismo celular do indivíduo (48). As células tumorais reprogramam as suas vias metabólicas para compreender o sistema de maquinaria da rápida proliferação celular, que pode ser ocasionada pela desregulação dos RNAs circundantes (circRNAs) durante o processo de tradução (49,50). Geralmente o CCR se origina a partir de pólipos benignos no cólon ou reto que passam por um processo displásico para progredir para adenocarcinomas, através da sequência adenoma-carcinoma, inicialmente descrito pelos pesquisadores Fearon e Vogelstein em 1990 (51).

A sequência da transformação do adenoma e carcinoma, ou seja, transformação de células normais para células cancerígenas, é impulsionada pelo acúmulo de inúmeras mutações genéticas e epigenéticas, que culminam com a promoção do fenótipo tumoral por meio da seleção de variantes com melhor sobrevivência, crescimento e invasão de colônias de células cancerígenas (52) (**Figura 6**).

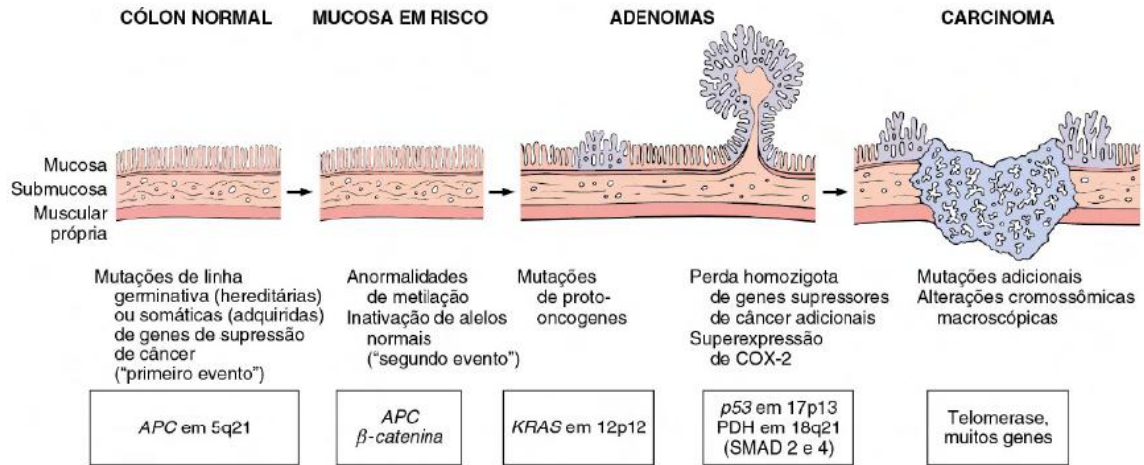


Figura 6. Sequência adenoma-carcinoma do câncer colorretal. Fonte: Retirado do livro de Patologia Básica Robbins, 9º ed, 2013.

O processo da sequência adenoma-carcinoma é caracterizado por duas principais vias patogênicas. A primeira via envolve defeitos nos genes da instabilidade cromossômica (CIN, do inglês: *Chromosomal Instability*), resultante de alterações estruturais e numéricas nos cromossomos, envolvendo mutações em oncogenes (RAS, MYC, EGFR, TGF alfa) e genes supressores de tumores (APC, MSI, TP53, SMAD4) (53) (**Figura 6**). Esta via está presente em 85% dos casos esporádicos de CCR, e envolve fatores ambientais, mutações somáticas hereditárias adquiridas no epitélio colorretal (54). A segunda via molecular, instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês: *Microsatellite Instability*), envolve alterações APC/β-catenina e mutações adicionais no oncogene homólogo viral do Sarcoma de rato Kristen (KRAS, do inglês: *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*), e gene polipose adenomatosa do colon (APC, do inglês: *Adenomatous Polyposis Coli*) decorrente da deficiência do sistema de reparo de incompatibilidades de DNA ou erro de pareamento (MMR, do inglês: *Mismatch Repair*) levando ao acúmulo gradual de mutações que favorecem a tumorigênese (**Figura 6**) (55). À medida que o adenoma cresce, ocorrem alterações genéticas e epigenéticas, como a perda da função da proteína P53, que permite a conversão do adenoma e adenocarcinoma invasivo promovendo a proliferação celular descontrolada e displasia de alto grau (56).

Em humanos, seis genes homólogos envolvidos na inativação do MMR foram denominados de MSH (do inglês: *MutS Homolog*): MLH1 (localizado na mitocôndria), MSH2, MSH3, MSH6 (localizado no núcleo), MHL4 e MHL5 (fazem parte dos sistema de recombinação), além das proteínas PMS1 e PMS2 que compõem o complexo

proteico (55). O nome *MutS* é originário de uma proteína originalmente identificada em bactérias (*MutS*), responsável pelo reparo de erros durante a replicação do DNA (57).

No câncer colorretal, a mutação principalmente nos genes *MLH1* e *MSH2*, prejudica a capacidade de reparar o deslizamento da fita simples ou dupla ao DNA dentro das repetições de nucleotídeos. Essas vias ou mecanismos de sistemas de reparo podem atuar de forma independente ou combinada, impactando na progressão do câncer e influenciando a resposta ao tratamento (58,59).

O diagnóstico do CCR envolve uma vasta combinação de diferentes exames recomendados pelo Colégio Americano de Gastroenterologia (ACG, do inglês: *American College of Gastroenterology*), que incluem: exames clínicos, histórico do paciente e testes específicos como o de imagem. No entanto, a escolha do teste a ser realizado dependerá do exame físico de abdome, idade, análise do histórico familiar e alimentar do paciente, sintomas apresentados e fatores de risco ao qual ele foi sujeito (60). Os principais exames clínicos realizados consistem na pesquisa de sangue oculto ou aparente nas fezes e exames endoscópicos (colonoscopia, sigmoidoscopia e retoscopia) para os casos com diagnóstico positivo, que tem a finalidade de visualização interna do intestino buscando a presença de pólipos benignos que se transformaram em malignos (61).

O tratamento do CCR é baseado principalmente na cirurgia, suplementado pela quimioterapia (adjuvante e neoadjuvante), radioterapia, imunoterapia e terapia molecular direcionada para a eliminação completa do tumor (62). No caso de paciente que tenha o câncer localmente avançado, a quimioterapia neoadjuvante é frequentemente usada em combinação com radioterapia para ajudar a reduzir o estágio clínico do tumor e erradicar completamente as micrometástases pós-cirurgia (63). Para cânceres de cólon que envolve linfonodos (em estágio III, IV, V) ou locais distantes, é indicada a quimioterapia adjuvante ou paliativa para eliminar as células tumorais restantes após a cirurgia radical e melhorar a qualidade de vida com pacientes com CCR avançado (64).

As fluoropirimidinas são conhecidas como a classe de fármacos prioritária e central no tratamento do CCR. Na doença avançada, a administração de quimioterapia sistêmica, incluindo 5-fluorouracil (5-FU) ou seu pró-fármaco capecitabina, é obrigatória (65). O 5-Fluorouracil, pertencente ao grupo das fluoropirimidinas, tem sido usado na quimioterapia convencional de primeira linha de defesa para o CCR metastático de estágio III por mais de 50 anos, e indicado para pacientes com baixo

desempenho ou baixo risco de declínio ou deterioração (66). Posteriormente, outros medicamentos, como Cetuximab e Leucovorin, também foram conhecidos e empregados devido à sua eficácia contra a doença. O 5-FU é administrado em combinação com leucovorina, um derivado do ácido fólico que potencializa os efeitos inibitórios citotóxicos do fluorouracil (67).

Estudos realizados apontam que, a baixa metabolização e acúmulo de 5-FU no interior das células cancerígenas pode ser ocasionado pelo transporte transmembranar alterado, ou seja efluxo de fármacos, mediado principalmente por transportadores que bombeiam o agente quimioterápico para fora da célula, reduzindo a concentração intracelular e sua eficácia; ou através da redução da absorção de fármacos nas células cancerígenas mediada por transportadores de soluto, considerados determinantes da absorção e disposição intracelular dos fármacos antineoplásicos (67–69).

Com o objetivo de reduzir a taxa de progressão do câncer metastático, a quimioterapia sistêmica atual introduziu novos regimes terapêuticos adaptáveis ao estágio do tumor que compreendem a terapia de agente único com apenas 5-FU e regimes de agentes múltiplos com quimioterápicos (70), que incluem: fluorouracil (5-FU), irinotecano (IRI), oxaliplatina (OX), capecitabina (CAP, XELODIA ou XELOX) e *Raltitrexed* (RAL). Por outro lado, existem os regimes de terapia combinada FOLFOX (combinação de oxaliplatina, 5-fluorouracil (5-FU) e leucovorina), CAPOX (também conhecido como XELOX: oxaliplatina, capecitabina oral), FOLFIRI (leucovorina, 5-FU, irinotecano) e CAPIRI (capecitabina e oxaliplatina) que continuam sendo as principais abordagens de tratamento (71,72).

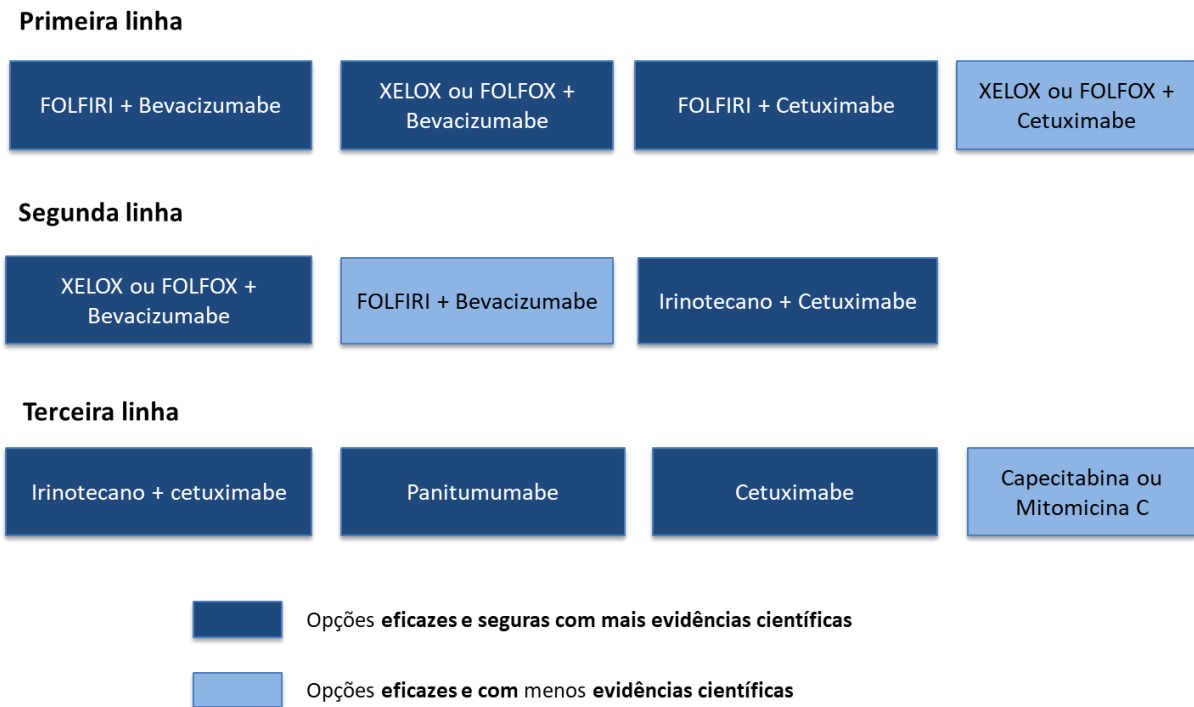


Figura 7. Principais opções de regimes terapêuticos nas três linhas de tratamento do câncer colorretal metastático (adaptado de Maslarinou *et al.*, 2023).

Avanços recentes na quimioterapia do câncer colorretal demonstram que os pacientes tratados com a infusão de 5-fluorouracil, leucovorina, e oxaliplatina (FOLFOX) e irinotecano (FOLFIRI) mais bevacizumabe (73), um anticorpo monoclonal (mAb) atualmente usado como tratamento de primeira linha junto com a quimioterapia, foram associados a uma sobrevida global significativamente maior no tratamento de primeira linha para câncer colorretal metastático ou irressecável quando comparado com as combinações quimioterápicas citadas anteriormente (74).

A introdução da utilização de tecnologias avançadas na medicina contemporânea para o diagnóstico do CCR, como a inteligência artificial (IA), tem sido cada vez mais destacada como um método promissor na detecção, prognóstico e terapia do câncer (75,76). Atualmente, a introdução da IA trouxe avanços significativos para novas tendências atuais para análise e diagnóstico do câncer colorretal (77), sendo possível analisar imagens endoscópicas e radioscopias favorecendo a detecção de lesões neoplásicas, fato que auxilia no rápido diagnóstico e reduz a variabilidade da classificação visual entre os observadores ou endoscopistas e aprimorar a interpretação radiológica e histopatológica (78).

Embora a cirurgia e a quimioterapia tenham melhorado significativamente o manejo do CCR, a taxa de sobrevida global permanece relativamente baixa principalmente em pacientes com metástase. Sem tratamento, a sobrevida dos pacientes com CCR metastático é tipicamente 6 a 12 meses (79). A sobrevida média em indivíduos com CCR está intimamente relacionada às comorbidades existentes da componente molecular e ao estágio do tumor, diminuindo rapidamente em indivíduos com doença metastática (41).

Pacientes em estágios iniciais (I-II) apresentam taxas de sobrevida em cinco anos superiores. A metástase é a principal causa de morte, com uma taxa de sobrevida em cinco anos superior a 90%, em caso metastático (IV) a taxa cai para 10%-15% (80). Embora existam muitas síndromes genéticas, quase 70% dos CCR são esporádicos, resultantes de mutações pontuais que promovem alterações moleculares e patológicas no genoma celular (31).

Na área da oncologia, entender os processos relacionados a proliferação e crescimento celular, ciclo celular e apoptose por meio de diferentes técnicas, torna-se bastante fundamental (81). Funções e processos biológicos são feitos em estudos envolvendo linhagens celulares humanas, particularmente derivadas de tumores primários e secundários ressecados de um único paciente, como por exemplo a HCT-116 (do inglês: *Human Colorectal Carcinoma 116*), HT29 (do inglês: *Human Colorectal Carcinoma 116*), SW480 (*Southwestern 480*) e SW620 (*Southwestern 620*), que são modelos pré-clínico importante na exploração dos mecanismos subjacentes ao câncer colorretal (82,83).

Os testes de investigação do mecanismo de ação de quimioterápicos são realizados a partir de ensaios bastante sensíveis e que avaliam o efeito em alvos celulares mais específicos e pontuais: os sistemas enzimáticos, metabólicos, funcionais ou estruturais (84). Outrossim, fornecem insights essenciais sobre a biologia molecular e celular de tumores, descoberta de novos compostos antitumorais e biomarcadores de resposta a quimioterápicos convencionais quanto a sensibilidade, resistência e toxicidade a medicamentos para prática clínica na oncologia (85).

1.2.2. Linhagem celular SW620

A linhagem celular SW620 (**Figura 8**) é derivada do intestino grosso de um homem de 51 anos com câncer colorretal Dukes-C cólon secundário. Ela foi

estabelecida pela primeira vez no laboratório pelo cientista Albert Leibovitz, para fins de caracterização e estudos sobre o câncer colorretal (86). Considera-se que o elevado potencial metastático e a sua origem no nódulo linfático metastático fazem delas um modelo relevante para o estudo da disseminação do câncer de cólon e reto.

A SW480 (tumor primário) e SW620 (tumor metastático linfonodal) são derivadas do mesmo paciente doador (87). Apresentam perfis de mutação idênticos, no entanto, diferenças epigenéticas evidentes, sendo que SW480 é homozigoto, enquanto a SW620 é heterozigoto para as mutações pontuais no gene KRAS (88). Além desta mutação, pode ocorrer mutação no gene da proteína supressora de tumor TP53 (do inglês: *Tumor Protein p53*) e mutação no gene supressor tumoral APC responsável por interromper o ciclo celular em resposta ao dano no DNA e regular a degradação da β -catetina, respectivamente (89).

Morfologicamente, as células SW620 são epiteliais com uma aparência semelhante a fibroblastos; consistem em pequenas células redondas e bipolares que correspondem a microvilosidades com cerca de $14,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de diâmetro, com menos protrusões e uma área lameipodial menos extensa (90) (**Figura 8**). São caracterizadas por sintetizar pequenas quantidades de antígeno carcinoembrionário (CEA) que são altamente tumorigênicas em camundongos nude, além de serem positivas para citoqueratina por imunocoloração de peroxidase, marcador essencial para caracterizar as células de origem epitelial, como é o caso dos adenocarcinomas colorretais. Possui um cariótipo hiperdiploide, ou seja, mais cromossomos do que o diploide normal humano variando de 46 a 52 cromossomos marcadores comuns durante a metáfase S da divisão celular (82).

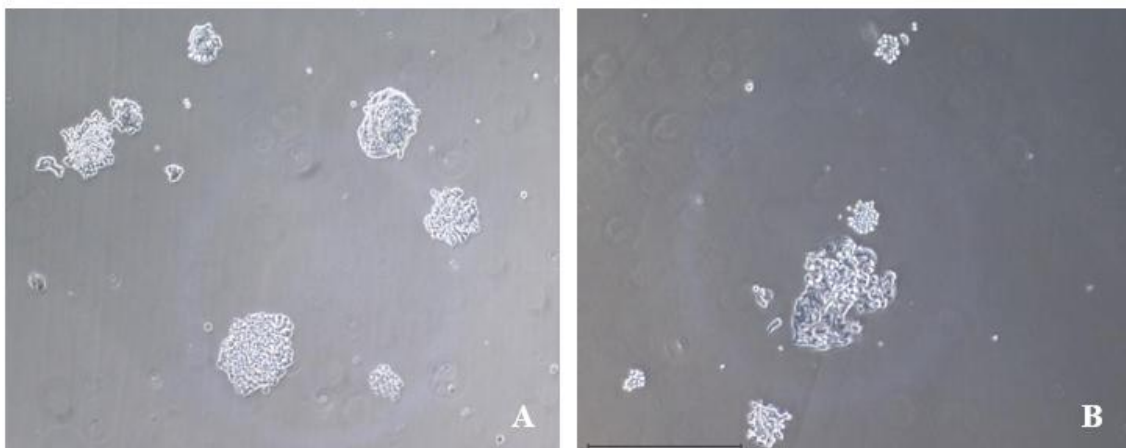


Figura 8. Morfologia da linhagem celular SW620 observada por microscopia óptica. Imagens capturadas com objetivas de 10× (A) e 20x (B) (500 µm), utilizando o sistema EVOS. Barra de escala: 500 µm. As imagens evidenciam as características morfológicas típicas da linhagem.

O crescimento do CCR é regulado, em grande parte, pelo desequilíbrio entre a proliferação celular aumentada e a redução da apoptose, favorecendo a expansão tumoral. As maiores taxas de proliferação em células de câncer colorretal estão associadas a um fenômeno de MSI e baixa diferenciação resultando em um prognóstico ruim (91). A SW620, por sua vez, apresenta uma instabilidade cromossômica, CIN, caracterizada por anormalidades na segregação cromossômica e ocorre em cerca de 75% dos casos de CCR.

A presença de CIN indica que os genes clássicos de sistema de reparo estão funcionalmente ativos, e que possivelmente os erros ou danos ocasionados ao DNA serão reparados. Esta instabilidade contribui para sua rápida proliferação e agressividade, conferindo-lhe a capacidade invasiva e de resistência a determinados estímulos (92). A presença de mutações em genes chaves como TP53, KRAS e APC, favorece a proliferação desregulada e a evasão da apoptose, enquanto a deficiência parcial em vias de reparo do DNA contribui para o acúmulo de alterações genéticas (89).

1.2.3. Linhagem celular HCT-116

A HCT-116 (**Figura 9**) é derivada de um carcinoma colorretal primário de um paciente de 41 anos do sexo masculino, comumente usada para estudar a biologia do câncer (93). Esta é uma linhagem de células independente do fator de crescimento que demonstrou ser invasiva e altamente móvel em estudos *in vitro* com potencial de diferenciação limitado, tornando-se um modelo excepcional para estudar fenótipos tumorais agressivos (94). Existem diferenças entre o carcinoma colorretal e os adenocarcinomas avançados, o adenocarcinoma se desenvolve nas glândulas, enquanto o carcinoma se origina no tecido epitelial (95).

A linhagem celular HCT-116 exibe uma morfologia semelhante à epitelial, normalmente crescem em culturas de monocamada, mas também podem formar esferóides com diâmetros de 150-400 µm, e apresenta um tempo de duplicação variado de 25 a 40 horas (96) (**Figura 9**). Essa adaptabilidade nos padrões de crescimento

ressalta a sua versatilidade em várias configurações experimentais (82). Quanto ao perfil cromossômico, as células HCT-116 são quase diplóides com aproximadamente 70% da população celular abrigando 45 cromossomos, com uma amplificação notável é recorrente nos braços longos dos cromossomos (8, 10, 16 e 17), enquanto o cromossomo Y está ausente, contribuindo para a sua composição genômica única. Esta linhagem é muito usada como modelo de triagem para estudos de potenciais candidatos a medicamentos quimioterápicos contra o câncer (97).

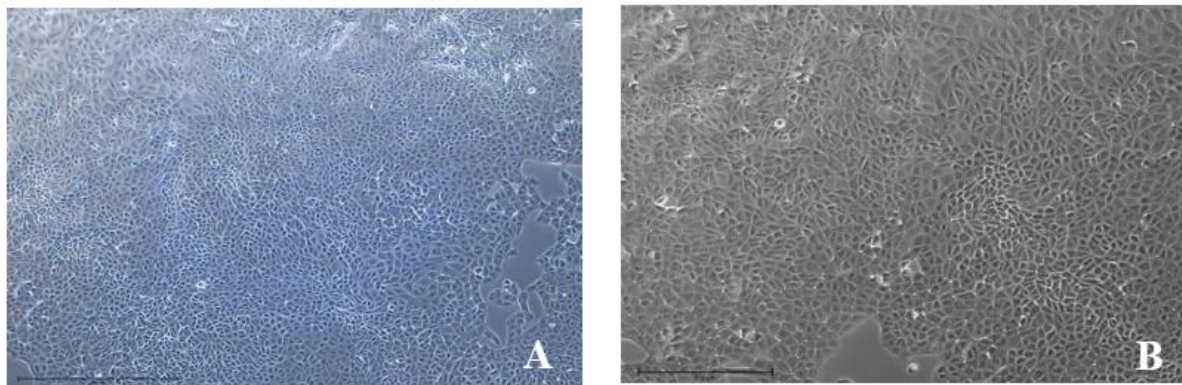


Figura 9. Morfologia da linhagem celular HCT-116 observada por microscopia óptica. Imagens capturadas com objetivas de 10x (A) e 20x (B) (500 μm), utilizando o sistema EVOS. Barra de escala: 500 μm . As imagens evidenciam as características morfológicas típicas da linhagem.

Quanto ao seu perfil genético e molecular, as células HCT116 são um modelo clássico que inclui mutações, alterações e inativação epigenéticas do gene *MLH1* (do inglês: *MutL Homolog 1*) silenciado por metilação que culminam com alta instabilidade de microssatélites (MSI-H, do inglês: *Microsatellite Instability-High*) (91). Esta alta instabilidade é causada devido a falha ou defeitos no sistema MMR, resultando em erros não corrigidos durante a replicação do DNA, especialmente em regiões com repetições curtas designadas de microssatélites (98).

O silenciamento de *MLH1* por metilação do promotor impede a formação do complexo de reparo com *PMS2*, levando ao acúmulo de mutações e aumentando a heterogeneidade genômica (92). Essas alterações promovem diversidade celular, mas também tornam as HCT-116 sensíveis a certos tipos de estresse genotóxico, especialmente os que causam lesões incompatíveis com a deficiência em MMR (59).

A combinação da mutação num gene *TP53*, mutação G13D no gene *KRAS* e mutação parcialmente funcional no gene *APC*, decorrentes da falha do sistema MMR, tornam o

perfil genético da linhagem celular HCT116 bem definido e útil para o estudo da interação entre vias de sinalização, proliferação, mutações pontuais e reparo do DNA (93).

1.2.4. Comparação entre as linhagens celulares: SW620 e HCT-116

Fazendo uma análise comparativa resumida entre as células HCT-116 e SW620, ambas diferem em sua origem, características morfológicas, genéticas e epigenéticas. A **Tabela 1** mostra um resumo sobre as principais diferenças entre a HCT-116 e SW620 usados como modelos de estudo do câncer colorretal. Esta compreensão comparativa das linhagens celulares HCT-116 e SW620 enriquece o conjunto de ferramentas disponível aos pesquisadores permitindo investigações mais detalhadas sobre a natureza multifacetada do câncer colorretal.

Tabela 1. Resumo comparativo das linhagens celulares SW620 e HCT-116 quanto às suas características morfológicas, genéticas e funcionais

Linhagem celular		
Características	SW620	HCT-116
Origem	Tumor metastático	Tumor primário
Morfologia	Epitelial, aderente, irregular, mais diferenciada e menos coesa	Epitelial, aderente, organizada, menos diferenciada e mais coesa
Crescimento/proliferação	Moderado a alto	Alto
Tipo de instabilidade genômica	Instabilidade cromossômica (CIN)	Instabilidade cromossômica
Sistema de reparo MMR	Proficiente	Deficiente
Gene MLH1	Funcional	Silenciado por metilação
Mutação em TP53	Mutado	Presente e funcional
Mutações em KRAS	Presente (geralmente G12V)	Presente (G13D)
Mutação no gene APC	Mutado	Parcialmente funcional
Agressividade tumoral	Alta e metastático	Baixo a moderado

Resposta a quimioterapia	Menor sensibilidade (resistentes a alguns fármacos, como o 5-fluorouracil)	Sensível a drogas que afetam o sistema MMR ou mutações em KRAS
Relevância	Estudo de metástase, resistência e sinalização celular	Estudo de MSI, resposta imune, reparo de DNA e mutações pontuais

1.3. Câncer de mama

1.3.1. Anatomia da mama

As mamas humanas são glândulas mamárias localizadas na parte anterior da parede torácica sobre o músculo peitoral maior, se estendendo superiormente, cada mama, à segunda costela e lateralmente à linha axilar média (99) (**Figura 10**).

A anatomia e função da mama variam entre os homens e mulheres, sendo mais proeminentes e funcional nas mulheres após o início da puberdade e apenas rudimentares nos homens (100). No entanto, para ambos, a mama possui ligamentos idênticos que ancoram à fáscia muscular subjacente. As mamas femininas são formadas por células produtoras de leite dispostas em múltiplos lóbulos, e por estroma que inclui tecido glandular, conjuntivo e adiposo (**Figura 10**) (101). Tais lóbulos, estruturas acinares que se desenvolvem no órgão excretor do leite materno, são caracterizados por possuírem ductos lactíferos e tecido glandular que auxiliam na amamentação e outras secreções que saem no mamilo, denominadas unidades lobulares do ducto terminal (102).

O formato e o tamanho das mamas dependem muito de fatores raciais, genéticos e dietéticos, idade, paridade, estado menopausal e controle hormonal do indivíduo. Nesta compreensão, a influência destes fatores, a fisionomia e a proliferação descontrolada e alterações no epitélio mamário humano pode desencadear patologias severas, como por exemplo: o câncer de mama, mastite, fibroadenoma, ginecomastia (comum em homens), entre outras (103).

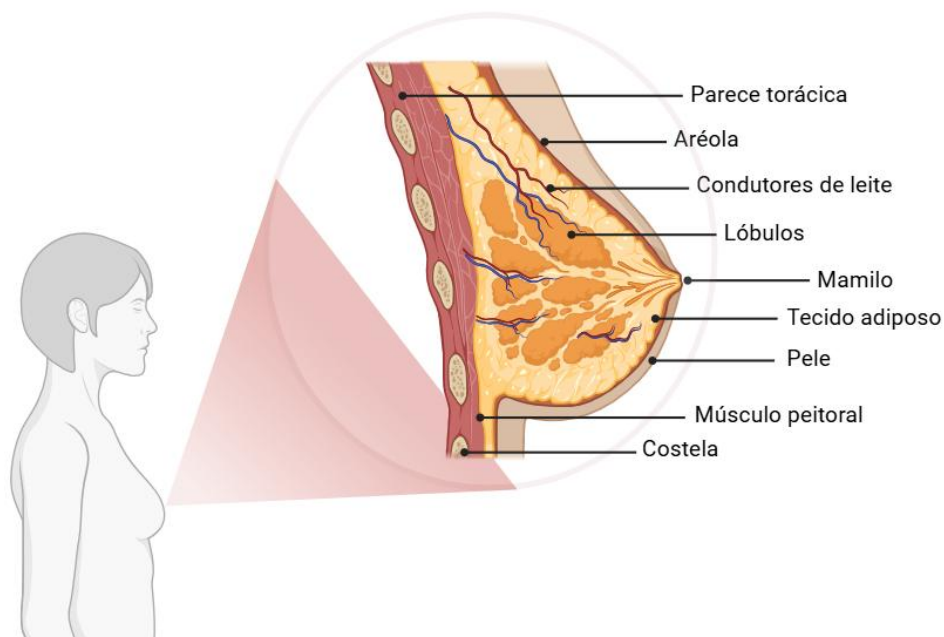


Figura 10. Esquema representativo da anatomia da mama normal feminina. Fonte: Criada pela autora (Biorender; <https://app.biorender.com>).

1.3.2. Epidemiologia, fatores de risco, subtipos moleculares e tratamento do câncer de mama

Segundo dados publicados pela GLOBOCAN em 2022, o câncer de mama é o mais frequentemente diagnosticado entre as mulheres em quase 157 países de diferentes continentes. Outrossim, é responsável por cerca de 2,3 milhões de novos casos anualmente e 666.103 (6.8%) mortes a nível mundial para ambos os sexos (104) (**Figura 11**).

A carga do câncer de mama (CM) provavelmente aumentará, entre os países, nos próximos anos devido ao crescimento e envelhecimento populacional, independentemente do nível da renda. Os países com IDH elevado como Austrália, Europa Ocidental, Norte da Europa e América do Norte têm registrado maior taxa de incidência de aproximadamente 85% em comparação com países com IDH médio e baixo que incluem a África Ocidental, Melanésia, Polinésia e Caribe (105,106). Embora as taxas de incidência tenham sido as mais altas nas regiões desenvolvidas, os países da África Subariana e países Asiáticos compartilham 65% da taxa de mortalidade registrada, devido à apresentação e estágio tardio no momento do diagnóstico e acesso limitado ao tratamento e assistência médica (107).

Na América latina, especificamente no Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o CM é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, com taxas mais altas nas regiões Sul e Sudeste. Para cada ano do triênio 2023-2025 foram estimados 73.610 casos novos, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 41,89 casos e 11,71 obtidos por 100.000 mulheres (29).

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022
Breast

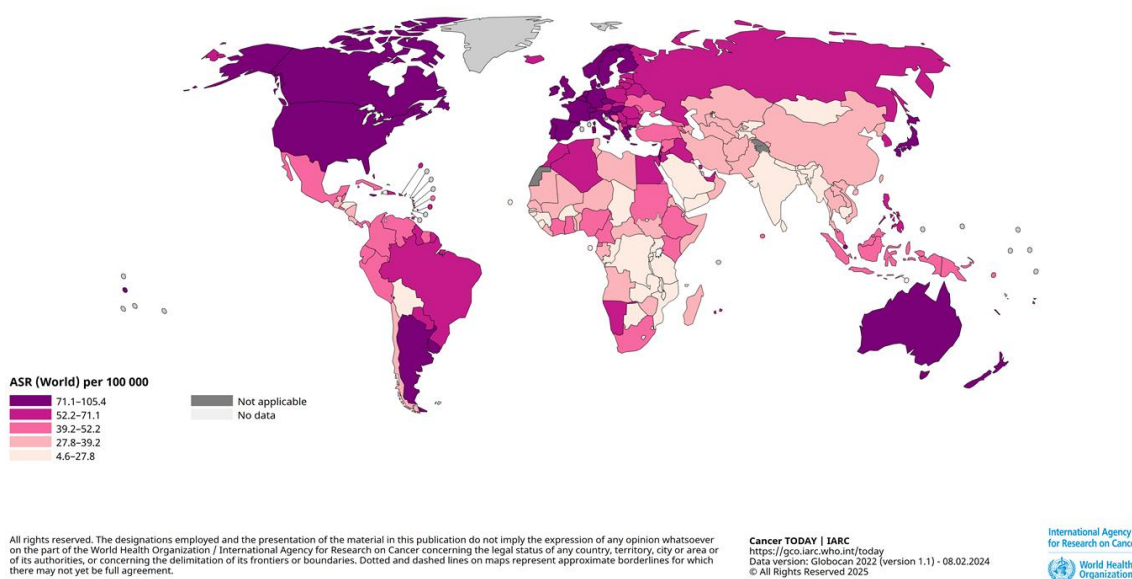


Figura 11. Representação espacial das taxas de incidência de câncer de mama, ajustadas por idade e população mundial para ambos os sexos. Fonte: GLOBOCAN (2022) <https://gco.iarc.fr/>.

A maioria dos cânceres de mama começa nas células que revestem os ductos, em alguns casos nas células que revestem os lobos, e pouca probabilidade de iniciar em outros tecidos devido à sua grande concentração de gordura e nervos. No entanto, quando inicia ocorre uma multiplicação de células cancerígenas formando a metástase, correspondente ao estágio IV do câncer (108) (**Figura 12**).

O câncer de mama pode se desenvolver em ambos os sexos. Nos homens, estima-se que a incidência represente apenas 1% de todos os casos da doença (29). Entretanto, é mais comum e heterogêneo em mulheres no mundo todo, onde a sua incidência aumenta com a idade e ocorre a partir dos 50 anos de idade (109), diferindo

significativamente entre diferentes pacientes (heterogeneidade intratumoral) e dentro de cada tumor individual (heterogeneidade intratumoral) (1).

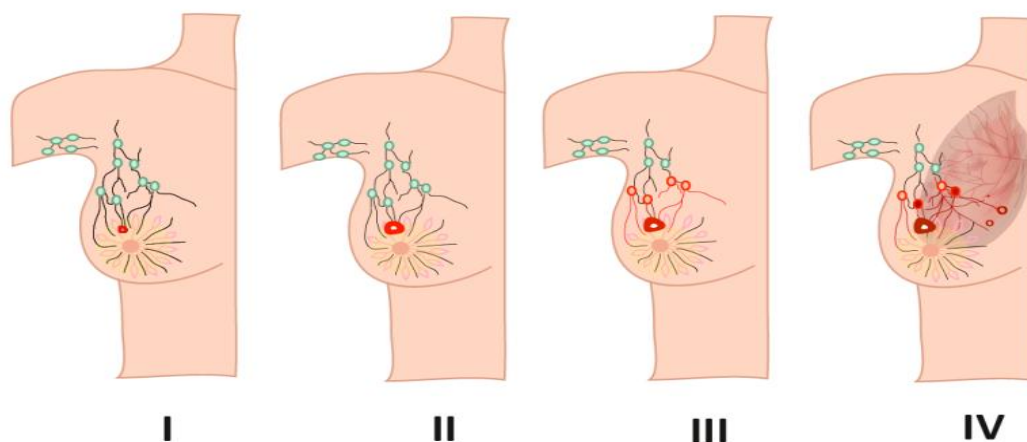


Figura 12. Estágios da formação do câncer de mama. Fonte: Retirado do livro de Patologia Básica Robbins, 9º ed, 2013.

Tal como o câncer colorretal, o câncer de mama é multifatorial, sendo significativamente influenciado pelos fatores de risco modificáveis e não modificáveis, assim como a disponibilidade e utilidade da mamografia. Dentre estes, a predisposição genética, estilo de vida e fatores ambientais são considerados os mais prevalentes (110).

A predisposição genética ou histórico familiar constituem um fator de risco importante para o aumento do CM, sendo que aproximadamente 20% dos casos são hereditários (111). Nesse caso, a predisposição genética inclui mutação em dois genes supressores de tumor importantes caracterizados por apresentarem alta penetrância, gene 1 do câncer de mama - *BRCA1* (do inglês: *Breast Cancer gene 1*) localizado no cromossomo 17 do braço 21-17q21 e o gene 2 do câncer de mama - *BRCA2* (do inglês: *Breast Cancer gene 2*) localizado no cromossomo 13 do braço 13-13q13 (112). Ambos os genes, codificam proteínas envolvidas no sistema de reparo de DNA por meio de recombinação homóloga de quebras de DNA de fita dupla.

As mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estão associadas a desenvolver câncer de mama ao longo da vida, sendo 72% e 69%, respectivamente. No entanto, o risco de câncer de mama em homens é de apenas 6% advindo de mutações em *BRCA2* (113). Estas mutações podem ser herdadas, tanto por homens como por mulheres, através de uma herança autossômica dominante, em que os descendentes podem herdar a mutação genética proveniente de seus progenitores (114). Geralmente, os tumores com mutação

BRCA1 são mais agressivos, sendo caracterizados como cânceres metastáticos esporádicos. Por outro lado os tumores com mutação *BRCA2* têm expressão positiva para receptor de estrogênio (ER, do inglês: *Estrogen receptor*) do subtipo luminal B (115).

Estudos oferecem explicações de que a gravidez precoce, amamentação e altos níveis de estrogênio endógeno durante este período reduzem o risco de CM devido a sensibilidade alterada da glândula mamária a exposições hormonais posteriores (116,117). Com isso, evitar o uso de cosméticos e alimentos que contenham ou aumentem o nível de estrogênio exógeno no nosso organismo, em combinação com uma alimentação equilibrada e a prática regular de exercícios físicos, são formas eficazes para reduzir o impacto dos hormônios do nosso corpo (118).

O CM invasivo pode ser dividido em subtipos moleculares intrínsecos com base nos níveis de expressão gênica de RNA mensageiro (mRNA), estimulados com os níveis de estrogênio, visto que, exerce seus efeitos na divisão das células epiteliais humanas que expressam o receptor deste hormônio (114). Os subtipos moleculares incluem: câncer de mama Luminal A, Luminal B, enriquecido com receptor 2 do crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês: *human epidermal growth factor receptor 2*) e câncer tipo basal ou triplo negativo (117).

Para o rastreio do CM, é feita uma triagem populacional usando biópsia de tecidos e exames de imagem, principalmente mamografia, como uma estratégia de prevenção para detecção da doença em um estágio inicial e permitir um tratamento eficaz (119).

O tratamento para CM abrange a quimioterapia neoadjuvante, administrada antes da cirurgia, para aqueles pacientes de estágio intermediário (receptor hormonal positivo-RH⁺, HER2⁻ e avançado (103). Por outro lado, caso o resultado cirúrgico ou os biomarcadores prognósticos (como por exemplo: ER, HR⁺ e HER2) indicarem risco de recorrência do tumor, é administrada a quimioterapia adjuvante logo após a cirurgia (120). Na clínica atual, o tratamento quimioterápico para CM inclui a administração simultânea da combinação de 2 ou 3 medicamentos, nomeadamente: ciclofosfamida, cisplatina, carboplatina, 5-fluorouracil/capecitabina, pertuzumab, os taxanos (docetaxel e paclitaxel) e antraciclinas (doxorrubicina e epirrubicina) (121). No entanto, a escolha do medicamento adequado deve ser tomada em consideração devido aos diferentes subtipos moleculares de CM que podem responder de formas diferentes à quimioterapia pré- e pós-cirurgia (122).

Assim, ao entendimento das diferenças entre os subtipos moleculares envolvendo diferentes modelos de linhagens celulares, se torna cada vez mais urgente no tratamento do câncer de mama, devido ao fato de que as células do câncer de mama podem subsequentemente sobreviver e ganhar resistência após quimioterapia inicialmente eficaz (123). A seguir descreveremos as características da linhagem celular MCF-7, positiva para receptor de estrogênio e progesterona.

1.3.3. Linhagem celular MCF-7

A linhagem celular MCF-7 (do inglês: *Michigan Cancer Foundation-7*) (**Figura 13**) é derivada de um derrame pleural de uma paciente com câncer de mama metastático, cuja doença responde à terapia hormonal. A paciente de 69 anos havia sido submetida a uma mastectomia da mama direita para um tumor benigno e a uma mastectomia radical da mama esquerda para um adenocarcinoma maligno, 7 e 3 anos, respectivamente, antes do início da cultura primária de células (124).

As células MCF-7 possuem quantidades substanciais positivas para receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR⁺), mas fator de crescimento epidérmico humano receptor 2 negativo (HER2⁻) (125). O receptor de estrogênio (ER) desempenha um papel determinante e essencial na proliferação e diferenciação do tecido mamário normal e está ligado ao desenvolvimento do câncer de mama, promovendo assim uma rápida propagação (126).

Um estudo realizado por Li e colaboradores, sobre as características clínicas e a sobrevida de pacientes com câncer de mama com receptor hormonal único positivo demonstrou que aproximadamente 80% dos carcinomas de mama invasivos são caracterizados por apresentarem expressão de ER aumentada (127). Entretanto, o PR é altamente expresso em pacientes com ER⁺, portanto, uma maior expressão de PR está positivamente associada à sobrevida global, em caso de recorrência ou falha do tratamento, enquanto níveis baixos de PR geralmente estão relacionados a um estado mais agressivos da doença, bem como uma recorrência e prognóstico mais precário (128).

Quanto às características morfológicas (**Figura 13**), são células epiteliais e aderentes à superfície de cultivo com formato pavimentoso ou poligonal; tem um crescimento moderado em monocamada (2D) formando agrupamentos celulares coesivos. Quando cultivadas *in vitro*, podem formar acúmulos de domo (elevação da célula) em condições de alta confluência, sugerindo uma função secretora ativa (125).

Apresentam um citoplasma abundante e levemente granular, um núcleo grande e redondo, com nucléolo evidente, consideradas características comuns em células tumorais. É um sistema modelo proeminente usado em condições padrão de laboratório para estudar o câncer de mama e o mecanismo pelo qual as drogas anticancerígenas atual, além da suscetibilidade das células à apoptose (129).

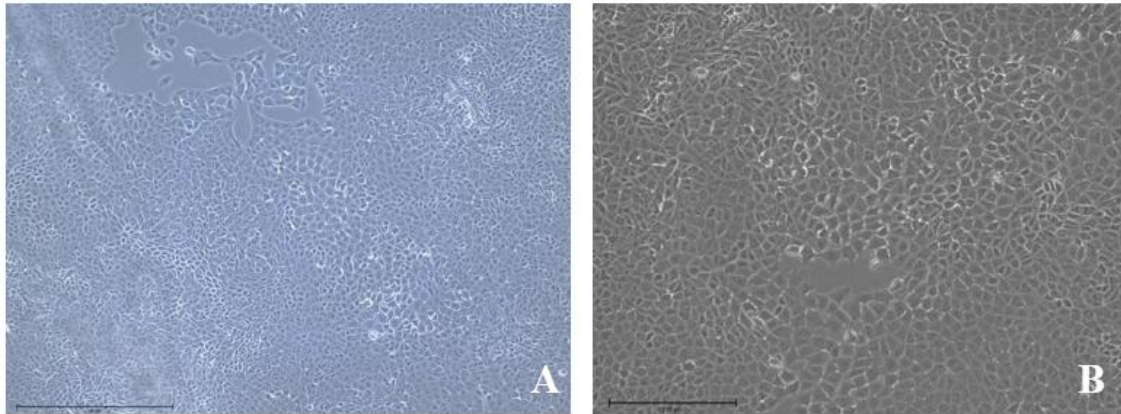


Figura 13. Morfologia da linhagem celular de mama MCF-7 observada por microscopia óptica. Imagens capturadas com objetivas de 10× (A) e 20x (B) (500 μm), utilizando o sistema EVOS. Barra de escala: 500 μm . As imagens evidenciam as características morfológicas típicas da linhagem.

Os cânceres de mama metastáticos são geralmente mais difíceis de tratar, pois são multirresistentes ou tem pouca ou nenhuma expressão de receptores de estrogênio, receptor de progesterona e falta de superexpressão de fator de crescimento epidérmico humano, os quais constituem os principais alvos de droga contra o câncer de mama, além de serem usados como diagnóstico para identificar os diversos tipos e estadiamentos da doença (130).

Quando os cânceres de mama não possuem todos esses três receptores, eles são conhecidos como câncer de mama triplo negativo. Atualmente, existem poucos tratamentos eficazes para cânceres de mama metastáticos e, apesar do tratamento, as células do câncer de mama geralmente continuam a proliferar e a ganhar resistência à maioria das quimioterapias disponíveis, que se tornam ineficazes (131). Assim, a pesquisa de novas terapias de câncer de mama metastático é imperativa.

1.4. Tratamento do câncer: Quimioterapia

Os quimioterápicos, também conhecidos como drogas citotóxicas, têm sido usados na terapia antitumoral desde a década de 1940 (85). Estes podem ser administrados de diversas formas, nomeadamente: a via oral, subcutânea, intravenosa, intramuscular ou intratecal, podendo ser metabolizada e excretada pelo fígado e rins, respectivamente (132).

Tanto os quimioterápicos tradicionais assim como convencionais atuam na inibição da proliferação e função das células neoplásicas, interferindo na síntese de DNA, RNA (ácido ribonucleico) ou proteínas, inibindo a replicação ou induzindo a morte celular (132). Na área clínica, mais de 100 quimioterápicos são utilizados atualmente, tornando-os um grupo de medicamentos heterogêneos tanto na composição química quanto na sua formulação, capazes de abrandar ou inibir os processos vitais de uma célula tumoral e seletividade considerável as células normais (133). Entre os quimioterápicos anticâncer clinicamente aprovados, os agentes de platina, ainda são considerados os mais proeminentes para o tratamento de diferentes tipos de câncer (111).

Os quimioterápicos podem ser classificados de acordo com estrutura química, função celular e o mecanismo de ação, além da sua eficácia em diferentes tipos de câncer (85). Quanto à função celular, eles podem apresentar uma especificidade em relação ao ciclo celular em que atuam em uma determinada fase da divisão celular. A **Tabela 2**, mostra a classificação dos principais quimioterápicos usados no tratamento de diversos tipos de câncer.

Embora esses agentes antineoplásicos sejam amplamente utilizados na prática clínica, a descoberta do efeito inibitório da platina sobre o crescimento de células tumorais representou um avanço significativo no desenvolvimento de quimioterápicos para diversos tipos de câncer, especialmente os de mama e colorretal (134). Entre esses compostos, a cisplatina e seus derivados de segunda geração (carboplatina) e de terceira geração (oxaliplatina) são utilizados mundialmente em aplicações clínicas e vários outros análogos da platina (lobaplatina, nedaplatina e heptaplatina) são aprovados em vários países ainda são os agentes antitumorais mais eficazes usados na clínica para aplicações terapêuticas (135) (**Figura 14**).

Tabela 2. Classificação dos quimioterápicos quanto à estrutura química, exemplos e mecanismo de ação.

Classe do quimioterápico	Exemplo	Mecanismo de ação
Agentes alquilantes (R-CH ₂ ⁺)	Cisplatina, etilenodiamina, carboplatina	Inibem a replicação e transcrição do DNA de proteínas
Agentes antimetabólitos	Análogos da purina e análogos da pirimidina (5-fluorouracil, citosina-arabinosídeo).	Inibem a multiplicação e processos celulares de células cancerígenas
Antibióticos antitumorais	Antraciclinas (doxorubicina, daunoblastina, epirrubicina, idarrubicina)	Afetam mais de uma via celular nas células cancerígena através da indução de apoptose, inibição da topoisomerase-II e geração de radicais livres
Inibidores de mitose	Taxanos e alcalóides da vinca	Afetam diretamente as estruturas de divisão celular, impedindo a multiplicação das células cancerígenas
Inibidores da Topoisomerase-II	Irinotecano e etoposídeo	Interferem na atividade enzimática das topoisomerasas, impedindo o desenrolamento do DNA durante a replicação celular

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Apesar do uso destes agentes antineoplásicos na prática clínica atual, a descoberta do efeito inibitório da platina no crescimento de células tumorais também teve um avanço marcante no que concerne ao estudo e aplicação de medicamentos quimioterápicos para o tratamento de diferentes tipos de câncer, principalmente no de mama e colorretal (134). Entre esses compostos, a cisplatina e seus derivados de

segunda geração (carboplatina) e de terceira geração (oxaliplatina) são utilizados mundialmente em aplicações clínicas e vários outros análogos da platina (lobaplatina, nedaplatina e heptaplatina) são aprovados em vários países. Adicionalmente, são os agentes antitumorais mais eficazes usados na clínica para aplicações terapêuticas (135) (**Figura 14**).

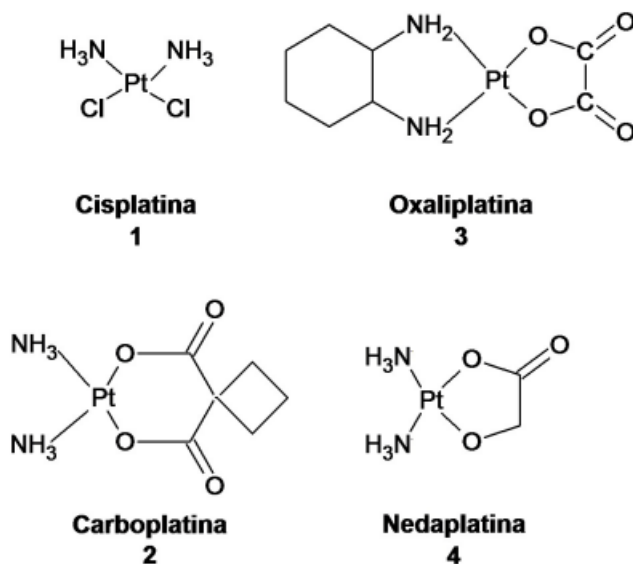


Figura 14. Estrutura química dos fármacos de platina aprovados para uso clínico. Fonte: Adaptado de Qi *et al.*, (2023).

O uso clínico de medicamentos à base de platina não é seletivo para as células cancerígenas, porque as células normais também são afetadas, além de apresentarem diminuição da imunidade, hemorragia, distúrbios gastrointestinais, resistência sistêmica das células cancerígenas, baixa seletividade e a toxicidade às células normais, relacionada com a dose, continuam sendo as duas limitações/desafios mais significativas na quimioterapia do câncer (136). Estes dois últimos fenômenos ocorrem quando as células se tornam tolerantes aos tratamentos farmacêuticos. A cisplatina é considerada uma toxina para as células, pois quando é hidrolisada, liga-se ao DNA levando à toxicidade celular. A cisplatina acumula-se principalmente nos rins, mais do que em outro tecido ou órgão, causando sérios problemas, o que explica a sua alta susceptibilidade e toxicidade para os rins (137). Mas, o princípio de ação da cisplatina direcionado ao DNA, também condicionou o desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos à base de cobre (138).

Considerando esses efeitos tóxicos causados pelos medicamentos quimioterápicos à base de platina, novas abordagens como a coordenação de compostos

químicos com outros íons metálicos e outras ferramentas tecnológicas, como *software* avançado e plataformas robóticas têm sido usadas para acelerar o diagnóstico e o tratamento, promovendo a sobrevida livre de doença dos pacientes posteriormente. Na seção subsequente, revisamos compreensivamente o progresso recente feito sobre a importância do Cobre na biologia do câncer e o desenvolvimento da coordenação favorável de compostos químicos com centro de Cu(II), que envolve inúmeras propriedades químicas, físicas, biológicas e funcionais para emergir no tratamento do câncer (22).

1.5. Cobre e sua importância na biologia

O cobre (Cu) é o um microelemento essencial da vida, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais (139,140). Em humanos, o cobre é o terceiro oligoelemento metálico e cofator mais abundante e indispensável no organismo e para o corpo, depois do zinco (Zn) e do ferro (Fe), sendo um componente estrutural de diversas proteínas enzimáticas que participam da coagulação do sangue, formação de proteínas, na maturação hormonal e imune e no processo de produção de energia celular (141).

Diferente da maioria dos metais fisiologicamente importantes, o cobre aceita e doa elétrons com facilidade e circula entre independentemente do estado de oxidação (142). Apesar do ferro ser o metal redox ativo mais abundante do que o cobre, este participa na ativação do oxigênio para torná-lo bioquimicamente disponível para desintoxicar radicais e para estabilizar substratos dentro de seus locais de ligação (143). Embora a homeostase do Cu e do Fe seja interligada nas células de mamíferos, esses metais não são intercambiáveis, pois apresentam locais de ação distintos, diferentes estados de oxidação e ambientes específicos de coordenação (144).

Os processos de metabolismo do Cu envolvem a absorção intestinal, o transporte sistêmico pelo corpo e a utilização pelas células e, no final, a sua excreção. O cobre é ingerido de diversas formas, absorvido pelo intestino delgado e distribuído para as proteínas e moléculas que o requerem. No entanto, a sua absorção no corpo humano (0,6 a 1,6 mg/dia) depende da forma química e da presença de outros componentes da dieta saudável (145).

Conforme o regulamento do Conselho de Alimentação e Nutrição (do inglês: *Food and Nutrition Board*) do Instituto de Medicina, o excesso da ingestão do cobre, hipercuprose, às necessidades diárias pode ser citotóxico (146), causando danos na função de enzimas antioxidantes, modificação das reações que resultam na produção de

espécies reativas de oxigênio (ERO) responsáveis pela peroxidação lipídica em membranas, oxidação e clivagem direta de proteínas e moléculas de DNA e RNA, ativação dos genes sensíveis à oxirredução, além da elevação da sua toxicidade deslocando outros cofatores metálicos e seus ligantes naturais (139).

Por outro lado, quando o cobre é deficiente, a hipocuprose, a absorção e o transporte do cobre são prejudicados, resultando em uma distribuição anormal e limitada do cobre no interior de cada célula, que pode influenciar no crescimento, desenvolvimento e cognição do indivíduo, além de apresentar polineuropatia grave, por exemplo, em pacientes que realizaram uma cirurgia bariátrica ou outras condições que levam a deficiência deste oligoelemento (147).

Grande parte da maquinaria celular de aquisição e transporte de Cu em mamíferos é semelhante às leveduras, as quais utilizam os membros transportadores da família da taxa de clique (Ctr, do inglês: *Click Through Rate*). O Ctr é um transportador integral de cobre extracelular na membrana plasmática. Vários estudos apontam que dentre as classificações, o Ctr1 é o principal transportador responsável pela absorção de Cu na dieta para o epitélio intestinal dos mamíferos (148). Desta forma, o cobre atravessa as membranas celulares, e é traficado de maneira intercelular por suas proteínas chaperonas de cobre, Atox 1 (Atx1 do inglês: *Antioxidant 1 copper chaperone*) e Ccs (do inglês: *Copper Chaperone for Superoxide Dismutase*), e posteriormente transportado para fora das células e incorporado em proteínas dependentes de cobre (147).

De ponto de vista químico, o cobre está presente na série de transição da primeira linha e é o 29º elemento da primeira tabela periódica de Mendeleev (141). O Cu está entre os cátions metálicos mais examinados na biologia devido ao seu papel significativo em doenças crônicas e multifatoriais e na promoção de estruturas químicas disponíveis para diversas macromoléculas (139).

A atividade redox do cobre permite-o participar de diversas reações químicas podendo aceitar ou doar elétrons. As propriedades redox únicas do cobre estão intimamente relacionadas à sua existência em forma reduzida, Cu(I), ou estado oxidado Cu(II), que impulsionam o seu papel na estrutura e no processo de catálise, além de o tornarem benéfico mas também prejudicial para as células (149). Quimicamente, o Cu(I), em sua forma reduzida, apresenta maior afinidade por grupos tiol e tioéster, podendo ser encontrados em cisteína e metionina, enquanto o Cu(II), em sua forma oxidada, exibe coordenação preferencial com grupos de oxigênio e nitrogênio imidazol

(como por exemplo as bases de Schiff, ácido glutâmico, ou histidina) interage com estruturas de proteínas regulando reações bioquímicas e exibindo efeitos tóxicos em altas concentrações (150).

A conversão iônica entre Cu(I) e Cu(II) fornece uma reação redox muito rica e potente, atuando como centro reativo para muitas reações catalíticas enzimáticas críticas para a vida (30). Considerado um metal endógeno, o cobre e os seus complexos são menos tóxicos do que os metais não endógenos como a platina. Devido ao ciclo redox, os complexos de Cu(I) são mais instáveis e menos estudados como antineoplásicos, e por outro lado, os complexos de cobre(II) tem um grande potencial anticancerígeno, além de interagir com uma ampla gama de biomoléculas (DNA e proteínas) como resultado de sua capacidade de coordenar ligantes com diferentes conformações (151).

O cobre está fortemente associado a várias vias de sinalização atuando como cofator de enzimas redox, comportamentos biológicos e maturação tumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*, devido ao acúmulo aberrante de Cu para a transformação maligna. As células tumorais requerem níveis mais elevados de Cu em comparação às células normais para atender às suas necessidades celulares incluindo as demandas de energia (152). Um dos papéis mais bem estabelecidos do Cu na oncologia é a sua participação na formação de novos vasos sanguíneos, a angiogênese, pois tumores ricos em cobre tendem a apresentar maior vascularização e, portanto, maior agressividade (153).

Dois temas unificadores em vários estudos recentes é o conceito de cuproplasia e proptose, respectivamente, definido como proliferação e morte celular regulada dependente de Cu (152,154). Este fato pode ser direcionado farmacologicamente através da sinalização do Cu por quelantes seletivos de cobre ou ativada com ionóforos metálicos que elevam os níveis de cobre no interior das células mediando a morte celular por meio da citotoxicidade induzida pelo metabolismo energético, especificamente, dependente da via mitocondrial e pelo acúmulo de ERO, ou ainda através da manipulação genética ou farmacológica de proteínas e enzimas envolvidas na homeostase do Cu (155).

Tomando como base o envolvimento do Cu na inibição da progressão do câncer, direcionar a concentração do cobre pode apresentar uma abordagem terapêutica promissora através da inibição do acúmulo de cobre e a promoção de morte celular por cobre usando ionóforos ou quelantes de cobre para o tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo, o câncer de mama (156) e câncer colorretal (157).

1.6. Bases de Schiff e Complexos de Cobre (II) na terapia anticâncer

1.6.1. Estrutura e propriedades

As moléculas heterocíclicas desempenham um papel muito importante na química orgânica de coordenação devido às suas extensas aplicações nas áreas farmacêuticas, biológicas, veterinárias e agroquímicas (158). Nesse contexto, as bases de Schiff são enquadradas, pois assumiram uma posição de liderança na química medicinal, além de serem usadas como farmacóforo no campo de síntese de medicamentos (159).

As bases de Schiff são uma classe de compostos orgânicos descobertas pelo químico alemão Hugo Schiff em 1864, definidos como azometina ou imina ($-C=N-$) (160). Estruturalmente, são análogos de nitrogênio e cetonas, caracterizadas pela presença de uma dupla ligação entre um átomo de carbono e um átomo de nitrogênio (161), atuam como ligantes eficazes na coordenação de centros metálicos (**Figura 15**) (162).

As bases de Schiff são formadas pela reação de condensação de aldeídos ou cetonas com aminas primárias $R''NH_2$ com um composto carboxílico, $RR'C=O$, podendo ser aldeído ou cetona (163). O grupo azometina ou imina tem sido identificado como um farmacóforo versátil para o *design* de compostos com sítios bioativos principais, presente em várias substâncias naturais, de origem natural e não natural (164).

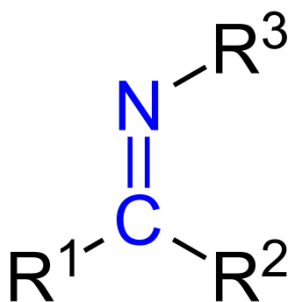


Figura 15. Estrutura química de bases de Schiff. Onde, C=N representa a dupla ligação e o R representa a cadeia orgânica. Fonte: Adaptado pela autora.

Esta classe de compostos orgânicos apresenta inúmeras propriedades e aplicações em diversas áreas. Na área industrial, as bases de Schiff são usados como pigmentos, inibidores de corrosão, materiais termoestáveis, catalisadores em diversas

reações de polimerização, redução de cloreto de tionila ou cetona e oxidação de compostos orgânicos intermediários em síntese orgânica e como estabilização de polímeros (162).

Na síntese orgânica, as reações de Bases de Schiff são úteis na formação de ligações estáveis carbono-nitrogênio. Geralmente, as bases de Schiff apresentam vários tipos de classificações, podendo ser ligantes bi, tridentados ou multidentados, a partir de aldeídos e aminas primárias, capazes de formar complexos estáveis (165) .

Na química de coordenação, um dos requisitos para quimioterápicos mais seguros, mais ativos e mais seletivos é a busca de coordenações químicas compatíveis. Neste quesito, as bases de Schiff são compostos orgânicos quelantes ideais e vitais, devido à sua estrutura flexível e estereo eletrônica (40), interatividade, a variabilidade do estado de oxidação, reatividade e afinidade com maioria dos íons metálicos de transição e não radioativos (166).

Na química medicinal, apresentam uma ampla gama de aplicações importantíssimas, incluindo: anticancerígeno (167), anti-inflamatório (168), antimicrobiano (169), antioxidante (170), antiviral (171), imitadora e inibidora de ocitocina, bem como sua proximidade com proteínas naturais (172). Nasir e colaboradores sintetizaram e caracterizaram um novo composto base de Schiff. Os seus experimentos *in vitro* revelaram atividade antitumoral para linhagens de câncer colorretal e demonstraram que o composto exibiu um grau significativo de ação inibitória e clivagem da dupla fita de DNA das células tumorais (173). A atividade anticancerígena das bases de Schiff também foi inferida em um estudo *in vitro* realizado por um grupo de pesquisadores que demonstrou que estes compostos apresentaram ação citotóxica proeminente em linhagens celulares de pele humano e câncer de mama humano (MCF-7) quando comparado a atividade da cisplatina (174).

Ademais, o que torna os compostos inorgânicos coordenados com bases de Schiff particularmente interessantes para o organismo, são as propriedades que podem ser modificadas para melhorar o efeito terapêutico, especialmente a biodisponibilidade e a biodistribuição sistêmica (175).

1.7. Complexos bimetálicos de Cu(II) derivados de bases de Schiff na terapia anticâncer

A coordenação de íons Cu(II) com as bases de Schiff ocorre através do processo de quelação, caracterizado pela interação química formada por ligações covalentes, na qual os ligantes doam pares de elétrons a metais de transição, formando ligações coordenadas estáveis com íons metálicos (176). Nos complexos metálicos, as bases de Schiff funcionam como ligantes (amina, aminas, fósforos) contendo doadores de dois elétrons que não sofrem mudanças eletrônicas em suas camadas de valência (163).

A interação desses ligantes doadores e íons metálicos dá origem a complexos de diferentes geometrias e o levantamento da literatura revela que esses complexos são compostos biologicamente ativos. A presença de um par isolado de elétrons dos átomos de nitrogênio hibridizado no grupo azometina é crítico para suas atividades químicas e biológicas que os tornam candidatos viáveis para as propriedades anticancerígenas das bases de Schiff e seus complexos metálicos, ajustando a atividade antiproliferativa de células cancerígenas (177).

Outrossim, os complexos de Cu(II) contendo base de bases de Schiff estão entre os complexos mais investigados na química medicinal e farmacêutica como modelo e direcionamento de drogas citotóxicas (178), por serem endogenamente biocompatíveis e mais potentes que a cisplatina e seus análogos, pois, têm o potencial de contornar os desafios e limitações anteriormente descritos (138), exibindo diferentes modos específicos de ação, efeitos indesejáveis reduzidos e a capacidade de superar os mecanismos de resistência aos medicamentos, além da decorrência de maior mortalidade e hospitalizações de pacientes portadores de câncer (179).

Assim como as bases de Schiff, os complexos de Cu(II) contendo essa classe de ligantes, também têm recebido atenção devido às suas potenciais aplicações biomédicas, incluindo atividades citotóxicas e antitumorais, antibacterianas, antioxidantes e anti-inflamatório, antiviral, anti inflamatórias e antifúngicas (178–183).

O potencial de inibição dos complexos de Cu(II) é muito maior em relação aos seus ligantes devido à quelação ou ionóforos de cobre, e o compartilhamento de carga positiva entre metais e ligantes, aumentando a natureza lipofílica do complexo. Portanto, estes fatores aumentam a penetração dos complexos metálicos através da membrana lipídica da parede celular por difusão simples, rompendo-as, bloqueando os sítios de ligação de metais da enzima e interrompendo o crescimento das células (174).

Uma infinidade de relatórios descreveram que diversas atividades anticancerígenas dos complexos de cobre(II) derivados de base de Schiff foram investigadas usando uma variedade de linhagens celulares tumorais humanas, incluindo células de carcinoma hepático humano (Hep-G2) (60,61), mama humana MCF-7 (21,62) e câncer de mama triplo negativo (27), linhagem celulares de câncer de ovário SKOV-3 (9), célula de câncer de próstata PC3 (9,49,63), células de câncer cervical HeLa (9,49), linhagem celular de câncer de cólon e reto humano HCT-116 (64), SW620 (37) e SW480 (173).

Embora os estudos pré-clínicos acima mencionados tenham demonstrado efeitos antitumorais com evidências científicas, vários desafios permanecem em tradução clínica (177). Além disso, complexos de Cu(II) derivados de base de Schiff constituem uma fonte importante de novos agentes que podem exercer suas funções biológicas por meio de vários mecanismos, como fragmentação do DNA (quebra simples e dupla de DNA), apoptose celular, inibição da polimerização de tubulina, parada induzida do ciclo celular, estresse oxidativo e interrupção da migração celular (184). No próximo capítulo abordaremos os principais mecanismos de ação antitumoral destes complexos.

1.8. Mecanismo de ação antitumoral de bases de Schiff e seus respectivos complexos de Cu(II)

Na biologia do câncer, o cobre está dentre os elementos mais usados como agente antitumoral ao inibir a progressão do câncer por meio de várias vias (36). No entanto, o entendimento do mecanismo de ação dos complexos de Cu(II) ainda é extremamente questionável, principalmente quando se trata de complexos bimetálicos de Cu(II).

Os quimioterápicos podem afetar a estrutura química do DNA, inibir a síntese de ácido nucleico, atuar na transcrição e replicação de DNA e interferir na síntese de tubulina mitótica (23). Neste ângulo, os complexos de cobre(II) já foram estudados como grupos com a capacidade de interferir no ciclo celular de células tumorais e induzir a clivagem do DNA mediada por metal para a produção de espécies reativas de oxigênio e morte celular.

Compreender os mecanismos de ação antitumoral exercidos pelos complexos de Cu(II) derivados de bases de Schiff permite a elucidação de suas interações moleculares

com alvos celulares específicos, como o DNA e proteínas reguladoras da apoptose, além de contribuir para o desenvolvimento racional de novos agentes quimioterápicos com maior seletividade e eficácia.

1.8.1. Interação com o DNA

O DNA é considerado um dos principais, senão o principal, alvo farmacológico atualmente usado na oncologia. Portanto, para que um composto seja considerado candidato a agente terapêutico, ele deve atingir os componentes e a vizinhança da dupla hélice e interagir com a molécula do ácido nucleico (185). Dado à sua rica estrutura e fácil interação com uma variedade de íons metálicos, os complexos de Cu(II) têm grande capacidade de modificar a estrutura do ligante complexado, conferindo uma melhor afinidade, estabilidade e especificidade com o DNA (186).

Os complexos de Cu(II) interagem com o DNA através de interação/ ligação covalente (direta), geralmente irreversível, do complexo com as bases nitrogenadas; ou a partir da interação não covalente, reversível, que se dá através da intercalação entre pares de bases do DNA com ligação ao sulco maior ou menor do DNA e interações eletrostáticas que ocorre com o grupo fosfato do DNA (187). Estas interações ocorrem facilmente, pois os íons metálicos que são carregados positivamente, em solução aquosa, ligam-se a moléculas carregadas negativamente, permitindo que proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA) sejam excelentes alvos (186).

Por esta razão, a escolha de ligantes orgânicos menos lábeis e planares com sistemas ricos em elétrons, como as bases de Schiff, é bastante importante. Os ligantes podem influenciar na seletividade das interações entre o composto inorgânico e o DNA, especialmente, se forem de grande volume e capazes de estabelecer ligações de hidrogênio, permitindo uma intercalação complexo-DNA. Neste caso, os complexos de Cu(II) com bases de Schiff (intercalador) interagem causando danos diretos no DNA, como: quebras de fita simples ou dupla, pontes de intracadeias e intercadeias (crosslinks), adutos DNA-metal (ligações covalentes com bases nitrogenadas, como guanina), inibição da replicação e transcrição, mutagênese, indução da morte celular e ativação do reparo do DNA (188). Este efeito também pode ser observado e avaliado em experimentos *in vitro* usando diferentes modelos de linhagens celulares, resultando em respostas com efeitos citotóxicos (viabilidade celular), genotóxicos (danos ao DNA), produção de ERO (estresse oxidativo) e ativação da morte celular por apoptose (189).

A resposta ao dano no DNA influencia tanto a eficácia quanto a toxicidade da terapia genotóxica, sendo determinada não apenas pelos mecanismos de reparo, mas também por outras funções celulares que contribuem para a restauração das lesões. Os sistemas de reparo do dano ao DNA (DDR, do inglês: *Damage DNA Repair*), incluem: Reparo por excisão de bases (BER, do inglês: *Base Excision Repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês: *Nucleotide Excision Repair*), reparo de erros de pareamento (MMR, do inglês: *Mismatch Repair*), reparo de quebras de fita dupla (DSB, do inglês: *Double Strand Break Repair*), recombinação homóloga (HR, do inglês: *Homologous Recombination*) e reparo por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês: *Non-Homologous End Joining*) (190).

Quando o sistema de reparo não é ativado de imediato, existem chances de desencadear resistência ao tratamento e recorrência do tumor, principalmente os metastáticos. Pacientes com DDR prejudicada são mais sensíveis a agentes genotóxicos (como os quimioterápicos) porque as células tumorais têm dificuldades de reparar os danos, enquanto pacientes com DDR de linha germinativa defeituosa, ou seja herdado, tem a toxicidade aumentada do tecido normal da terapia genotóxica, porque não só as células tumorais, mas também as células normais do corpo não conseguem efetivar a reparação do DNA de forma impecável, o que causa mais efeitos colaterais (191). Os mecanismos de sistema de reparo só entram em ação em momentos específicos ou não do ciclo celular, para que não ocorra a replicação do DNA danificado e gere uma mutação (192). Entretanto, o entendimento da biologia da DDR através de vários ensaios genotóxicos proporciona a oportunidade de desenvolver novos medicamentos que podem ser usados para ultrapassar os efeitos genotóxicos em células normais e aumentar a eficácia das terapias genotóxicas.

1.8.2. Inibição de enzimas-chave

Os complexos de Cu(II) derivados de bases de Schiff também podem atuar como inibidores de enzimas celulares denominadas topoisomerasas ou metaloproteinases. As topoisomerasas (TOPO) são enzimas essenciais para a manutenção da estrutura da cromatina e no relaxamento do estresse gerado pela torção do DNA durante a transcrição, replicação e divisão celular (193).

A atividade do TOPO aumenta especialmente em células cancerígenas que se dividem rapidamente. Eles estão envolvidos em muitos processos biológicos celulares importantes, incluindo replicação, transcrição, recombinação e condensação

cromossômica do DNA (194). Essas enzimas se ligam covalentemente a grupos de fósforo do DNA, fazendo com que as fitas de DNA se dividam e finalmente se recombinam. Dependendo do número de fitas de DNA cortadas, o TOPO pode ser classificado nos tipos I e II (195). Recentemente, a topoisomerase 1 (Top 1) e a topoisomerase (Top 2) têm sido utilizadas como alvos principais na quimioterapia de muitos tipos de câncer, uma vez que podem criar cortes transitórios de DNA único e produzir quebras transitórias de DNA de fita dupla, respectivamente, além de induzir a morte celular através da catástrofe mitótica, indução da apoptose e indução de mutações (150).

Na terapia do câncer, muitos quimioterápicos com potencial anticâncer atuam como inibidores do veneno TOPO, incluindo etoposídeo, doxorubicina e mitoxantrona, que prendem complexos covalentes de TOPOs humanos. Ao interagir com essas enzimas, os complexos de Cu(II) podem inibir a religação do DNA após o corte enzimático, levando à formação de quebras de fita dupla e, conseqüentemente, à ativação de vias apoptóticas (194). Essa inibição seletiva das topoisomerasas representa um dos mecanismos pelos quais os complexos metálicos exercem sua atividade antitumoral, sendo uma estratégia promissora para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos mais eficazes (191).

1.8.3. Indução de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Embora o mecanismo pelo qual os complexos de Cu(II) derivados base de Schiff exercem a sua atividade anticancerígena difere de várias questões, acredita-se que eles se liguem diretamente a diferentes moléculas alvo no interior da célula, por meio da participação e sinalização das proteínas reguladoras. Ainda, uma vez que o cobre apresenta a facilidade de alterar o seu estado de oxidação, de Cu(I) e Cu(II) (196), participam na química redox, que produz radicais livres danificando irreversivelmente o DNA e RNA, as proteínas e outras macromoléculas biológicas das células cancerígenas por meio de reações de oxidação (197).

A ativação de vias de estresse oxidativas também é considerada um mecanismo de ação dos complexos de cobre, devido à perturbação da bio-homeostase e proliferação das células cancerígenas, com base nos mecanismos semelhantes a Fenton (198). As ERO, produzidas nas mitocôndrias, retículo endoplasmático ou peroxissomos, são moléculas nocivas derivadas de oxigênio e produzidas naturalmente pelo organismo durante a reação de oxidação e processos celulares. As ERO incluem: íon superóxido

($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e oxigênio singleto (1O_2) (199).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre as ERO e os agentes antioxidantes, contribuindo para ativação de diversas vias de sinalização que convergem com a patogênese do câncer. O estresse oxidativo pode ser causado sob influência de vários fatores, como: ambiente, radiação ultravioleta, reperfusão, quimioterápicos e inflamação, ocasionando danos às proteínas, lipídeos e DNA. Desta forma, um equilíbrio entre a abundância de ERO nas células tumorais e sistemas antioxidantes é crucial para evitar o estresse oxidativo (200).

Neste contexto, o cobre é um elemento essencial com eficácia terapêutica, capaz de aliviar o DNA, eliminar radicais livres, induzir a apoptose e regular a função mitocondrial. O excesso de cobre na célula gera um grande acúmulo de ERO em um curto ou longo tempo para, posteriormente, produzir citotoxicidade e desencadear a apoptose celular (201).

Além disso, a presença do cobre pode levar à conversão do peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila, os quais são considerados mais ativos e destruidores de organelas celulares, como membrana celular e mitocôndrias. No entanto, em comparação com as células normais, a produção de ERO nas células é maior, pois mantém um sistema antioxidante melhorado (202). Por outro lado, as EROs também provocam morte celular programada em células normais, o que já torna a compreensão deste mecanismo interessante para estudar.

Um estudo sobre estresse oxidativo no metabolismo de células cancerígenas indicou que altos níveis de proteínas como glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR), superóxido dismutase (SODs), tioredoxina e catalase (CAT), que neutralizam espécies reativas de oxigênio (EROs) ou regeneram antioxidantes em suas formas reduzidas, estão correlacionados com a agressividade tumoral e a resistência à quimioterapia (201).

As enzimas SODs, GR, GPX e CAT são mecanismos de defesa que as células desenvolveram para neutralizar radicais livres e minimizar os danos oxidativos. Embora os radicais livres sejam altamente instáveis e tendam a se decompor espontaneamente, sistemas enzimáticos e não enzimáticos atuam de forma coordenada para inativar esses compostos reativos. Entretanto, a produção excessiva ou a eliminação insuficiente de ERO resulta no seu acúmulo celular, causando danos a lipídios (por peroxidação lipídica), proteínas e ao DNA, o que pode levar a lesões celulares (ver **Figura 16**).

Por outro lado, o aumento da concentração de cobre (Cu) nas células pode induzir a morte das células cancerígenas, tornando esse metal um elemento chave para o desenvolvimento de potenciais agentes anticancerígenos.

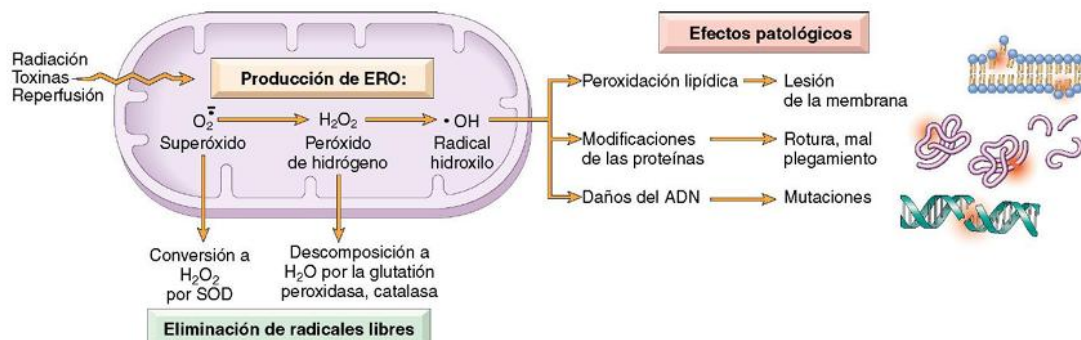


Figura 16. Geração, eliminação e papel das espécies reativas de oxigênio (ERO) nas lesões celulares. Fonte: Livro de Patologia Básica – Robbins & Cotran (12ª Edição) (2023).

1.8.4. Indução de apoptose pela via intrínseca

Outro mecanismo discutido em vários estudos é a ativação da morte celular. Tanto o excesso quanto a falta de Cu pode causar morte celular. No entanto, geralmente, o Cu é muito mais citotóxico em concentrações suficientemente altas (154). Os principais tipos de morte celular induzida por compostos anticâncer à base de metais são apoptose, necrose e autofagia (203). No entanto, esta revisão visa reunir o conhecimento da apoptose, com ênfase particular no modo de ação que foi avaliado no nosso trabalho.

A apoptose é um tipo de morte celular programada geneticamente modificada e influenciada por fatores extrínsecos (associada aos receptores de morte celular) e intrínsecos (atividade mitocondrial) (204). O início da apoptose é marcado por uma cascata de eventos a nível do núcleo, com a condensação da cromatina e fragmentação do núcleo. Em seguida, ocorre a condensação do citoplasma e a formação de vesículas extracelulares na superfície celular. Posteriormente, formam-se os corpos apoptóticos, que contém a cromatina concentrada, citoplasma e organelas celulares. Por fim, os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos, envolvendo a degradação de componentes celulares por um grupo de cisteína denominadas de caspases, que incluem as caspases iniciadoras (-2, -8, -9 e -10) e efetoras (-3, -6 e -7) (203). As alterações

fenotípicas associadas à morte celular podem variar dependendo dos estímulos e do tipo de célula (205).

As caspases iniciadoras são ativadas pela via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, ou pela via extrínseca formadas pelo complexo de sinalização indutor de morte (DISC do inglês: *death -inducing signaling complex*), ativando as proteínas adaptadoras (como FADD), que recrutam e ativam a caspase-8, iniciando uma cascata de ativação de caspases efetoras (como a caspase-3), levando à morte celular programada (206).

A via intrínseca, por sua vez, é iniciada por estímulos celulares, como por exemplo, danos ao DNA e estresse oxidativo, ocasionando disfunção mitocondrial, danos à membrana celular e perda funcional da membrana mitocondrial (207,208). Esses estímulos ativam proteínas pró-apoptóticas (Bcl-2) e anti-apoptóticas (Bax e Bak), que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial, permitindo a liberação de citocromo c. Este se associa à Apaf-1 e à pró-caspase-9 para formar o apoptossoma, ativando a caspase-9, que por sua vez ativa as caspases efetoras, resultando em apoptose (204,207) (**Figura 17**).

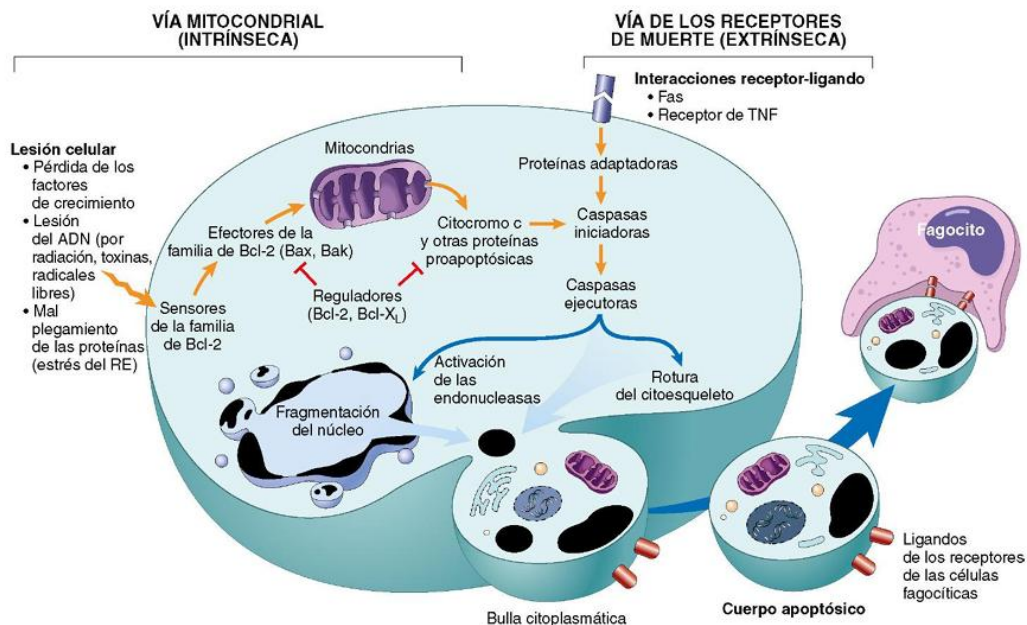


Figura 17. Via intrínseca e extrínseca da apoptose. Fonte: Livro de Patologia Básica – Robbins & Cotran (9ª Edição) (2013).

No contexto da terapia do câncer, para determinar se alguma célula sofre ou não apoptose, normalmente, é necessário que exista um equilíbrio entre os reguladores proteicos pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, o qual é considerado um ponto crítico na sinalização de morte celular (205).

A indução de apoptose como resultado de danos ao DNA em lesões pré-cancerosas pode remover células potencialmente prejudiciais, bloqueando assim o crescimento do tumor. A desregulamentação desse processo de morte está associada à proliferação celular descontrolada, ao desenvolvimento e à progressão do câncer e à resistência do câncer à quimioterapia (209).

Estudos atualizados sobre o papel de complexos de Cu(II) ou Rutênio(II) podem induzir apoptose intrínseca através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando à dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), liberação de citocromo c, e consequente ativação da cascata das caspases (principalmente caspase-9 e caspase-3). Além disso, o aumento da razão Bax/Bcl-2, o bloqueio do ciclo celular (G0/G1 ou G2/M) através da ativação da proteína p53 e a fragmentação do DNA (caracterizada por eletroforese de DNA) são frequentemente relatados após a exposição a esses complexos (163, 166, 210, 211).

1.8.5. Ativação da parada do ciclo celular

Como mencionado anteriormente, a parada do ciclo celular é um exemplo clássico da consequência de lesões do DNA que acontece de forma automática, oferecendo maior tempo possível para que a célula entre em reparação e, desta forma, reduzir a letalidade ou outras consequências genéticas, após a exposição a um determinado agente genotóxico (212).

Os agentes que danificam o DNA, indutores de estresse, ativam as funções de pontos de verificação do ciclo existentes nas fases G0/G1, S, G2 e M, que tem sistemas especializados para detectar estruturas específicas de DNA que indicam a ocorrência de algum dano ou processo de reparo de replicação de DNA em andamento (213).

A parada do ciclo celular induzida por DNA pode, conseqüentemente, levar à morte celular por apoptose. A proteína p53, supressor do tumor, exerce função essencial neste processo. O funcionamento correto da via de apoptose dependente da p53 é, na verdade, um processo complementar do reparo de lesões de DNA, que elimina células

que contêm erros em uma população e assim a possibilidade de eventos promotores de processos tumorais (214).

Dois estudos realizados por Zhang *et al.*, (2022) e Xia *et al.*, (2019) demonstraram que complexos de Cu(II) coordenados com bases de Schiff ocasionaram uma parada na fase G1 de linhagens de câncer colorretal (HCT116), além de aumentar a expressão de p53 e de proteínas pró-apoptóticas, como Bax, enquanto reduzem a expressão de proteínas anti apoptóticas, como Bcl-2, por várias vias, incluindo a produção de ERO (215,216).

No entanto, a parada do ciclo celular ocasionada pelos complexos de Cu(II) também pode ser verificada durante a fase S e G2/M, interferindo na replicação do DNA e o início da divisão celular, respectivamente. Por exemplo, complexos de cobre(II) baseados em tiossemicarbazona desenvolvidos pelo grupo de pesquisa de Mahendiran, induzem a apoptose e parada na fase S do ciclo celular com a via mitocondrial controlada (179). Um outro exemplo, é do estudo de Fayed e colaboradores. Estes sintetizaram e caracterizaram cinco complexos de cobre que demonstraram atividade citotóxica e parada do ciclo celular na fase G2/M das linhagens de câncer de mama (MCF-7), câncer de fígado (HepG2), e câncer colorretal (HCT-116) (206).

As evidências reunidas nesta revisão destacam o potencial das bases de Schiff e seus complexos metálicos como plataformas promissoras no desenvolvimento de agentes antitumorais mais eficazes e seletivos. Ao integrar suas propriedades químicas versáteis, aliadas à capacidade de modular múltiplas vias celulares envolvidas na proliferação, sobrevivência tumoral e seus mecanismos de ação, reforçam sua relevância como alternativa aos fármacos convencionais atualmente utilizados.

No entanto, a translação desses dados para a prática clínica ainda depende de estudos mais robustos, que incluem validação *in vivo*, avaliação toxicológica e ensaios clínicos controlados. Investimentos nessa linha de pesquisa podem não apenas ampliar o arsenal terapêutico contra o câncer colorretal e de mama, mas também abrir novas perspectivas para o uso racional de compostos bioativos com base em uma abordagem molecular mais direcionada.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer permanece como uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo o câncer de mama e o câncer colorretal, em particular, responsáveis por altas taxas de incidência e mortalidade globalmente. A busca por terapias mais eficazes, seletivas e menos tóxicas é uma prioridade urgente na oncologia atual. Nesse cenário, compostos contendo metais de transição têm-se destacado, especialmente pela capacidade de interagir com biomoléculas essenciais e induzir a morte seletiva de células tumorais.

As bases de Schiff, devido à sua versatilidade estrutural e forte capacidade de coordenação com metais, surgem como plataformas promissoras particularmente para o desenvolvimento de agentes antitumorais, pois apresentam propriedades biológicas superiores, como maior estabilidade, lipofilicidade e antitumoral. No entanto, a coordenação destas moléculas com metais de transição como o cobre(II), demonstraram possuir um espectro mais amplo de atividade anticâncer e uma toxicidade menor do que os medicamentos de platina e são sugeridos como capazes de superar a resistência herdada e/ou adquirida à cisplatina.

Essas características são consistentes com a hipótese de que os complexos de cobre possuem mecanismos de ação diferentes dos medicamentos de platina que se ligam covalentemente ao DNA e clivam o DNA, o que leva à parada do ciclo celular e apoptose ou geração de ERO e, por sua vez, à morte celular. Entretanto, pouca informação está disponível sobre a base molecular para o modo de ação dos complexos de cobre pois, atualmente, a maioria das investigações ainda se concentra na capacidade desses complexos de interagir com o DNA. Assim, a avaliação da atividade antitumoral e do mecanismo de ação buscando por diferentes alvos intracelulares do DNA e possivelmente específicos de compostos derivados de bases de Schiff e seus complexos bimetálicos de Cu(II) torna-se estratégica para o direcionamento ao câncer de mama e ao câncer colorretal, que frequentemente apresentam resistência à terapias convencionais.

A investigação destes compostos poderá não apenas revelar novos mecanismos de ação, mas também contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e inovadoras, capazes de superar as limitações dos tratamentos atuais e impactar positivamente a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- ❖ Investigar o potencial antitumoral de compostos derivados de bases de Schiff e seus complexos bimetálicos de Cu(II), por meio da avaliação de sua citotoxicidade, seletividade e mecanismos de ação em linhagens celulares de câncer colorretal e de mama.

3.2. Objetivos Específicos

- ❖ Sintetizar e caracterizar as propriedades eletrônicas e estruturais de dois ligantes bases de Schiff (**1a** e **1b**) e seus complexos de Cu(II) por diferentes técnicas analíticas, incluindo análise elementar.
- ❖ Avaliar a atividade antitumoral seletiva dos ligantes (**1a** e **1b**) e seus complexos de Cu(II) (**2a** e **2b**) em linhagens celulares humanas de câncer colorretal (SW620 e HCT-116), câncer de mama (MCF-7) e de fibroblastos normais (MRC-5), utilizando diferentes ensaios de viabilidade celular: MTT, vermelho neutro e exclusão de azul de Trypan;
- ❖ Determinar a Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) e Índice de Seletividade (IS) dos ligantes e de seus complexos bimetálicos de Cu(II) nas diferentes linhagens celulares avaliadas;
- ❖ Avaliar a atividade antiproliferativa dos ligantes e dos complexos nas linhagens tumorais e em fibroblastos pelo ensaio clonogênico;
- ❖ Avaliar o potencial genotóxico dos compostos utilizando o ensaio cometa alcalino *in vitro*, verificando a ocorrência de quebras na molécula de DNA das linhagens MRC-5, HCT-116, SW620 e MCF-7;
- ❖ Avaliar a interação desses compostos com o DNA (ct-DNA), por meio de espectroscopias de UV-vis e fluorescência;
- ❖ Analisar a progressão do ciclo celular das linhagens MRC-5, HCT-116, SW620 e MCF-7 após exposição aos compostos por citometria de fluxo;
- ❖ Analisar o perfil de morte celular nas linhagens de câncer colorretal e câncer de mama após exposição aos compostos por citometria de fluxo.
- ❖ Aplicar simulações de docking molecular, utilizando AutoDock Vina, para prever os modos de interação entre os compostos **1a** e **1b** e o DNA e estimar sua energia de ligação.

CAPÍTULO I

Artigo Original - submetido ao periódico *Journal of Medicinal Chemistry*, intitulado:
Cytotoxic Schiff Base Derivatives Disrupt DNA and Induce S-Phase Arrest and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells

Impactor Factor 6.8

Link de acesso onde constem as normas exigidas e com a indicação de índice de impacto actualizado da revista *Journal of Medicinal Chemistry*: [Link](#)

Cytotoxic Schiff Base Derivatives Disrupt DNA and Induce S-Phase Arrest and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells

Fátima R. Ráice^{ab}, Ianka J. Nunes^{ab}, Alecia F. da Silva^c, Temenouga N. Guecheva^d, Adryo N. Tavares^c, Daniel F. Pietezak^c, Robson da S. Oliboni^c, Adriana C. Pinheiro^{c*}, Jenifer Saffi^{ab*}

^aLaboratory of Genetic Toxicology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS – Brazil

^bPostgraduate Program in Biosciences Toxicology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS – Brazil

^cGroup of Catalysis of Theoretical Studies Center of Chemical – Federal University of Pelotas, UFPel, Pelotas, RS – Brazil

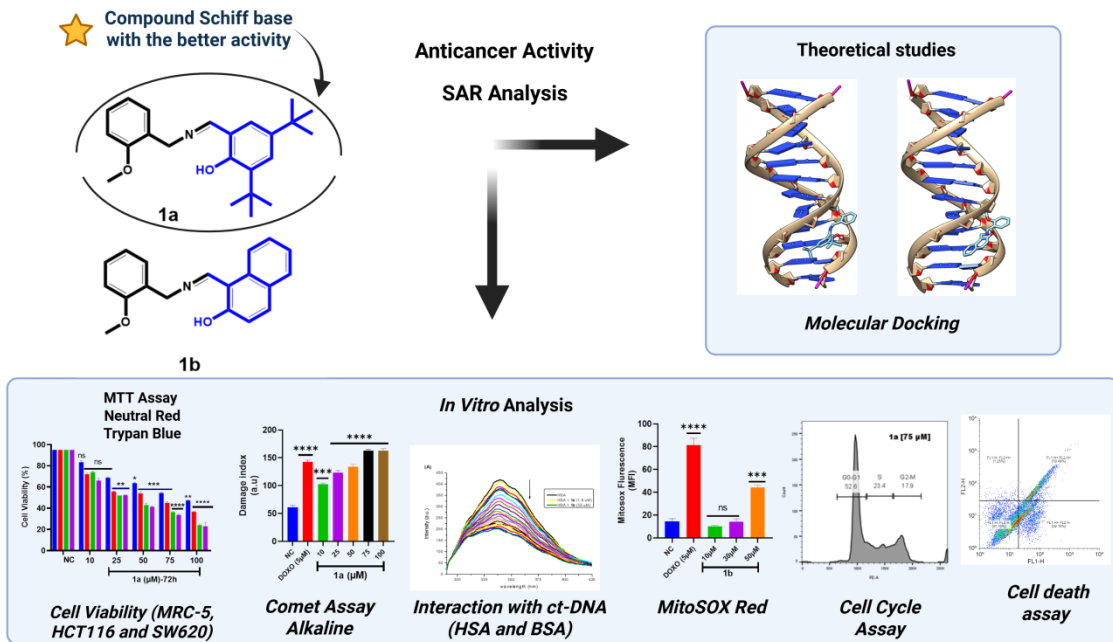
^dInstitute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia – Bulgaria

*Corresponding author:

Dr. Jenifer Saffi. Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS - Brasil. Rua Sarmento Leite 245 - CEP: 90150-170. Tel: +55 51 33038861, e-mail: jenifers@ufcspa.edu.br

Dr. Adriana Castro Pinheiro. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS - Brasil. Campus Capão do Leão s/n – CEP: 96160-000. Tel.: +55 53 32747356, e-mail: acpinheiro@ufpel.edu.br.

Graphical Abstract



Cytotoxic Schiff Base Derivatives Disrupt DNA and Induce S-Phase Arrest and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells

Fátima R. Ráice ^a, Ianka J. Nunes ^a, Alecia F. da Silva ^b, Temenouga N. Guecheva ^c, Adryo N. Tavares ^b, Daniel F. Pietezak ^b, Robson da S. Oliboni ^b, Adriana C. Pinheiro ^{b*}, Jenifer Saffi ^{a*}

^a Laboratory of Genetic Toxicology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS – Brazil

^b Group of Catalysis of Theoretical Studies Center of Chemical – Federal University of Pelotas, UFPel, Pelotas, RS – Brazil

^c Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

*Corresponding author:

Dr. Jenifer Saffi. Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS - Brasil. Rua Sarmento Leite 245 - CEP: 90150-170. Tel: +55 51 33038861, e-mail: jenifers@ufcspa.edu.br

Dr. Adriana Castro Pinheiro. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS - Brasil. Campus Capão do Leão s/n – CEP: 96160-000. Tel.: +55 53 32747356, e-mail: acpinheiro@ufpel.edu.br.

Abstract

Two Schiff base derivatives (**1a** and **1b**) were synthesized and evaluated for *in vitro* anticancer activity. Compound **1a** showed significant cytotoxicity against colorectal cancer cells HCT-116 ($IC_{50} = 36.4 \mu\text{M}$) and SW620 ($IC_{50} = 48.5 \mu\text{M}$) with minimal toxicity to normal MRC-5 cells ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$), resulting in a favorable selectivity index ($SI > 3.0$). Clonogenic assays indicated potent, dose-dependent inhibition of colorectal colony formation by **1a**. The alkaline comet assay revealed significant DNA strand breaks after 2 h treatment with $10 \mu\text{M}$ **1a**. UV–Vis titration showed strong calf thymus DNA affinity ($K = 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) for **1a**, supported by molecular docking, which identified key non-covalent interactions and ligand–DNA binding modes. Compound **1b** induced mitochondrial ROS accumulation at higher concentrations ($50 \mu\text{M}$). Flow cytometry confirmed S-phase arrest and apoptosis induction selectively in cancer cells, while serum albumin assays indicated distinct binding preferences (**1a** to HSA; **1b** to BSA).

Keywords: Schiff base; colorectal cancer; DNA damage; apoptosis; cell cycle arrest; ct-DNA and albumin binding; selective cytotoxicity; ROS modulation.

1. Introduction

Colorectal and breast cancers are among the most prevalent malignancies worldwide, contributing significantly to global cancer morbidity and mortality [1]. Colorectal cancer alone accounts for approximately 935.869 deaths annually (9.4% of all cancer deaths), while breast cancer is responsible for over 665.000 deaths (6.5%) among women and men, respectively [2]. These alarming figures underscore the urgent need for enhanced strategies in cancer prevention, early diagnosis, and effective treatment [3].

Colorectal cancer typically develops from benign adenomatous polyps in the colon or rectum, which may undergo dysplastic transformation into adenocarcinomas [4]. Prognosis is influenced by tumor staging, molecular characteristics, comorbid conditions, and host immune competence [5]. These factors are particularly relevant in patients over 60 years of age, who represent the median age at diagnosis [6,7]. Breast cancer, by contrast, exhibits considerable clinical and molecular heterogeneity influenced by hormonal, genetic, and environmental determinants [8]. Prognosis and treatment outcomes vary significantly across molecular subtypes (luminal A, luminal B, HER2-positive, and triple-negative), with advanced HER2-positive and triple-negative breast cancers showing five-year survival rates as low as 15–20% [9].

Despite the progress in targeted therapies, conventional chemotherapy remains a cornerstone of systemic cancer treatment [10]. However, its efficacy is frequently limited by off-target toxicities, drug resistance, and poor selectivity [11]. These limitations reinforce the critical need for novel chemotherapeutic agents that exhibit improved selectivity toward tumor cells and reduced toxicity to healthy tissues [12].

In this context, Schiff bases have gained prominence in medicinal chemistry due to their synthetic versatility, structural diversity, and ability to form stable complexes with transition metals [13]. These imine-based compounds, typically formed by the condensation of a primary amine with an aldehyde or ketone [14], possess a key azomethine group (C=N) considered an important pharmacophore [15]. Their biological activity is influenced by electronic and steric factors, as well as lipophilicity, which governs membrane permeability and cellular uptake [14,15]. Schiff bases and their metal complexes have demonstrated a broad spectrum of biological activities, including antioxidant [16,17], antibacterial [18–20], anti-inflammatory [20], and notably, anticancer effects [21–24].

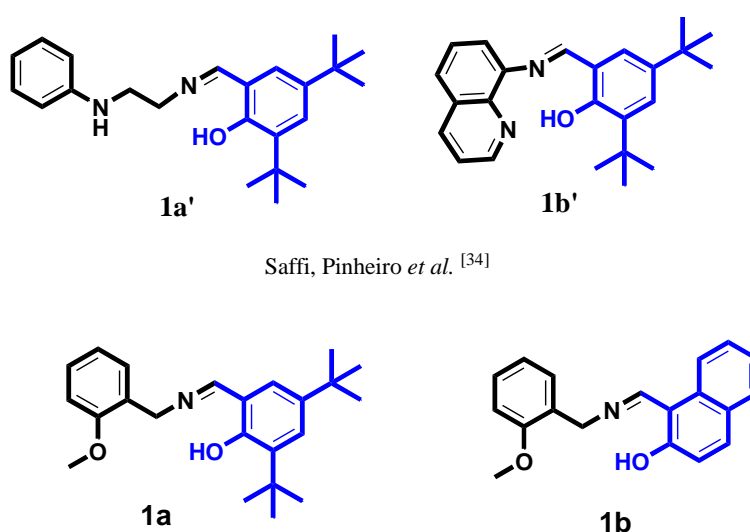
Recent studies have reported the cytotoxic effects of Schiff base derivatives against various cancer cell lines, including hepatocellular carcinoma (HepG2) [26] breast (SKBR-3, MCF-7, MDA-MB-231) [25,27], ovarian SKOV-3 [28], prostate (PC3) [29], cervical (HeLa) [30], and colorectal cancer cells (HCT116, SW620, SW480) [31,32]. However, few investigations have systematically compared the cytotoxicity, genotoxicity, and mechanisms of cell death triggered by uncoordinated Schiff bases in breast and colorectal cancer models. Deeper insight into the antitumor mechanisms of these compounds could inform the rational design of more effective and selective metal-based derivatives.

Building on previous studies from our group [33], which demonstrated the critical influence of the amine moiety on the biological activity of Schiff base ligands (**Figure 1**), we designed new derivatives incorporating 2-methoxybenzylamine as a key structural fragment. In our prior study, comparative analysis of ligands **1a'** (bearing a phenylethylamine group) and **1b'** (bearing a quinoline moiety) revealed that variations in electronic character and aromatic extension significantly impacted cytotoxicity, genotoxicity, and tumor selectivity, particularly in colorectal adenocarcinoma cells. The selection of 2-methoxybenzylamine (compounds **1a** and **1b**, **Figure 1**) was thus guided by its potential to combine the π -stacking capacity observed for quinoline-based systems with physicochemical properties that enhance cellular permeability while minimizing toxicity to normal cells. The ortho-positioned methoxy substituent increases electron density around the azomethine linkage, strengthens π - π interactions with guanine/cytosine-rich DNA regions [34], and maintains the necessary planarity for intercalation into the DNA double helix [35]. Furthermore, its moderate polarity provides a favorable balance between aqueous solubility and membrane permeability, a key feature for improving the therapeutic index [36].

In parallel, the aldehyde fragment was also strategically modified to further optimize molecular recognition. Compound **1a** retains the *tert*-butylphenol moiety, previously associated with strong cytotoxic activity but limited selectivity toward malignant cells, serving as a reference point for comparison with the newly designed compound **1b**. In **1b**, the *tert*-butyl group is replaced by a 2-naphthol scaffold, chosen to increase aromatic conjugation and molecular planarity. The extended π -system of 2-naphthol is expected to facilitate more efficient π - π stacking with DNA and enable better-defined interactions with nucleophilic and hydrophobic sites on biomolecular targets [37]. Compared to the sterically bulky and non-specific oxidative stress-inducing

tert-butyl group [37], the naphthyl ring is anticipated to promote enhanced tumor selectivity through more refined molecular interactions, without necessarily compromising cytotoxic potency [38].

Based on these structural considerations, the present study reports the synthesis and *in vitro* biological evaluation of two Schiff base derivatives: 2,4-di-*tert*-butyl-6-[(2-methoxyphenyl)methyliminomethyl]phenol (**1a**) and 1-[(2-methoxyphenyl)methyliminomethyl]naphthalen-2-ol (**1b**) (**Figure 1**). These compounds differ in the aromatic core of the aldehyde fragment, enabling a structure–activity relationship (SAR) analysis. Their cytotoxic profiles were investigated in human colorectal (HCT116 and SW620) and breast (MCF-7) cancer cell lines, with selectivity evaluated using non-tumoral human lung fibroblasts (MRC-5). A comprehensive panel of *in vitro* assays, including cell viability (MTT, trypan blue exclusion, and neutral red uptake), reactive oxygen species (ROS) generation, DNA damage (alkaline comet assay), cell cycle progression, and apoptosis/necrosis quantification, was employed to elucidate how these structural variations influence biological responses. In addition to cellular assays, molecular interaction studies were conducted to evaluate the binding affinity of the ligands toward calf thymus DNA (Ct-DNA) and serum albumins, bovine (BSA) and human (HSA), as key targets for pharmacokinetic and pharmacodynamic behavior. These complementary studies provide mechanistic insights into the molecular recognition processes involved, supporting a more rational design of Schiff base derivatives with optimized selectivity, efficacy, and pharmacokinetic properties as anticancer candidates.



Saffi, Pinheiro *et al.* [34]

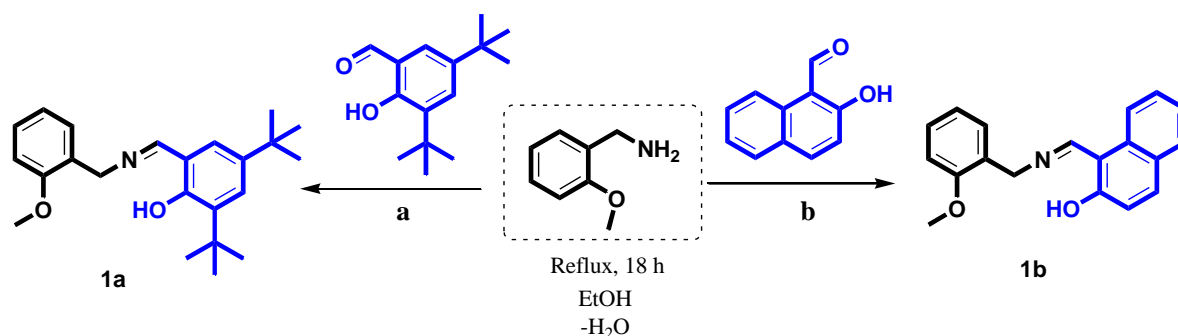
This work

Figure 1. The molecular architecture of the Schiff base derivative compounds.

2. Results and Discussion

2.1. Chemical

Schiff bases **1a** and **1b** were prepared by condensing equimolar amounts of the corresponding amine with either 4-di-*tert*-butylsalicylaldehyde (a) or 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (b) in ethanol, following previously reported procedures [39] (see **Scheme 1**). The structures of the synthesized compounds were confirmed through standard analytical techniques, as presented in **Figures S1–S4**. The purity was determined by elemental analysis (see **SI**). The synthesized compounds were stable, non-hygroscopic, and soluble in most organic solvents, such as methanol, ethanol, chloroform, DMF, and DMSO.



Scheme 1. Synthetic route for the preparation of Schiff base compounds **1a** and **1b**.

2.2. *In vitro* biological activities and theoretical studies

2.2.1. Compound **1a** demonstrated cytotoxic effect on colorectal cancer cells evaluated by MTT Assay

Mitochondria are the primary sites of oxidative phosphorylation, where glucose and fatty acids are metabolized to produce adenosine triphosphate (ATP), the key molecule for cellular energy. This process involves the electron transport chain and ATP synthase [40,41]. The MTT assay, commonly used to assess cell viability and screen for potential anticancer agents targeting mitochondrial function, measures the activity of mitochondrial dehydrogenases in viable cells [42].

The *in vitro* cytotoxicity of compounds **1a** and **1b** was evaluated using the MTT assay. Both compounds were tested against a panel of human cancer cell lines. Cells were treated with increasing concentrations (1–100 μ M) of compounds **1a** or **1b** for

72 h. Cell viability was expressed as a percentage relative to the untreated control (100%). As shown in **Figure 2**, the results indicated that **1a** and **1b** demonstrated moderate cytotoxicity against colorectal cancer cells. Statistically significant reductions of 50% in cell viability were observed above concentrations of 20 and 40 μM for **1a** and **1b**, respectively. To further quantify cytotoxicity, IC_{50} values were determined (see **Table 1**), where lower values indicate greater cytotoxic activity. Compound **1a** (**Figure 2, Table 1**) exhibited more significant cytotoxicity than **1b** against colorectal cancer cells, while both compounds showed similar levels of cytotoxic activity against MCF-7 breast cancer cell lines. IC_{50} values of $48.5 \pm 1.6 \mu\text{M}$ for SW620 and $36.4 \pm 1.7 \mu\text{M}$ for HCT-116, which were lower than the IC_{50} observed for MCF-7 ($85.5 \pm 1.7 \mu\text{M}$) after 72 h of exposure with **1a**. In comparison, compound **1b** exhibited higher IC_{50} values of $60.6 \pm 1.7 \mu\text{M}$ for SW620, $56.2 \pm 1.6 \mu\text{M}$ for HCT-116, and $94.7 \pm 1.9 \mu\text{M}$ for MCF-7, indicating a lower cytotoxic effect. Both compounds were non-toxic to normal MRC-5 fibroblasts at the tested concentrations (up to 100 μM), with IC_{50} values exceeding this range, suggesting a favorable selectivity profile toward colorectal cancer cells.

Table 1. Cytotoxicity (IC_{50}) of **1a** and **1b** in normal and cancer cell lines after treatment, as assessed by the MTT assay. The results are expressed as mean \pm SD.

Cells	IC_{50} (μM) -72h			
	MRC-5	MCF-7	SW620	HCT-116
1a	$>100 \pm 1.9$	85.5 ± 1.7	48.5 ± 1.6	36.4 ± 1.7
1b	$>100 \pm 1.9$	94.7 ± 1.9	60.6 ± 1.7	56.2 ± 1.6

■ MRC-5 ■ MCF-7 ■ SW620 ■ HCT116

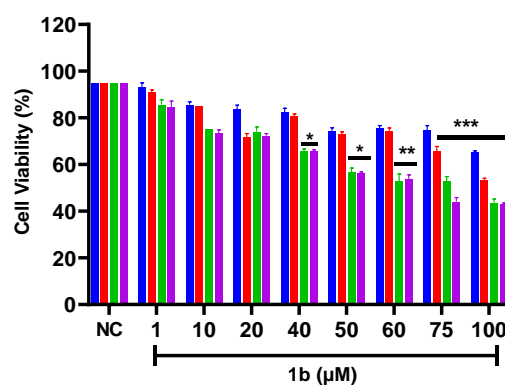
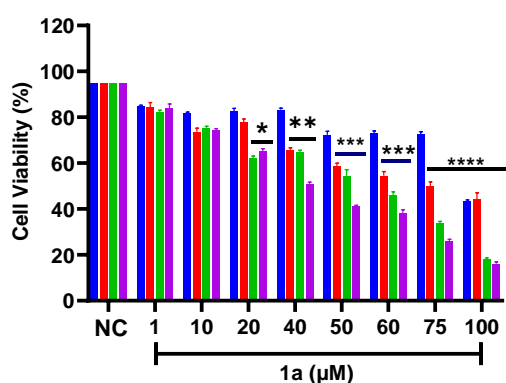


Figure 2. Cytotoxic effect of compounds **1a** and **1b** by MTT assay in MRC-5, MCF-7, SW620, and HCT-116 cells after 72 h. NC represents negative control. Statistical analyses were carried out using the One-way ANOVA, followed by the Dunnett multiple comparison test. p-value of less than 0.05 was considered significant. The following p-values were observed: *p < 0.05, ** < p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 in relation to the NC group for **1a** and **1b**.

2.2.2. Compound **1a** demonstrated cytotoxic effect on colorectal cancer cells evaluated by Neutral Red Assay

A comprehensive cytotoxicity assessment requires multiple methodologies to provide a more accurate representation of a compound's biological activity. In this study, the neutral red (NR) assay was employed to evaluate the lysosomal integrity of viable cells after exposure to compounds **1a** and **1b** for 72 h. While the MTT assay is widely used to assess cell viability, it can sometimes overestimate cell survival, as mitochondrial function may persist even in cells undergoing apoptosis or other forms of stress [41]. In contrast, the NR assay provides additional information on lysosomal stability, serving as a complementary approach to cytotoxicity evaluation [43,44].

We assessed the cytotoxic effects of compounds **1a** and **1b** after 72 h of treatment on HCT116, SW620, MCF-7, and MRC-5 cell lines using the NR assay, as shown in **Figure 3**. Our results demonstrated that **1a** and **1b** exhibit cytotoxic effects in tumor cell lines in a dose-dependent manner, as quantified by the IC₅₀ (see

Table 2). Both compounds exhibited moderate cytotoxicity against colorectal tumor cells, with **1a** displaying the lowest IC₅₀ values (IC₅₀ = 55.8 ± 1.6 μM for SW620 and IC₅₀ = 51.1 ± 1.6 μM for HCT-116), while showing minimal toxicity toward normal human fibroblasts MRC-5 (IC₅₀ = 92.2 ± 1.9 μM) and MCF-7 (IC₅₀ = 86.1 ± 1.8 μM). **1b** showed IC₅₀ values of 66.3 ± 1.7 μM (SW620), 62.4 ± 1.6 μM (HCT-116), 86.1 ± 1.8 μM (MCF-7), and 90.6 ± 1.9 μM (MRC-5). The selectivity index (SI), calculated as the ratio of IC₅₀ in non-tumoral MRC-5 cells to that in cancer cells, indicated low selectivity for both compounds. Compound **1a** showed SI values of 1.1, 1.6, and 1.8 for MCF-7, SW620, and HCT116 cells, respectively, while compound **1b** presented SI values of 1.1, 1.4, and 1.5 for the same cell lines, suggesting limited preferential cytotoxicity toward tumor cells (

Table 2).

Table 2. IC₅₀ and selectivity index (SI) of **1a** and **1b** in normal and cancer cell lines after treatment, as assessed by the Neutral Red assay. The results are expressed as mean ± SD.

Cells	IC ₅₀ (μM) (SI) -72h			
	MRC-5	MCF-7	SW620	HCT116
1a	90.6 ± 1.9	80.5 ± 1.8 (1.1)	55.8 ± 1.6 (1.6)	51.1 ± 1.6 (1.8)
1b	92.2 ± 1.9	86.1 ± 1.8 (1.1)	66.3 ± 1.7 (1.4)	62.4 ± 1.6 (1.5)

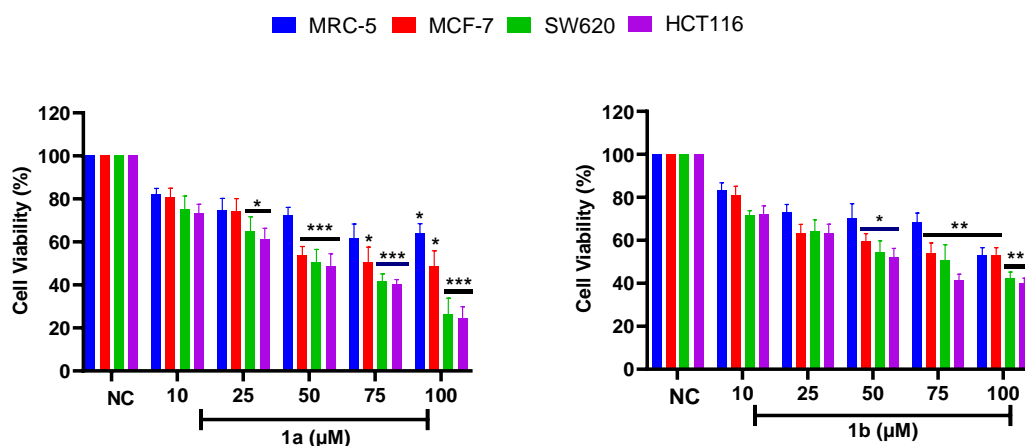


Figure 3. Effects of different concentrations of compounds **1a** and **1b** on cell viability assessed using the Neutral Red uptake assay on MRC-5, cell lines after 72h treatment. Statistical analyses were conducted with one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, where $p < 0.05$ was considered significant. Every bar represents the mean ± SD ($n=3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ versus NC for compound **1a** and **1b**.

2.2.3. Compounds **1a** and **1b** demonstrated cytotoxic effects in cancer cells evaluated by Trypan blue exclusion assay

Unlike the MTT and Neutral Red (NR) assays, which assess cell metabolic activity, the Trypan blue exclusion assay directly measures membrane integrity, providing a more accurate evaluation of cell viability and death [45]. Since some compounds can interfere with mitochondrial activity or lysosomal integrity without

causing immediate loss of membrane integrity [46], this complementary assay was performed to confirm the cytotoxic effects of **1a** and **1b**.

After 72 h, both Schiff base compounds demonstrated a dose-dependent decrease in cell viability and significant cytotoxicity against all tumor lines with values below 50 μM , without reducing the viability of MRC-5 cells (**Figure 4**). The IC_{50} values for **1a** were $98.4 \pm 1.9 \mu\text{M}$ (MRC-5), $52.1 \pm 1.7 \mu\text{M}$ (MCF-7), $31.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$ (SW620), and $27.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$ (HCT-116). In contrast, **1b** showed higher IC_{50} values: $92.7 \pm 1.9 \mu\text{M}$ (MRC-5), $83.9 \pm 1.8 \mu\text{M}$ (MCF-7), $38.7 \pm 1.6 \mu\text{M}$ (SW620), and $34.5 \pm 1.6 \mu\text{M}$ (HCT-116). Furthermore, compound **1a** exhibited higher selectivity index (SI) values than **1b** across all tumor cell lines evaluated, particularly against colorectal cancer cells. SI values for **1a** reached 3.6 for HCT116 and 3.1 for SW620, compared to 2.7 and 2.4 for compound **1b**, respectively (**Table 3**). These results indicate a more pronounced and preferential cytotoxic effect of compound **1a** on colorectal tumor cells over normal MRC-5 fibroblasts. Under the same experimental conditions, both compounds reduced tumor cell viability significantly, especially in the colorectal cancer lines, while maintaining higher viability levels in non-tumoral cells.

Table 3. IC_{50} and selectivity index (SI) of **1a** and **1b** in normal and cancer cell lines after treatment, as assessed by Trypan Blue exclusion. The results are expressed as mean \pm SD.

Cells	IC_{50} (μM) (SI) -72h			
	MRC-5	MCF-7	SW620	HCT116
1a	98.4 ± 1.9	52.1 ± 1.7 (1.9)	31.5 ± 1.4 (3.1)	27.5 ± 1.4 (3.6)
1b	92.7 ± 1.9	83.9 ± 1.8 (1.1)	38.7 ± 1.6 (2.4)	34.5 ± 1.5 (2.7)

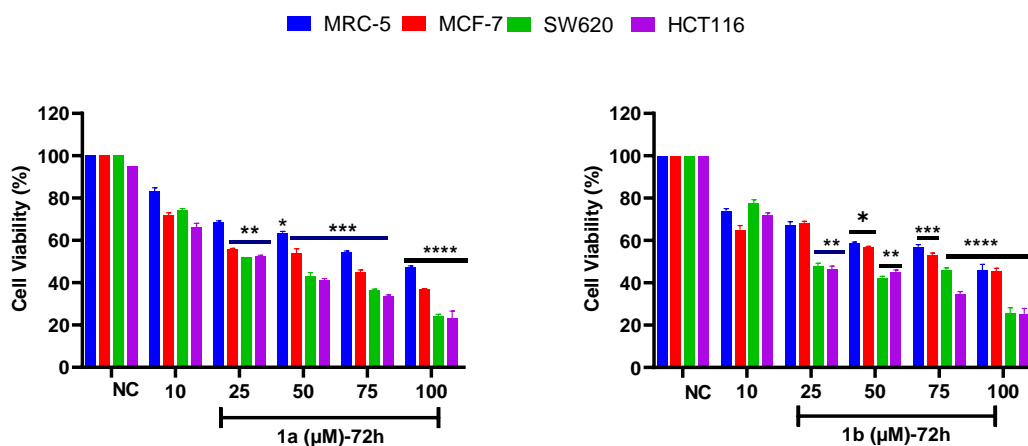


Figure 4. Cell viability of MRC-5, MCF-7, SW620, and HCT-116 cells treated with **1a** and **1b** for 72h by Trypan blue exclusion assay. A p-value of less than 0.05 was considered significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ versus NC for compound **1a** and **1b**.

This assay corroborated the results from MTT and NR assays, confirming that **1a** exerted a more significant cytotoxic effect, particularly in colorectal cancer cells. In contrast, compound **1b** demonstrated less potent activity across all cell lines tested. The observed differences in cytotoxicity levels, as a function of concentration and exposure time, may be attributed to the varying capacities of cancer cells to withstand treatment, potentially due to the activation of drug resistance mechanisms or cellular repair pathways over time. Based on these results, the concentrations established in this assay were retained for the subsequent studies.

2.2.4. Correlation between Mitochondrial Metabolism, Lysosomal Integrity, and Membrane Permeability in the Cytotoxicity of Compounds **1a** and **1b**

The integration of MTT, Neutral Red (NR), and Trypan Blue exclusion assays provided a comprehensive evaluation of the cytotoxic effects of compounds **1a** and **1b**. The MTT assay indicated that compound **1a** exhibited greater cytotoxicity toward colorectal cancer cell lines (SW620 and HCT116) compared to **1b**, as reflected by its lower IC_{50} values. However, since the MTT assay primarily assesses mitochondrial metabolic activity, it may overestimate cell viability, as mitochondrial function can persist during early stages of apoptosis or other stress-related responses. To address this limitation, the NR assay, based on lysosomal integrity, was employed and showed a similar trend: compound **1a** displayed stronger cytotoxic effects than **1b** (Sections 0 and

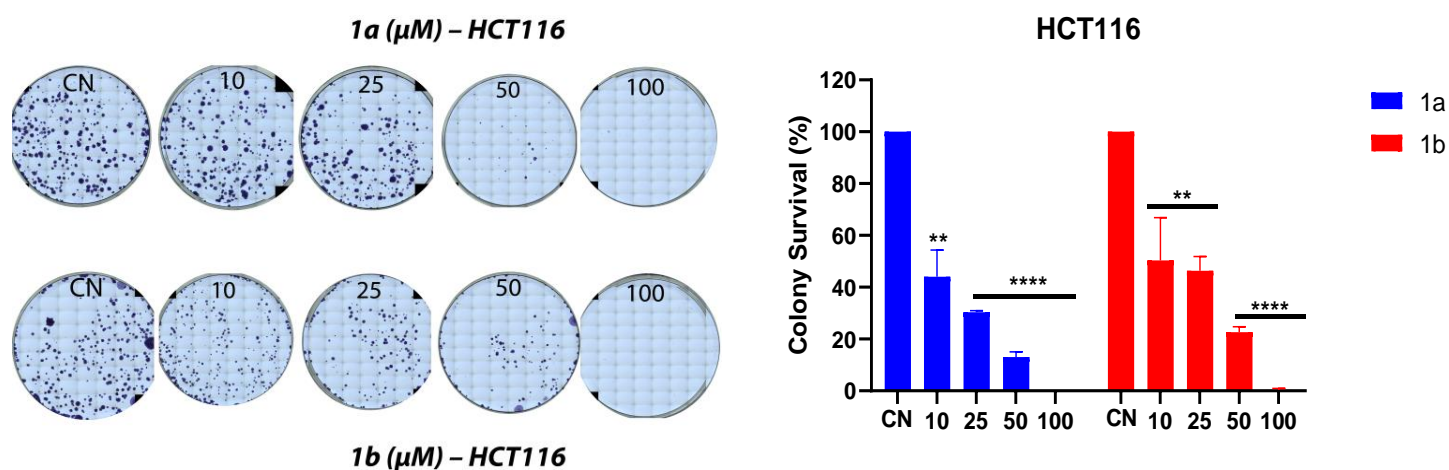
0). Notably, IC_{50} values from the NR assay were slightly higher than those obtained from the MTT and Trypan Blue assays, suggesting that mitochondrial dysfunction may precede lysosomal destabilization in the cytotoxic cascade. The differences in compound sensitivity observed across the tumor cell lines may be attributed to intrinsic molecular and genetic variations. For instance, MCF-7, HCT116, and SW620 differ in their p53 tumor suppressor status, an important factor influencing apoptosis [47]. Compounds that induce p53-mediated cell death are generally more effective in cells with functional wild-type p53, such as HCT116, compared to cell lines harboring mutated or inactivated p53, such as SW620 and MCF-7 [48]. Additionally, KRAS mutations, which are common in some of these lines, may affect downstream survival pathways and modulate cellular responsiveness to treatment [49,50]. Beyond genetic factors, variability in metabolic enzyme expression (e.g., cytochrome P450s), solute carrier (SLC) transporters, and ATP-binding cassette (ABC) efflux pumps may influence compound bioactivation, uptake, and intracellular accumulation, ultimately affecting cytotoxic outcomes [51,52].

From a structure–activity relationship (SAR) perspective, the enhanced cytotoxic profile of compound **1a** may be attributed to the presence of two bulky tert-butyl groups at the 2,4-positions of the phenolic ring. These substituents likely increase lipophilicity and improve membrane permeability, thereby facilitating cellular uptake [53]. In contrast, compound **1b** features a more rigid naphthyl moiety, which, although favoring π – π interactions with DNA base pairs due to its planarity, may hinder the conformational adaptability required for efficient intercalation or groove binding, limiting intracellular target engagement [53,54]. Both compounds share a methoxy-substituted aromatic imine core, indicating that the observed differences in cytotoxicity are primarily influenced by variations in the phenolic moiety. These structural features appear to affect not only mitochondrial and lysosomal responses but also general membrane integrity, as evidenced by the Trypan Blue exclusion results. Together, these findings highlight the importance of using complementary assays to evaluate cytotoxic effects. The combined analysis of mitochondrial function, lysosomal stability, and membrane integrity provides a more robust and accurate assessment of the biological activity of novel compounds.

2.2.5. Clonogenic assay suggested antiproliferative potential of **1a** and **1b** against colorectal cancer cells

Clonogenic assays, as described by Rafehi *et al.* [55], evaluated the ability of individual cells to survive a temporary drug exposure and later recover and proliferate over an extended period. In this study, the assay was used to assess the long-term effects of compounds **1a** and **1b** on the proliferation and survival of MCF-7 (breast cancer), SW620 and HCT-116 (colorectal cancer), and MRC-5 (normal lung fibroblast) cells after 72 h of treatment. As expected, the number of colonies increased with higher seeding densities in both the untreated and treated groups. However, at a seeding density of 100 cells per well, compounds **1a** and **1b** significantly reduced colony formation in a dose-dependent manner (10–100 μM) (**Figure 5**). This effect was more pronounced in SW620 and HCT-116 cells compared to MRC-5 cells. Additionally, compound **1b** inhibited the clonogenic potential of MCF-7 cells while demonstrating lower cytotoxicity toward MRC-5 cells, indicating a degree of selectivity for tumor cells. These findings justified the selection of this concentration range for further experiments.

1a and **1b** induced significant morphological changes in both tumor and normal cell lines, affecting cell size, shape, adhesion, and colony structure (Erro! A origem da referência não foi encontrada.). The SW620 and MCF-7 cells formed smaller and less compact colonies, while the HCT-116 and MRC-5 cells displayed larger and more rounded shapes. Although there were differences in sensitivity among the cell lines, treatment with both ligands notably reduced proliferation and viability at concentrations of up to 100 μM ($p < 0.0001$).



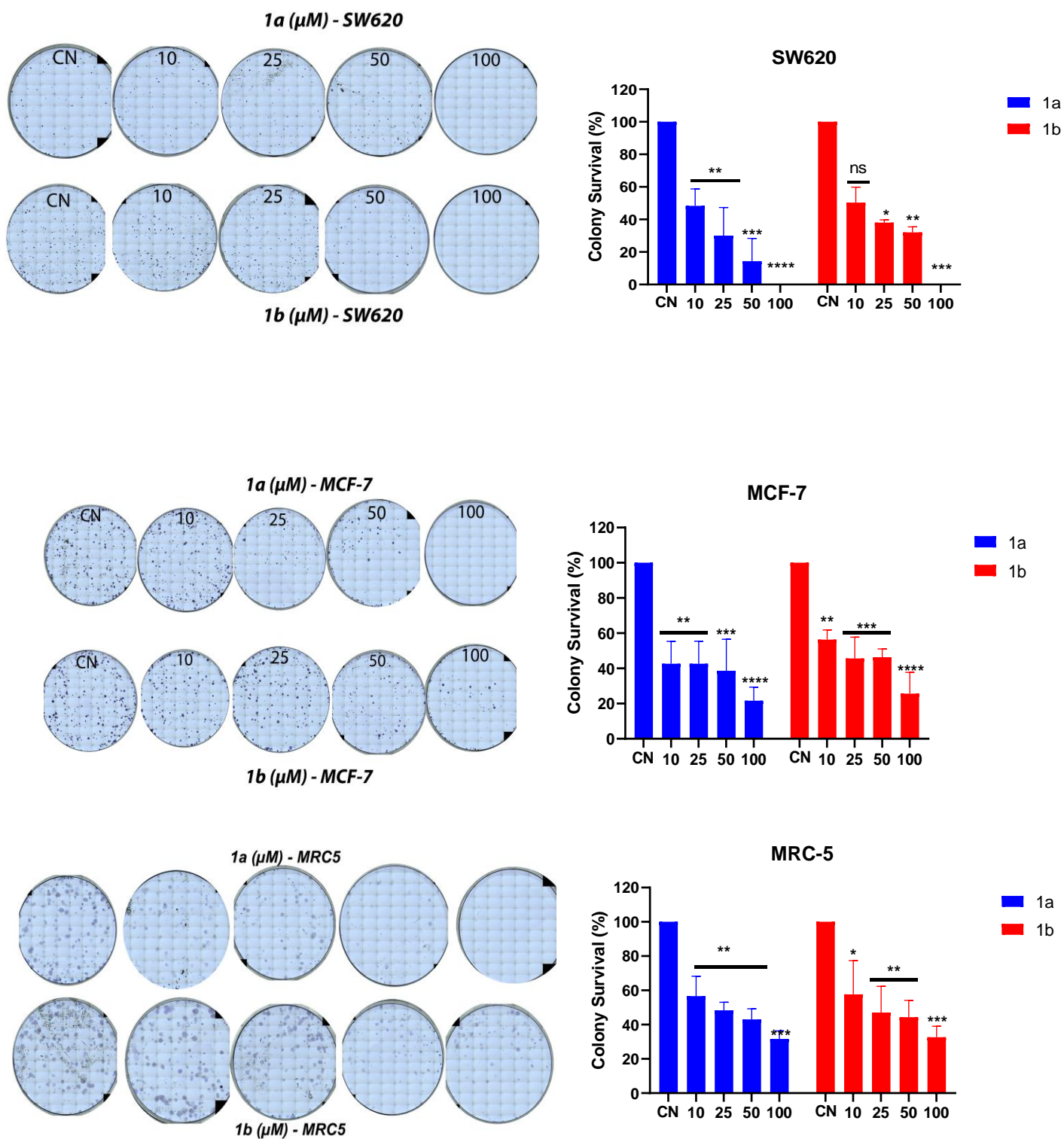


Figure 5. Cell survival of HCT116, SW620, MCF-7, and MRC-5 cells after 72 h exposure to **1a** and **1b**, followed by 8 days for MRC-5, 10 days for SW620 and HCT-116, and 14 days for MCF-7 of colony formation in fresh medium. Data represent mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-

way ANOVA with Dunnett's post hoc test. A p-value of less than 0.05 was considered significant. Significance levels: ns (not significant), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, relative to the NC group.

2.2.6. Compound **1a** exhibits greater genotoxicity in colorectal cancer cells after 2 h

The genotoxic potential of compounds **1a** and **1b** was evaluated in human colorectal cancer cell lines (HCT-116 and SW620) and normal lung fibroblasts (MRC-5) using the alkaline comet assay. DNA damage was quantified by measuring the damage index (DI) after exposure to increasing concentrations (10–100 μ M) for 2 and 24 h. Doxorubicin (5 μ M), a clinically established genotoxic agent, was used as a positive control due to its well-characterized mechanism of inducing DNA double-strand breaks via topoisomerase II inhibition [57,58,59]. The most significant DNA damage for both compounds occurred at the 2 h time point, consistent with rapid cellular uptake and nuclear interaction. As shown in **Figures 6** and **Figure 77**, **1a** exhibited potent, dose-dependent genotoxic effects in both tumor cell lines (**Table S1**). In HCT-116 cells, DI values reached 153.9 ± 11.0 at 10 μ M (2 h) and peaked at 179.0 ± 64.5 at 100 μ M. Although damage levels decreased after 24 h (e.g., 144.0 ± 13.1 at 100 μ M), they remained significantly elevated compared to controls. A similar profile was observed in SW620 cells, with DI of 124.2 ± 0.3 (10 μ M, 2 h) and 171.0 ± 48.2 (100 μ M, 2 h). These results suggest rapid cellular uptake and nuclear interaction of **1a**, followed by partial DNA repair over time. In contrast, **1b** induced moderate genotoxic effects, with significant DNA damage observed only at higher concentrations. In HCT-116, DI values increased from 50.8 ± 2.6 (10 μ M, 2 h) to 162.0 ± 31.1 (100 μ M, 2 h), while in SW620, a similar trend was observed (106.2 ± 3.8 at 25 μ M, 2 h; 147.1 ± 17.6 at 100 μ M).

In normal MRC-5 fibroblasts, treatment with **1a** or **1b** showed markedly reduced genotoxicity compared to cancer cells. After 2 h exposure, compound **1a** at 10 μ M yielded a DI of 48.3 ± 4.8 , and **1b** 34.3 ± 1.3 . After 24 h, DI values dropped to 21.3 ± 1.2 for **1a** and 34.3 ± 1.3 for **1b**, indicating that both compounds allowed for more effective recovery in non-tumor cells and likely exerted less persistent genotoxic stress, see **Table S1**.

The most significant DNA damage for all compounds occurred at the 2 h time point, consistent with rapid cellular uptake and nuclear interaction. This suggests that some of the induced lesions may be repairable over time, depending on cellular repair

capacity. Although HCT-116 is MMR-deficient due to inactivation of the MLH1 gene, this cell line exhibited a notable reduction in DNA damage between 2 h and 24 h, suggesting that other DNA repair pathways, such as base excision repair (BER) or nucleotide excision repair (NER), may be compensating. Conversely, SW620 is MMR-proficient but shows sustained DNA damage over time. For instance, treatment with **1a** at 50 μ M resulted in a DI of 139.1 ± 12.9 (2 h) and 98.4 ± 6.6 (24 h) in SW620, compared to 146.7 ± 15.6 and 109.5 ± 7.3 in HCT-116. This persistence of damage in SW620 may reflect impairments in repair systems other than MMR or limited ability to resolve complex lesions.

These results demonstrate that **1a** is a fast-acting and potent genotoxic agent with tumor selectivity. **1b**, although active at high concentrations, showed lower genotoxic potential overall. The observed selectivity of both compounds toward tumor cells, combined with reduced DNA damage in normal fibroblasts, supports their potential as promising lead compounds for further preclinical development. Moreover, the fast induction of DNA damage may reflect direct DNA interaction or intercalation, warranting further mechanistic studies.

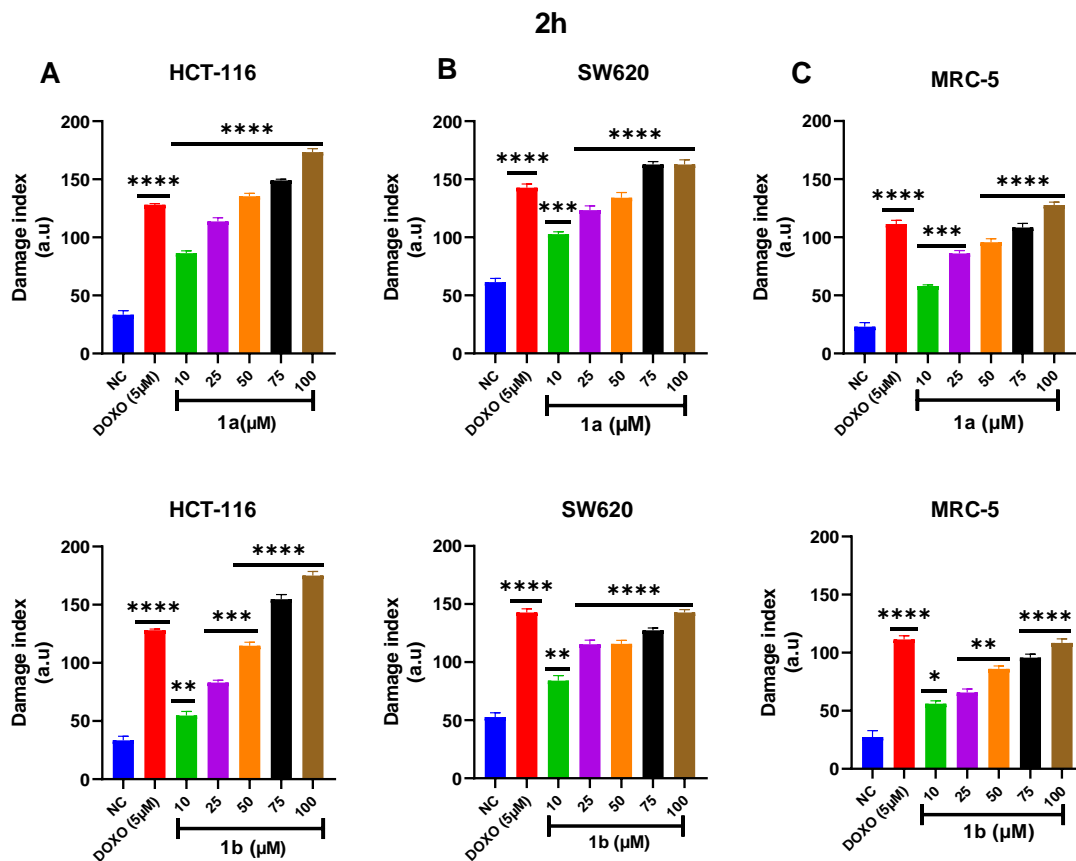


Figure 6. Genotoxicity effects of compounds **1a** and **1b** in the HCT1-116 (A), SW620 (B) and MRC-5 (C) cell lines after 2h of treatment, assessed by the alkaline comet assay. The results are expressed as damage index (arbitrary unit, a.u) and represent mean \pm SD of independent experiments (n=3). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test followed by Dunnett's post hoc test, comparing treated groups to the negative control (NC). A value of $p < 0.05$ was considered significant. Where, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ in relation to the NC.

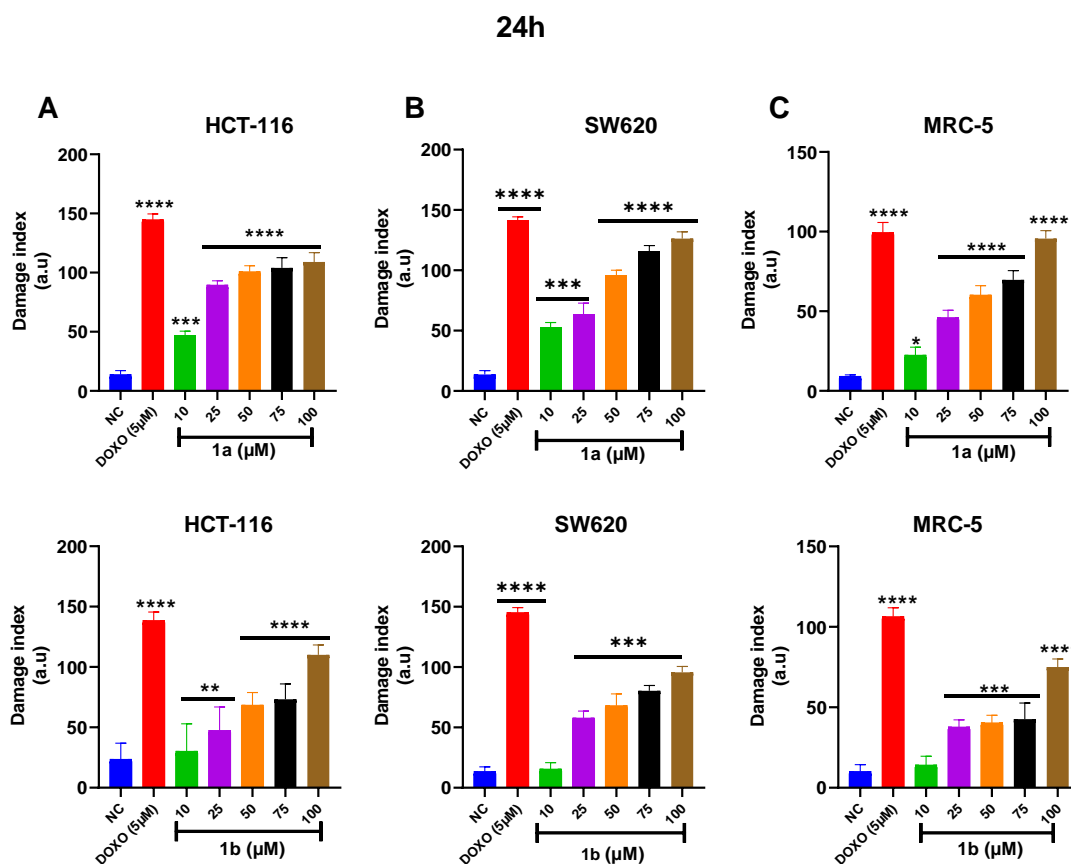


Figure 7. Genotoxicity effects of compounds **1a** and **1b** in the HCT1-116 (A), SW620 (B), and MRC-5 (C) cell lines after 24h of treatment, assessed by the alkaline comet assay. Data are expressed as damage index (arbitrary unit, a.u) and show mean \pm SD from independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA test followed by Dunnett's post hoc test, versus to the negative control (NC). Significance: *ns* represent not significant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ in relation to the NC group for (**1a**) and (**1b**).

2.2.7. UV-Vis absorption spectroscopy indicates distinct Ct-DNA interaction profiles for Schiff bases **1a** and **1b**, with higher binding affinity observed for compound **1a**

The study of interactions between small molecules and DNA is essential for understanding molecular processes occurring in the intracellular environment [34]. DNA is a primary biological target for many pharmacologically active compounds, including those already in clinical use and others under development. Molecules with therapeutic potential can bind to DNA, inducing conformational changes, interfering with replication and transcription, or directly inhibiting its biological functions [60].

The interaction between potential drug candidates and calf thymus DNA (Ct-DNA) can be investigated using electronic absorption spectroscopy, particularly through spectrophotometric titrations, a widely employed method for evaluating DNA-binding characteristics [61, 62]. Characteristic spectral changes are typically observed when interaction occurs, including hyperchromic, hypochromic, hypsochromic, and bathochromic effects. A hyperchromic effect is generally associated with groove binding, which involves hydrogen bonding between the nitrogen and oxygen atoms of Schiff base ligands and the nitrogenous bases of DNA, often accompanied by a structural contraction of the DNA helix. In contrast, a hypochromic effect, especially when coupled with a bathochromic shift, is indicative of intercalative binding, suggesting partial disruption of the DNA double helix [63].

The interaction of compounds **1a** and **1b** with Ct-DNA was evaluated under physiological conditions (pH 7.4) using Tris-HCl buffer (Trizma) at room temperature with a fixed compound concentration of 50 μM . Gradual titrations of Ct-DNA (15 μL to 285 μL) were performed. Alterations in the electronic absorption spectra, particularly in the 340–410 nm range, revealed the formation of Schiff base–DNA complexes. Compound **1a** exhibited a hyperchromic effect along with a slight bathochromic shift (**Figure S5**), whereas **1b** showed a hypochromic response (**Figure S6**). Ct-DNA binding constants (K_b) were calculated using the Benesi–Hildebrand equation, yielding values of $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for compound **1a** (**Figure S5**) and $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for compound **1b** (**Figure S6**), indicating a stronger binding affinity of **1a** to Ct-DNA. Higher K_b values denote stronger interactions between the compound and the Ct-DNA double helix. Accordingly, the superior K_b observed for **1a** suggests a more stable DNA interaction. The hyperchromic effect in the UV–Vis spectrum of compound **1a** reflects perturbations in the electronic states of its chromophores, indicating interaction with stacked base pairs in DNA, albeit not through classical intercalation [63]. Moreover, the presence of bulky, nonpolar di-*tert*-butyl groups on the phenolic ring of **1a** substantially increases the molecule's hydrophobicity [64]. Greater hydrophobic character tends to enhance binding affinity for the hydrophobic regions of DNA, promoting complex stabilization and molecular recognition [65].

2.2.8. Molecular Docking

Given the differential binding behavior revealed by the UV–Vis titration assays, where compound **1a** exhibited a hyperchromic effect and a higher binding constant, while compound **1b** showed hypochromism consistent with intercalation, molecular docking simulations were subsequently performed to gain structural and mechanistic insights into these interactions. While spectroscopic data offer valuable clues about binding modes and affinity, they do not provide atomic-level resolution regarding the spatial orientation or the specific nature of the ligand–DNA interactions. Therefore, docking studies were employed as a complementary strategy to visualize the preferred binding poses, assess the impact of structural variations on binding energetics, and characterize the types of non-covalent interactions responsible for DNA recognition by each compound.

To this end, conformational ensembles of compounds **1a** and **1b** were generated using CREST at the GFN2-xTB level, which enabled exploration of their accessible conformational space in an aqueous environment. After optimization with xtb, 57 conformers were obtained for compound **1a** and 39 for compound **1b**. This difference was expected, as **1a** possesses more degrees of freedom due to the methyl groups attached to the aromatic ring. The optimal ligand binding poses for each molecule are illustrated in **Figure 8**.

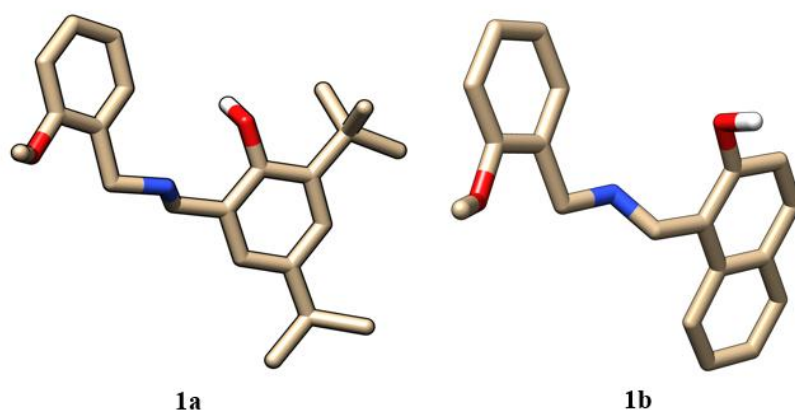


Figure 8. Best docking poses for compounds **1a** and **1b**.

The binding affinities of the molecules are very similar, with a slightly lower value to **1a** (-7.7 kcal mol $^{-1}$) as compared to **1b** (-7.6 kcal mol $^{-1}$). This difference can be due to the greater degrees of freedom of **1a**. **Figure 9** reveals that both molecules dock

at highly similar binding sites, which may account for the observed similarity in their binding affinity values.

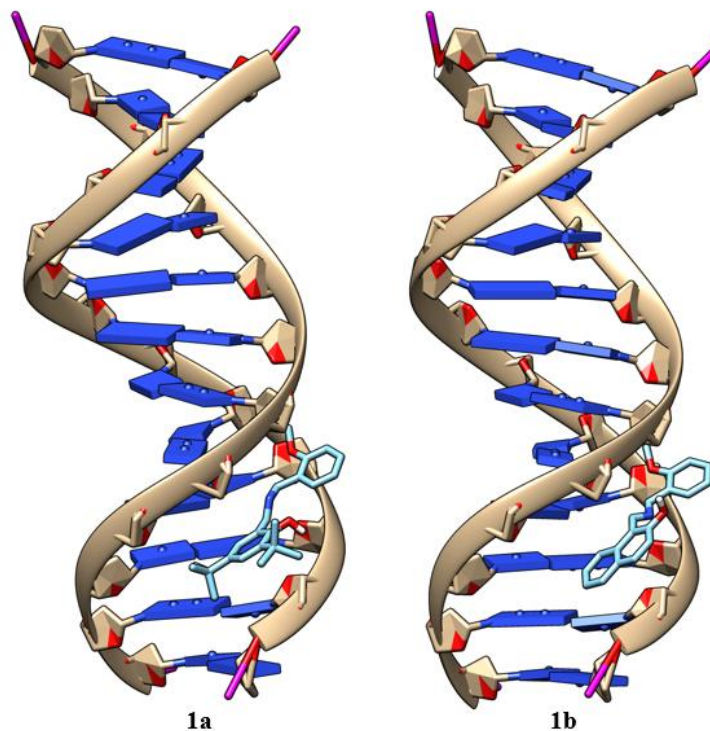


Figure 9. Best binding location for compounds 1a and 1b with DNA. Interaction energies are $-7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $-7.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ for compounds **1a** and **1b**, respectively.

For both systems, a single hydrogen bond interaction was observed between the ligand and DNA. The key distinction between the two systems lies in the interaction site: in molecule **1a**, the hydrogen bond involves the nitrogen of the imine group, whereas in molecule **1b**, it occurs via the hydroxyl moiety. Moreover, in system **1a**, the molecule acts as the hydrogen bond acceptor, while in system **1b**, it acts as the donor. Despite these differences, both interactions exhibited similar bond lengths. All the aforementioned features are illustrated in **Figure 10** and **Table 4**.

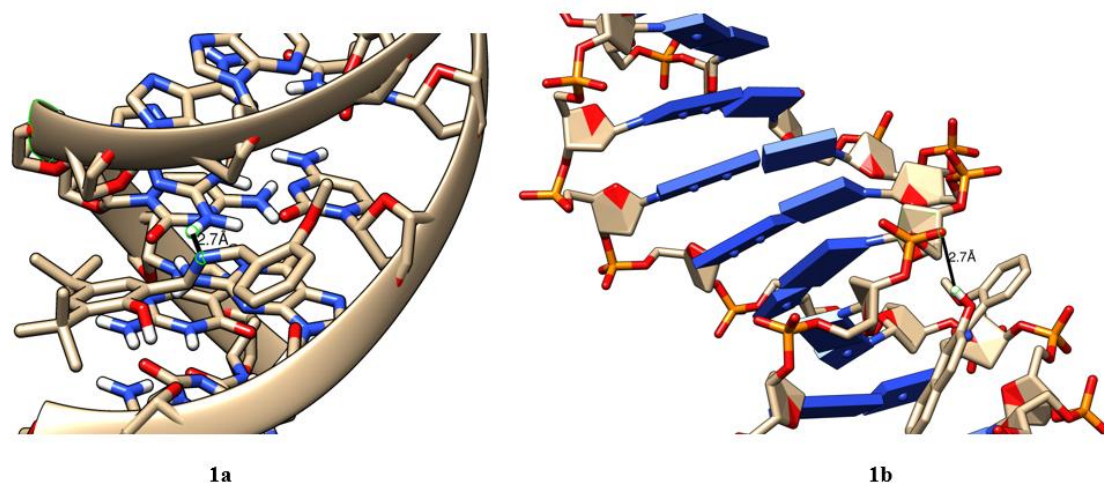


Figure 10. Hydrogen bond interactions for compounds **1a** (bond length of 2.75 Å) and **1b** (bond length of 2.65 Å) with DNA.

Dispersion interactions of molecules **1a** and **1b** with DNA are shown in **Figure 11**. Both compounds interact with DNA mainly via van der Waals and π - π interactions, and a similar number of interactions are observed, with 10 interactions for **1a** and 9 interactions for **1b**. Adenine residue 17, cytosine residue 9, and guanine residue 10 are the main residues of DNA that interact with the ligands.

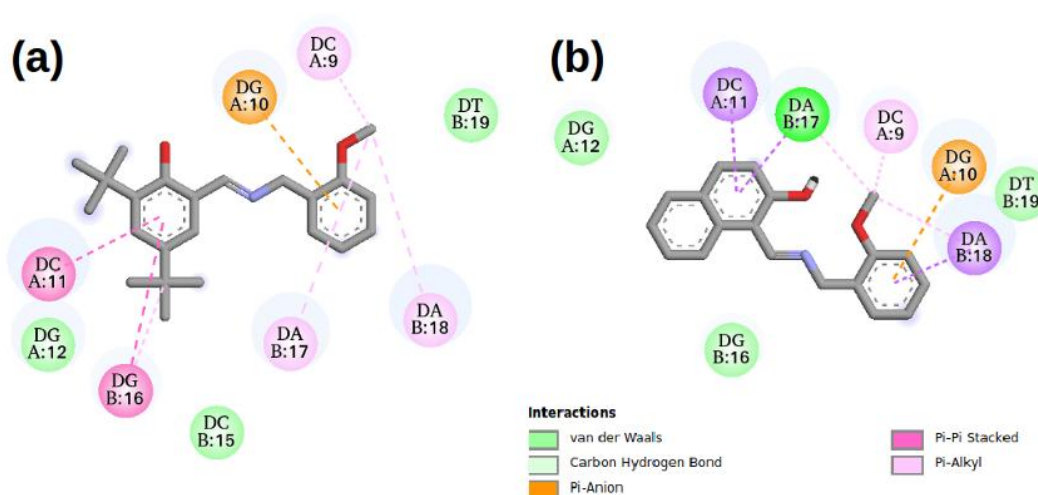


Figure 11. Interaction maps of dispersion interactions for compounds (a) **1a** and (b) **1b**.

A summary of the hydrogen bond and dispersion interactions is shown in **Table 4**. The type of H-bond and the number of dispersion interactions can explain the higher interaction of **1a** with DNA. Despite the number of aromatic rings in **1b**, interactions of the naphthalene moiety with DNA are not favorable due to the orientation that the molecule assumes to optimize polar and nonpolar interactions with the bases of DNA.

Table 4. Summary of interactions from the best pose obtained with molecules **1a** and **1b**. A: Acceptor and D: Donor atoms of hydrogen bonds.

Interactions	1a	1b
Docking binding energies (kcal mol ⁻¹)	-7.7	-7.6
Number of hydrogen bonds	1	1
H-bonded DNA residue	DG 18B	DA 16B
Distance H-A (Å)	2.75	2.65
Distance D-A (Å)	3.52	3.54
Donor angle (degrees)	132.9	148.8
Number of dispersion interactions	10	9

2.2.9. Compounds **1a** and **1b** induce low mitochondrial ROS levels in colorectal cancer and normal cell lines

Free radicals can induce various forms of DNA damage, including cross-links between DNA and other biomolecules, thereby compromising genomic integrity [66]. Previous studies have indicated that the generation of reactive oxygen species (ROS) represents a relatively selective mechanism of cytotoxicity, as tumor cells are generally more vulnerable to oxidative stress than their normal counterparts [67,68]. To investigate whether ROS generation contributes to the cytotoxicity of compounds **1a** and **1b**, intracellular ROS levels were assessed using the fluorescent probe MitoSOXTM Red, which specifically detects mitochondrial superoxide anion (O₂^{-•}).

ROS levels were quantified in colorectal cancer cell lines HCT-116 and SW620 and normal lung fibroblasts (MRC-5) following 24 h of exposure to compounds **1a** and **1b** at concentrations of 10, 30, and 50 μM. Doxorubicin (5 μM) was used as a positive control. As shown in **Figure 12 A–C**, doxorubicin induced a robust increase in mitochondrial ROS across all cell lines, with mean fluorescence intensity (MFI) values of approximately 90 in HCT-116 (**Figure 12A**), 80 in SW620 (**Figure 12B**), and 85 in MRC-5 (**Figure 12C**), confirming its well-established pro-oxidant profile.

In contrast, compound **1a** induced only minimal ROS production at all tested concentrations. MFI values remained low in all cell lines, ranging between 10 and 25, with only a slight increase at 50 μM in HCT-116 (~25; **Figure 12A**) and MRC-5 (~20; **Figure 12C**), which were not statistically significant in most comparisons. These data

suggest that compound **1a** does not promote significant oxidative stress as part of its cytotoxic mechanism.

Compound **1b** produced similarly low ROS levels at 10 and 30 μM . However, at 50 μM , a moderate but statistically significant increase in mitochondrial ROS was observed in all cell lines (**Figure 12D–F**). In HCT-116, the MFI reached approximately 45 (* $p < 0.001$; (**Figure 12D**), while in SW620 and MRC-5, MFI values were around 35 and 30, respectively ($p < 0.01$; (**Figure 12E and 12F**). These results indicate that compound **1b** may induce oxidative stress at higher concentrations, although to a much lower extent than doxorubicin.

Even at the highest tested dose, ROS levels induced by compound **1b** were significantly lower than those observed for doxorubicin, particularly in MRC-5 cells. This suggests a more favorable oxidative profile, supporting the notion that ROS generation is not the primary cytotoxic mechanism of compounds **1a** and **1b**.

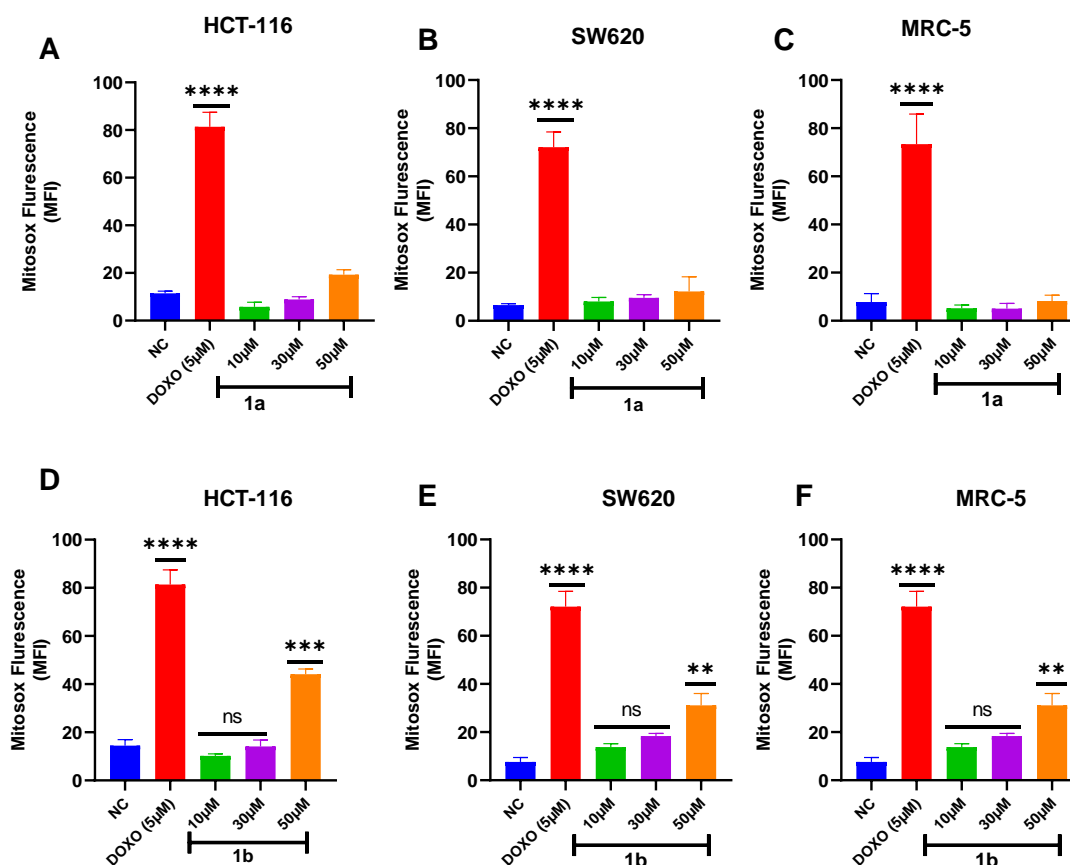


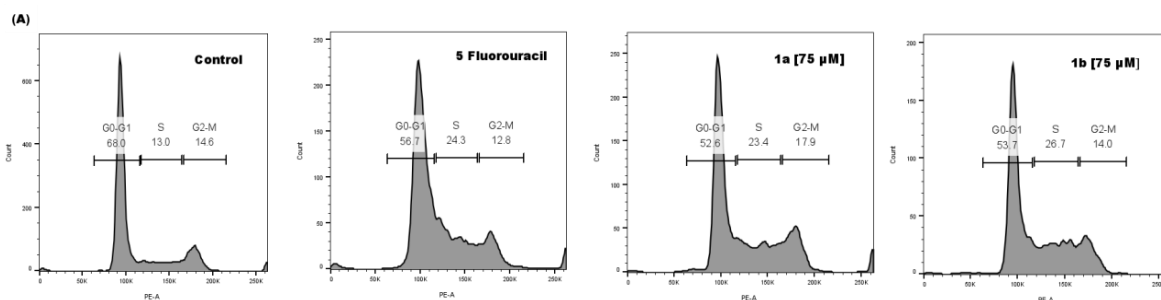
Figure 12. ROS levels in HCT-116 (A, D), SW620 (B, E), and MRC-5 (C, F) cell lines after 24 hours of exposure to **1a** and **1b** (10, 30, and 50 μM), measured by f MitoSOXTM Red probe as mean fluorescence intensity (MFI). Doxorubicin (5 μM) was used as a

positive control. Data represent the mean \pm SEM from three independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test versus the negative (NC). Significance: ns represent not significant; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ in relation to the NC group for **1a** and **1b**.

2.2.10. Cell Cycle Analysis Reveals S Phase Arrest Induced by **1a** and **1b** in Colorectal Cancer and Normal Cells

Cell cycle arrest at the G1/S, S, or G2/M checkpoints is a well-established mechanism of action for many anticancer agents. We evaluated the effects of compounds **1a** and **1b** on the cell cycle of SW620, HCT-116, and MRC-5 cells after 72 h of treatment using propidium iodide (PI) staining. Representative results are shown in **Figure 14**. Both compounds caused a significant accumulation of cells in the S phase, both in colorectal cancer cell lines and in normal cells, which is consistent with active DNA synthesis. As expected, 5-fluorouracil (positive control) also induced S phase arrest due to its known inhibition of thymidine synthesis, corroborating the results observed in the compounds under study.

The arrest in the S phase, especially at higher concentrations, was accompanied by a decrease in the population of cells in the G1 phase, suggesting impaired DNA synthesis and replication and, consequently, interference with progression to mitosis. In addition, the arrest in the S phase is likely a direct consequence of the early genotoxicity of compounds **1a** and **1b**, which cause DNA damage shortly after exposure (2 h), leading to the activation of cell cycle checkpoints, especially in the S phase. In a way, this arrest is necessary to prevent replication and forces the cell to attempt to repair the damage, with signaling mediated by checkpoints (Checkpoints 1 and 2) and activation of DNA repair mechanisms, resulting in the accumulation of cells in this phase even after 72 hours, which can potentially lead to senescence or apoptosis [69,70].



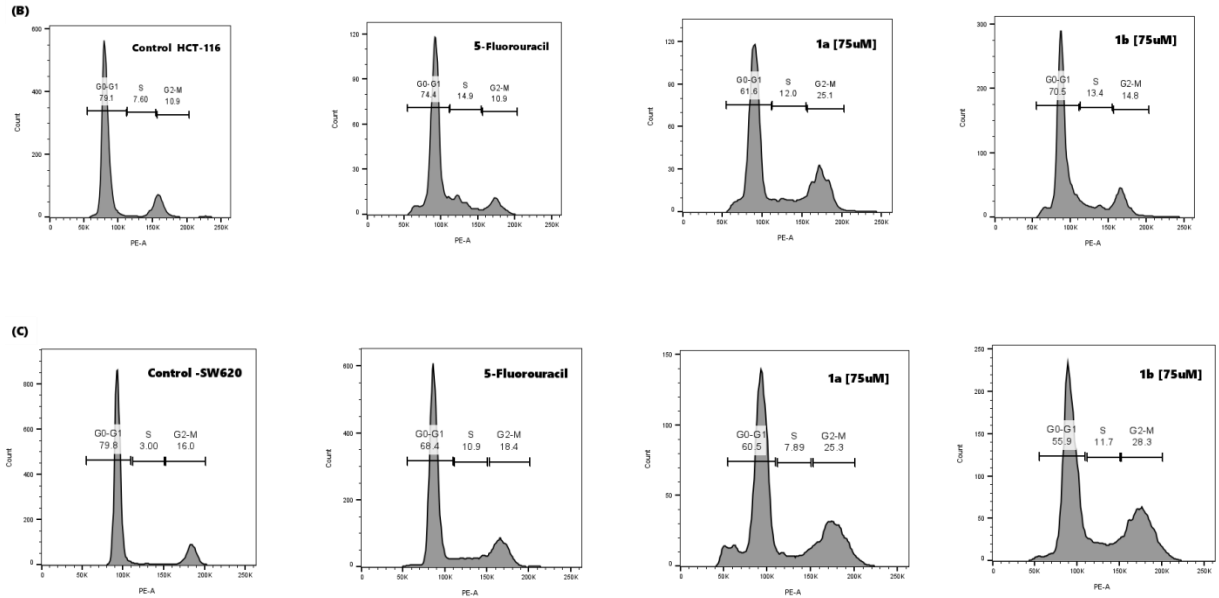


Figure 13. Representative cell cycle profiles of (A) MRC-5, (B) HCT-116 e (C) SW620 cell lines analyzed by flow cytometry. Cells were treated with vehicle (negative control), 5-fluorouracil (positive control), or compounds **1a** and **1b** (75 μ M), and stained with propidium iodide (PI). Data were analyzed using FlowJo software (<https://www.flowjo.com>).

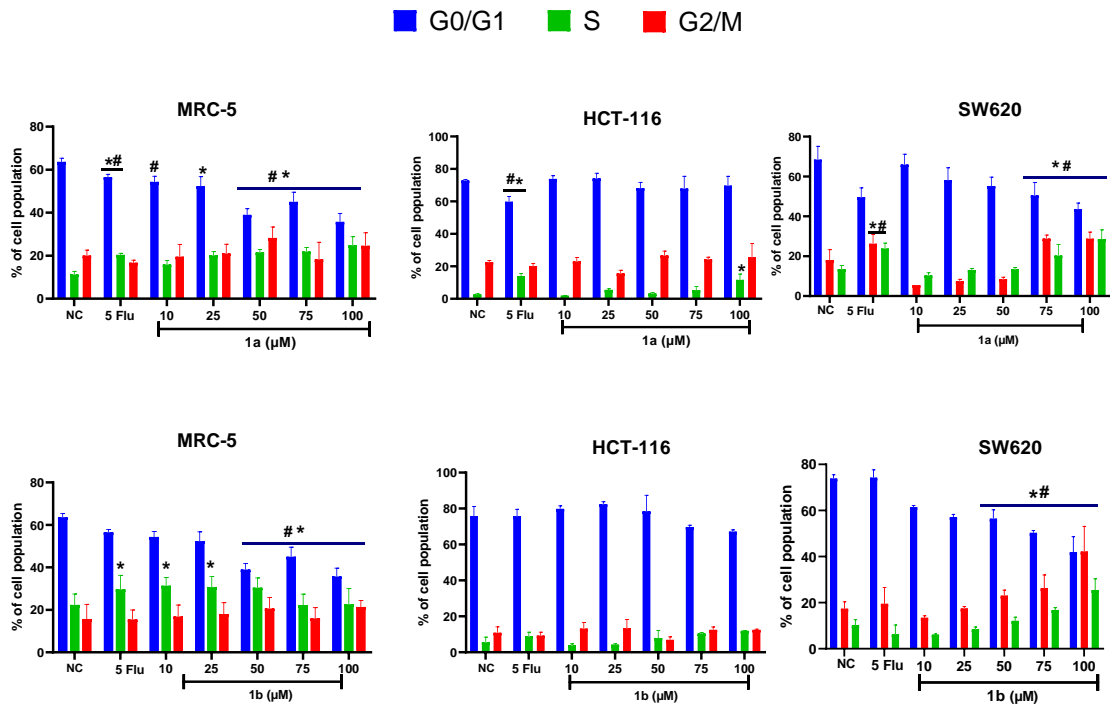


Figure 14. Panels show the quantification of MRC5, HCT-116, and SW620 cells in the G0/G1, S, and G2/M phases, comparing the effects of compounds **1a** and **1b** with the control group. Data represent the mean \pm SEM (n=3). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test versus the negative (NC). Significance: ns represent not significant; *p <0,05 for phase S; #p<0,05 for phase G0/G1 in relation to the NC group for (**1a**) and (**1b**).

2.2.11. Induction of apoptosis by 1a and 1b in colorectal cancer and normal cells

Considering that many anticancer agents exert their effects by activating apoptosis, we investigated whether **1a** and **1b** induce this type of programmed cell death. Flow cytometry was used to quantify apoptotic cell populations following treatment with 75 μ M of each compound. As shown in **Figures 15** and **Figure 156**, both compounds induced apoptosis in SW620 and HCT-116 colorectal cancer cells, in contrast to the control group, which showed no significant cell death. Additionally, the compounds exhibited cytotoxicity toward normal MRC-5 fibroblasts, with 29.8% and 37.5% of apoptotic cells detected after treatment with **1a** and **1b**, respectively. 5-Fluorouracil (5-FU) at 5 μ M served as a positive control. Data were analyzed using the Floreada.io platform (<https://floreada.io/>).

Morphological and biochemical features, including chromatin condensation, DNA fragmentation, and the formation of apoptotic bodies, characterize apoptosis. The ability of both compounds to induce apoptosis in colorectal cancer cells highlights their therapeutic potential. This type of cell death is particularly relevant in oncology, as it represents a controlled mechanism for eliminating damaged or transformed cells.

The activation of apoptosis is often associated with persistent DNA damage that fails to be repaired. In this study, cell cycle analysis revealed an accumulation of cells in the S phase, a checkpoint at which cells evaluate genomic integrity before DNA replication. This arrest, combined with the presence of early and late apoptotic cells, supports the comet assay results and suggests that compound **1b**, in particular, may induce oxidative stress severe enough to disrupt cellular homeostasis and activate intrinsic apoptotic pathways.

Taken together, the results suggest that the anticancer mechanism of **1a** and **1b** involves DNA damage, which, if not repaired, leads to the activation of apoptosis. These findings are supported by multiple complementary assays and demonstrate a consistent relationship between DNA interaction, cell cycle arrest, oxidative stress, and

cell death. It is important to emphasize that the mechanism of action of a compound, whether organic or inorganic, depends on multiple factors, including its chemical structure, concentration, exposure time, and the specific characteristics of the cell line.

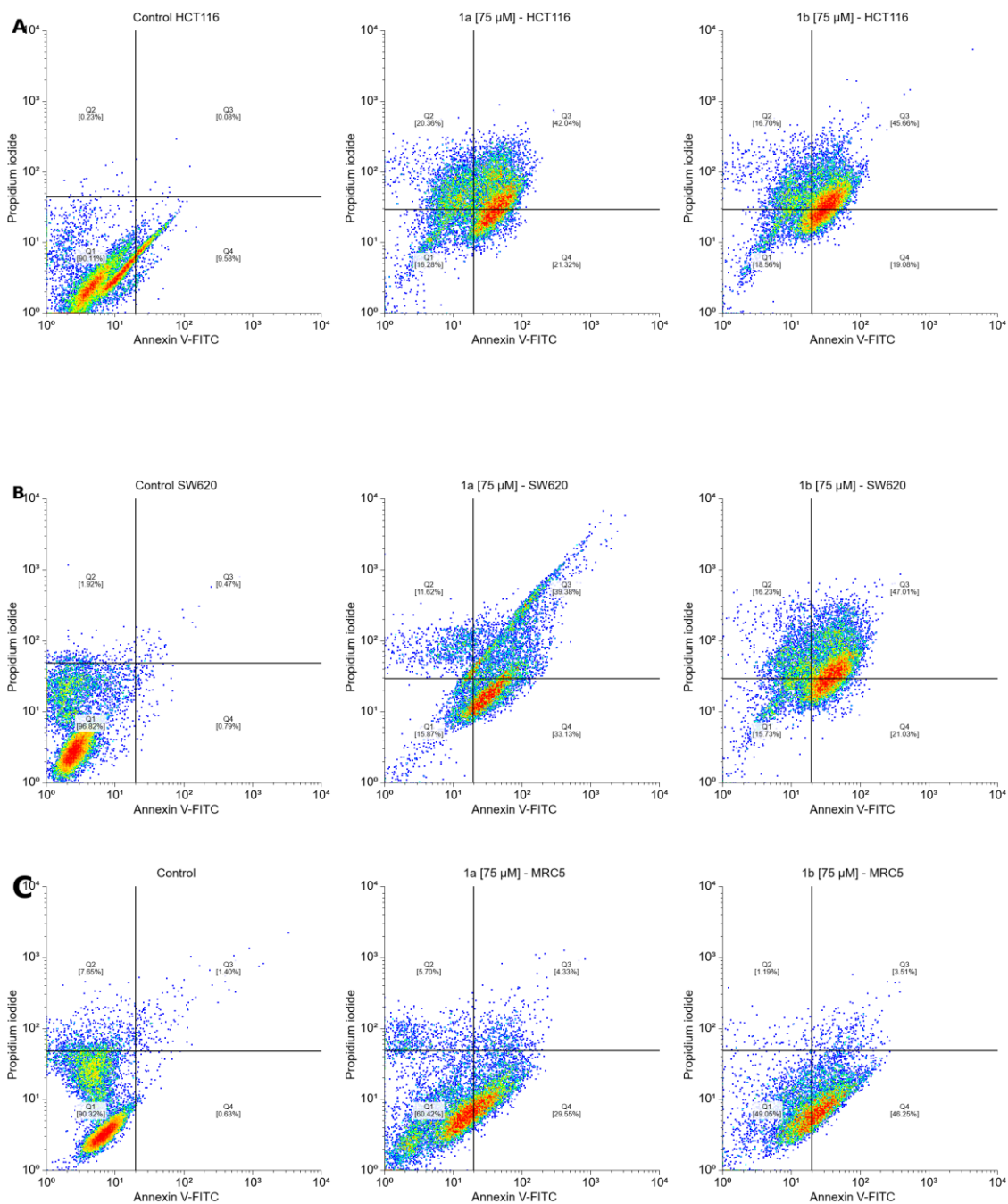


Figure 15. Apoptosis induction analyzed by flow cytometry after Annexin V-FITC/PI staining. MRC-5 (A), HCT116 (B) and SW620 (C) cell lines were treated with **1a** and **1b** at concentrations of 10, 25, 50 and 75 μM for 72 h. Representative flow cytometry dot plots are shown for cells treated with 75 μM , displaying PI stained cells (y-axis) vs

Annexin V stained (x-axis). In all four diagrams, viable cells appear in Q1 (Annexin V and PI-negative, lower left), early apoptotic cells Q4 (Annexin V-positive/PI-negative, lower right) and late apoptotic cells in Q 3 (Annexin V and PI-positive, upper right). Data were analyzed using FlowJo software (<https://floreada.io/>).

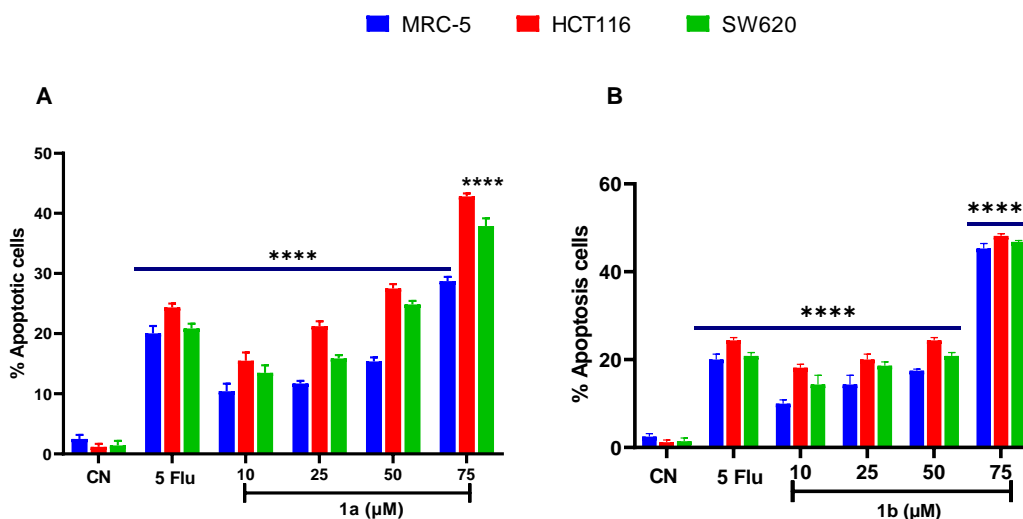


Figure 16. Quantification of apoptosis induction in MRC-5, HCT116, and SW620 treated with compounds **1a** and **1b**, compared to the control group. Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Data are presented as mean \pm SEM from three triplicate experiments. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to the control group.

2.2.13. UV-Vis Spectroscopic Evidence of Distinct Binding Behaviors of Compounds **1a** and **1b** with BSA and HSA

Serum albumin (SA) is the most abundant protein in the blood plasma of vertebrates, accounting for approximately 60% of total plasma proteins [71]. It plays essential physiological roles, including the regulation of oncotic pressure and blood pH, and the transport of various ligands such as drugs, nutrients, metabolites, and ions. It also exhibits antioxidant properties and influences cellular processes both in organisms and *in vitro* cultures [72]. Due to its wide range of functions, albumin is extensively employed in clinical, pharmacological, and biotechnological contexts, particularly in studies involving interactions with small molecules [73].

Human serum albumin (HSA) demonstrates high conformational stability and the ability to bind a broad spectrum of ligands, making it a common biomarker in

various pathologies [73]. In parallel, bovine serum albumin (BSA), which shares approximately 76% structural similarity with HSA, is often used as an experimental model due to its lower cost and easier accessibility [66,68]. Both are globular proteins composed of three homologous domains rich in α -helices [74]. However, subtle differences exist, such as the higher surface hydrophobicity of HSA compared to BSA, which can significantly influence their adsorption properties and biological behavior [72]. Although these structural differences are minor, they may affect applications involving drug delivery, cell culture maintenance, and protein engineering strategies. The interaction between albumin and ligands involves various types of intermolecular forces, including hydrophobic, electrostatic, ionic, hydrogen bonding, and, in some cases, irreversible covalent bonding [70,71]. The nature and strength of these interactions depend largely on the chemical structure of the ligands, particularly the presence and spatial arrangement of their functional groups.

The interaction of compounds **1a** and **1b** with BSA and HSA was investigated using UV–Visible absorption spectroscopy (**Figures S7–S12**). Spectrophotometric titrations were conducted by maintaining a constant concentration of the compounds (0.05 mM) while gradually increasing the concentration of the proteins (0.003–0.06 mM). This approach allows for monitoring changes in electronic absorption bands, providing valuable insights into the ligand–protein interaction process.

This assay was conducted for both compounds **1a** and **1b** to evaluate their ability to interact with serum albumins, given the importance of these proteins in drug transport and systemic distribution. Understanding the nature of these interactions can provide insight into the pharmacokinetic behavior of the ligands and inform their potential as drug candidates.

In a static binding mechanism, the formation of a ligand–protein complex significantly alters the absorption spectrum, leading to detectable changes in absorbance. Conversely, in a dynamic mechanism, where interactions are transient and depend on molecular collisions, no notable changes in the protein's absorption spectrum are typically observed [77].

For compound **1a**, a hyperchromic effect was observed in the 300–375 nm absorption range upon increasing BSA concentration (**Figure S7**), while titration with HSA resulted in a hypochromic effect in the same spectral region (**Figure S8**). In the case of compound **1b**, titration with BSA induced a hypochromic effect along with a bathochromic shift between 350 and 450 nm (**Figure S10**). In contrast, titration with

HSA caused both hyperchromic and bathochromic effects in the same range **Figure S11**).

An increase in absorbance intensity (hyperchromic effect) can be attributed to interactions with the protein surface, suggesting possible complex formation or rearrangement of the ligand's electronic environment. This may also reflect increased solvent exposure of aromatic residues such as tryptophan [78]. Conversely, a decrease in absorbance (hypochromic effect) suggests alterations in the microenvironment around these residues, potentially due to ligand insertion into more hydrophobic regions or protein conformational changes upon binding [73,74].

These findings highlight distinct interaction patterns between the Schiff base compounds and serum albumins. Compound **1a** showed a hyperchromic effect with BSA and a hypochromic response with HSA, while compound **1b** exhibited both hypochromic and bathochromic shifts upon binding to BSA, and a combination of hyperchromic and bathochromic effects with HSA. These spectral variations suggest differences in the binding mode and microenvironmental interactions between each compound and the albumin isoforms.

From a pharmacological perspective, such differences are relevant, as they may influence drug transport, distribution, and bioavailability *in vivo*. The ability of a compound to form stable or transient complexes with albumins is a key factor in determining its half-life and systemic circulation profile. Therefore, the observed protein–ligand interactions support the potential of these Schiff bases, particularly **1a**, as viable drug candidates, warranting further investigation into their pharmacokinetic properties.

2.2.14. Fluorescence Quenching Reveals Differential Affinity of 1a and 1b Toward HSA and BSA

Fluorescence spectroscopy stands as a valuable technique for investigating interactions between potential drug candidates and proteins such as human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA). These proteins contain aromatic residues, notably tryptophan, which are highly sensitive to their surrounding microenvironment. This intrinsic sensitivity enables the monitoring of conformational changes, denaturation, and binding events with other molecules [72].

Fluorescence emission spectra of BSA and HSA are presented in **Figure 177** and **18**, both exhibiting an emission band at 340 nm. Upon gradual addition of compounds **1a** and **1b**, a quenching of the emission at 340 nm was observed [80]. In the case of compound **1b**, in addition to the reduction at 340 nm, an increase in emissions at 430 nm and the presence of an isosbestic point at 350 nm were noted. As more ligand was added to the solution, the characteristic band of compound **1b** at 350 nm overlapped with that of the protein, as shown in **17B** and **18B**. The observed fluorescence quenching is associated with structural alterations in the tryptophan residues induced by interaction with the compounds [81]. Furthermore, the observed hypochromic shift reinforces the binding of the organic ligands to BSA, modifying the microenvironment around the tryptophan residue in both BSA and HSA [78].

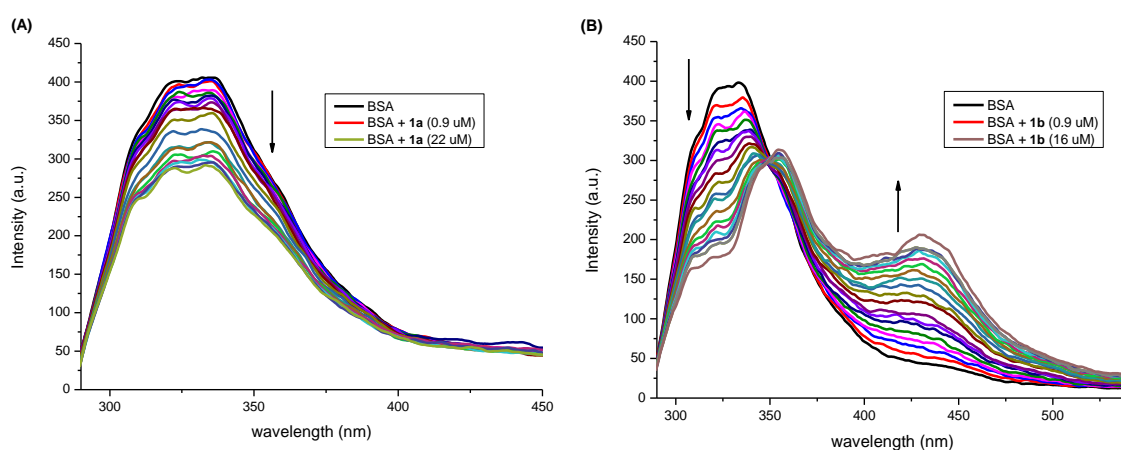


Figure 17. Fluorescence emission spectra of BSA (1.0 μM) in sodium phosphate buffer (pH 7.4) in the presence of (A) compound **1a** and (B) compound **1b**. The decrease in fluorescence intensity with increasing ligand concentration is indicated by the arrow.

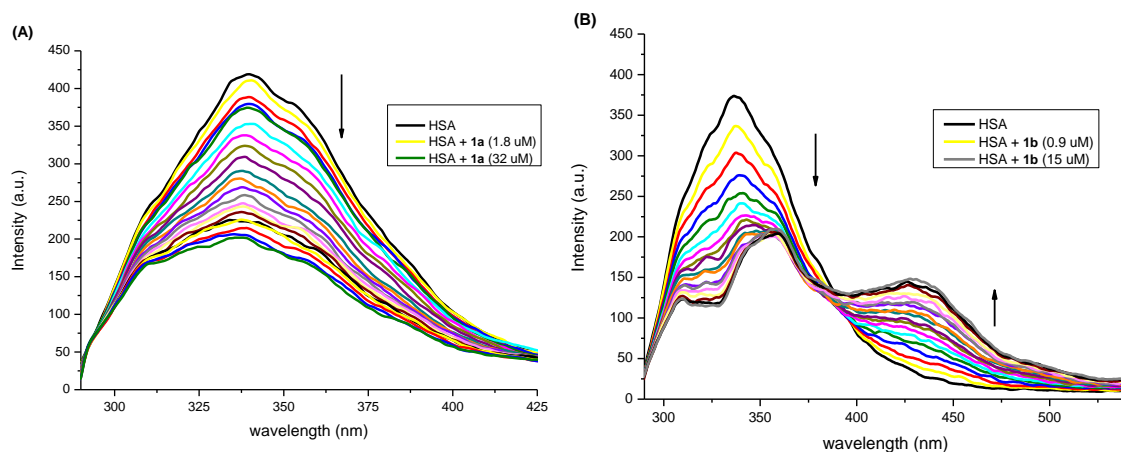


Figure 18. Fluorescence emission spectra of HSA ($1.4 \mu\text{M}$) in sodium phosphate buffer (pH 7.4) in the presence of (A) compound **1a** and (B) compound **1b**. The decrease in fluorescence intensity with increasing ligand concentration is indicated by the arrow.

Fundamental parameters such as the Stern–Volmer quenching constant (K_{sv}), the bimolecular quenching rate constant (K_q), the binding constant (K_b), the number of binding sites (n), and ΔG were determined in order to clarify the fluorescence quenching mechanism. The calculations were performed based on the Stern–Volmer equation ($K_q = K_{sv}/\tau_0$, with τ_0 typically assumed to be 10^{-8} s) and the binding equation. The corresponding plots are shown in **Figures S13** and **S14**, and the obtained values are presented in **Table 5**.

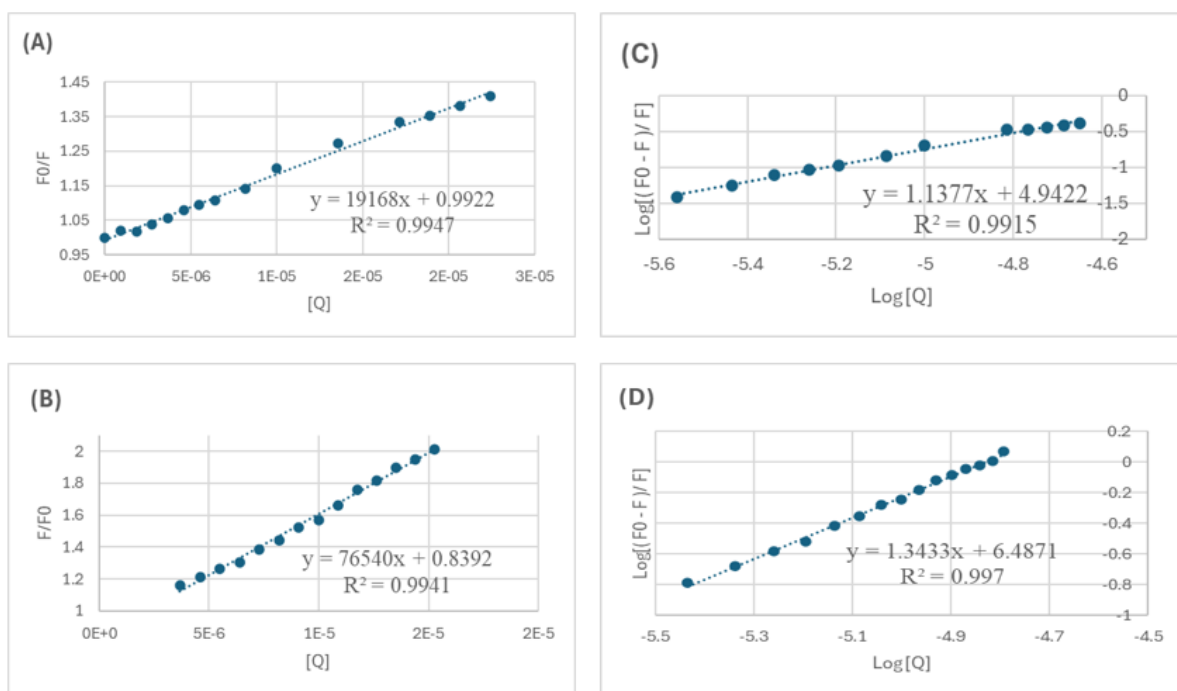


Figure S13. Analysis of binding interactions with BSA. (A and B) Stern-Volmer plots for compounds **1a** and **1b**, respectively. (C and D) Double logarithmic plots of $\log((F_0 - F)/F)$ versus $\log[Q]$, also for **1a** and **1b**, respectively, with BSA.

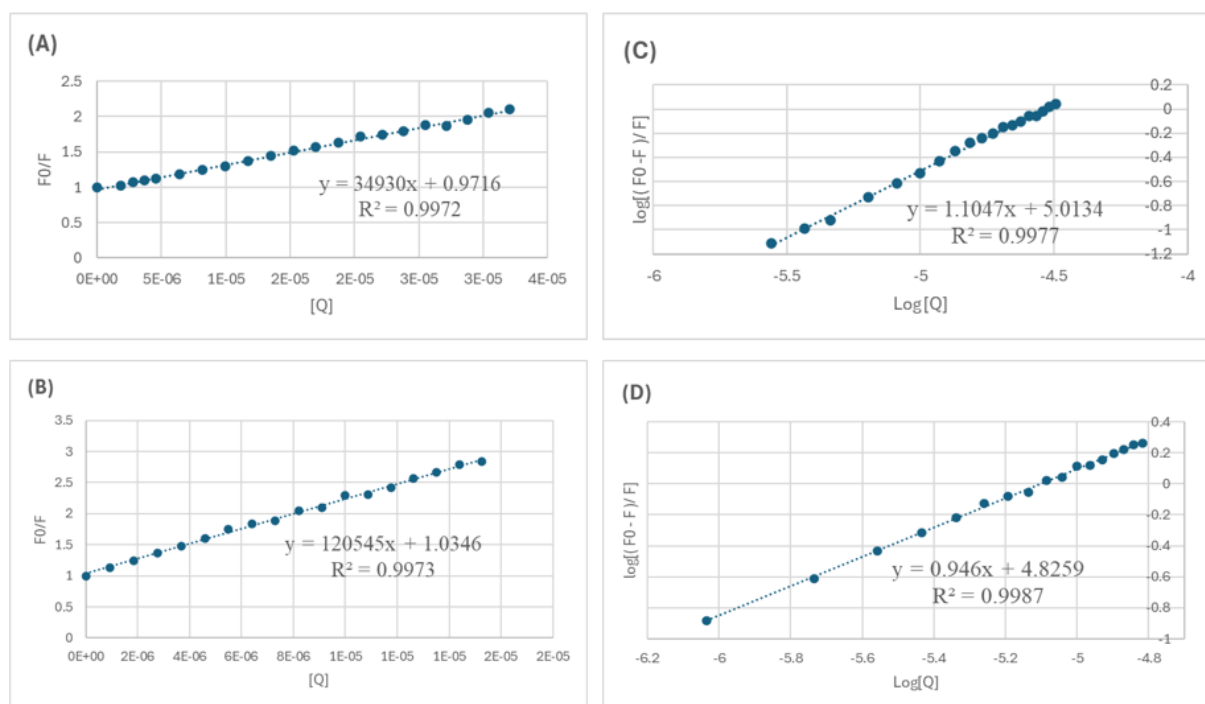


Figure S14. Analysis of binding interactions with HSA. (A, B) Stern-Volmer plots for compounds **1a** and **1b**, respectively. (C, D) Double logarithmic plots of $\log((F_0 - F)/F)$ versus $\log[Q]$, also for **1a** and **1b**, respectively, with HSA.

Table 5. Fluorescence spectral properties of **1a** and **1b** with BSA and HSA.

Compounds	Macromolecule	K_{sv} M^{-1}	K_q $M^{-1} \cdot s^{-1}$	K_b M^{-1}	N	ΔG kJ/mol
1^a	BSA	1.91×10^4	1.91×10^{12}	8.75×10^4	1.1	-28.20
	HSA	3.49×10^4	3.49×10^{12}	1.03×10^5	1.1	-28.61
1b	BSA	7.65×10^4	7.65×10^{12}	3.07×10^6	1.3	-37.02
	HSA	1.20×10^5	1.20×10^{13}	6.69×10^4	0.95	-27.54

Two distinct fluorescence quenching mechanisms are considered in the analysis of interactions between quenchers and macromolecules: dynamic (or collisional) quenching and static quenching. Dynamic quenching occurs when the quencher collides with the fluorophore in its excited state, promoting its return to the ground state without photon emission. In contrast, static quenching results from the formation of a non-fluorescent complex between the quencher and the biomolecule in the ground state [78].

The high binding constant (K_b) values and the number of binding sites close to 1 ($n \approx 1$) suggest a predominantly static quenching mechanism, indicating the formation of a stable complex between the ligands and the proteins, which leads to a decrease in fluorescence emission [3]. Furthermore, the quenching rate constants (K_q) obtained for compounds **1a** and **1b** exceed the theoretical maximum diffusion-controlled quenching limit in solution ($2.0 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$) (79), reinforcing that the quenching process is primarily static in nature. In addition, the negative ΔG values confirm that the interaction between the compounds and the proteins is spontaneous at 298.15 K.

A preferential binding is also observed. Compound **1a** exhibits higher affinity for HSA, whereas compound **1b** interacts more strongly with BSA. Considering that HSA possesses a greater content of α -helical structures, it is plausible that hydrophobic interactions are more intense or numerous compared to BSA. Thus, HSA tends to form more effective interactions with hydrophobic or amphiphilic ligands, while BSA, being relatively more hydrophilic, favors interactions with more polar molecules, including hydrogen bonds [74].

3. Experimental Section

3.1. Chemistry

All solvents and reagents used for the preparation of the Schiff base derivatives were obtained from commercial suppliers and used without further purification. The following chemicals were purchased from Sigma-Aldrich: 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride (Neutral Red), dimethyl sulfoxide (DMSO), crystal violet, calf thymus DNA (Ct-DNA), bovine serum albumin (BSA), Human serum albumin (HSA), and cisplatin. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), low-melting-point agarose (LMP), phosphate-buffered saline (PBS; Na₂HPO₄, KH₂PO₄, and KCl, pH 7.4), fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin were purchased from Gibco-BR. Human cell lines (MRC-5, MCF-7, SW620, and HCT116) were kindly provided by the Rio de Janeiro Cell Bank (Brazil). The Schiff base derivatives 2,4-di-tert-butyl-6-[(2-methoxyphenyl)methyliminomethyl]phenol (**1a**) and 1-[(2-methoxyphenyl)methyliminomethyl]naphthalen-2-ol (**1b**) were synthesized according to previously reported procedures, as described in the literature [39].

3.1.1. Instrumentation

Infrared spectra were performed on an FT-IR Bruker Alpha Spectrometer operating in the ATR mode. NMR spectra were recorded on a Bruker AM-500 spectrometer operating at 25 °C. ¹H and ¹³C NMR chemical shifts are reported in ppm vs. SiMe₄ and were determined by reference to the residual solvent peaks. Elemental analyses were performed by the Analytical Central Service of the Institute of Chemistry-UFRGS (Brazil) and are the average of two independent determinations. Ct-DNA and BSA interaction in M51 – Bel Spectrophotometer from 190 to 1000 nm. The neutral red assay was performed on SpectraMax® M2 and M2e systems from Molecular Devices. The fluorescence spectra were obtained using a PerkinElmer LS-55 fluorescence spectrophotometer. The instrument parameters were maintained with a scan speed of 500 nm/min, using a xenon lamp. For the spectrophotometric measurements, the excitation wavelength was set at 280 nm, with a spectral range from 200 nm to 575 nm.

3.1.2. Biological Assessment

3.1.2.1. Cell Culture and Treatments

Four human cell lines were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, RJ, Brazil): primary colorectal cancer (HCT116), metastatic colorectal cancer (SW620), metastatic breast cancer (MCF-7), and normal human lung fibroblasts (MRC-5). All culture media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) for DMEM and 20% for RPMI, along with 100 µg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin, and 1.5 g/L sodium bicarbonate. HCT116, SW620, and MRC-5 cells were cultured in DMEM, while MCF-7 cells were maintained in RPMI. Cells were grown in 25 cm² culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, following the guidelines of the American Type Culture Collection (ATCC). Culture media were replaced as needed until the cells reached approximately 80% confluence. Mycoplasma testing was performed to confirm the absence of fungal or bacterial contamination. For treatment, compounds **1a** and **1b** were dissolved in DMSO and added to the culture medium at the desired concentrations immediately before use. The final DMSO concentration in the medium did not exceed 0.1%, and control cells were exposed to the same concentration of vehicle. Cells were harvested using 0.15% trypsin (Gibco Life Technologies, USA) in PBS and used for the subsequent biological assays.

3.1.2.2. Cell Viability Assessment by MTT Assay

The MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), as originally described by Mosmann [83], was used to assess cell viability in human tumor cell lines (HCT116, SW620, and MCF-7) as well as in a non-tumoral human cell line (MRC-5). This colorimetric method is based on the reduction of MTT to insoluble purple formazan crystals by mitochondrial dehydrogenase enzymes in metabolically active cells. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 1.0×10^6 cells/well and allowed to adhere for 24 h. They were then treated with Schiff base compounds **1a** and **1b** at varying concentrations (5, 10, 25, 30, 50, 60, 85, and 100 µM) and incubated for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Following treatment, cells were washed with PBS and incubated with 100 µL of serum-free culture medium containing MTT (1 mg/mL) for 3 h at 37 °C. The medium was then removed, and the resulting formazan crystals were solubilized with 100 µL of DMSO under gentle agitation for 30 minutes. Absorbance was measured at 540 nm using a SpectraMax

microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Each experiment was performed in triplicate and repeated at least three times. The IC_{50} values, defined as the concentration required to inhibit 50% of cell viability after 72 h of exposure, were calculated, and graphs were constructed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3.1.2.3. Cell Viability Assessment by Neutral Red Assay

Human tumor cell lines (HCT116, SW620, and MCF-7) and the non-tumoral cell line MRC-5 were seeded in 96-well plates and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were then treated with compounds **1a** and **1b** at concentrations of 10, 25, 50, 75, and 100 μM. Following the IC_{50} values determined by the MTT assay, 72-hour incubation was performed under identical temperature and CO₂ conditions. The treatment medium was then removed, and the cells were washed with 100 μL of PBS. Next, 100 μL of neutral red dye (0.3 mg/mL in serum-free culture medium) was added to each well, and the plate was incubated for another 3 h under standard conditions. The neutral red was then removed, the cells were washed with PBS at the appropriate pH, and 100 μL of desorption solution (EtOH:dH₂O:CH₃COOH – 50:49:1, v/v) was added to each well. The plate was shaken for 20 min, and the absorbance was read using a SpectraMax spectrophotometer at 540 nm. The test was carried out in triplicate. The selectivity index (SI) was calculated as a measure of the compound's selectivity toward tumor cell lines compared to normal cells, using the formula $SI = IC_{50}(\text{normal cells}) / IC_{50}(\text{tumor cells})$. SI values close to 1 indicate low selectivity, suggesting that the compound affects both cell types similarly. When $SI > 1$, it suggests greater toxicity toward tumor cells. SI values equal to or greater than 5 may indicate that the compound has promising therapeutic potential [84]. The SI and IC_{50} values were calculated and expressed as mean ± SD, using GraphPad Prism 5.0 software.

3.1.2.4. Trypan blue exclusion test of cell viability

Cell viability was measured using the trypan blue exclusion assay after treatment with 10, 25, 50, 75, and 100 μM of compounds **1a** and **1b** for 72 h in triplicate. After removing the medium containing the compound, the cells were washed with PBS, treated with trypsin, and resuspended in 200 μL of complete culture medium with

serum. To distinguish live cells from dead cells, a suspension of each cell line was mixed with a 0.4% Trypan blue solution and incubated for 5 minutes at room temperature. The mixture was made in a petri dish using a total of 20 μL of cell suspension (10 μL) and Trypan blue (Sigma, USA, Merck) (10 μL) and was immediately placed in a cell counting dish. Cells that absorbed the dye were considered dead. After 5 minutes of incubation, the cells were counted using the CountessTM II automated cell counter (Thermo Fisher, USA). Each treatment or control was tested twice in triplicate. An ideal range of viable and/or dead cells (1×10^5 and 10×10^6 cells/mL) per unit volume was used. The SI and IC_{50} values were calculated, and graphs were constructed using GraphPad Prism 5 software. Cell viability was expressed as mean \pm standard deviation (SD).

3.1.2.5. Clonogenic Assay

This assay was performed on all normal and human tumor cell lines (MCF-7, SW620, HCT-116, and MRC-5), which were initially seeded in 6-well plates at a density of 300 cells/well in 1 mL of supplemented medium and incubated for 24 h. After incubation, the cells were treated with compounds **1a** and **1b** at concentrations of 10, 25, 50, 75, and 100 μM for 72 h to assess cell survival based on the ability of a single cell to grow into a colony. The treatment-containing medium was then removed, and the cells were washed with 1 mL of PBS. Due to the different proliferation rates among the cell lines, the incubation period varied: 8 days for MRC-5, 10 days for SW620 and HCT-116, and 14 days for MCF-7. After the incubation period, cells were washed and fixed with 1 mL of methanol for 30 minutes, followed by staining with 0.5% (w/v) crystal violet. The wells were rinsed with distilled water and allowed to dry at room temperature. Colonies were manually counted by visual inspection, and cell survival was expressed as a percentage relative to the corresponding negative control (NC).

3.1.2.6. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet assay)

The Schiff base compounds (**1a** and **1b**) did not exhibit significant cytotoxic activity against breast cancer cells (MCF-7) at the tested concentrations; therefore, genotoxicity assessment was conducted only on colorectal cancer cells (SW620 and HCT-116) and non-tumoral cells (MRC-5). HCT-116, SW620, and MRC-5 cells were seeded at a density of 1.0×10^5 cells per well in 24-well plates containing 350 μL of supplemented DMEM and incubated for 24 h at 37 $^\circ\text{C}$ with 5% CO_2 . Cells were then

treated with compounds **1a** and **1b** at concentrations of 10, 25, and 50 μM for 2 and 24 h, based on the IC_{50} values obtained from previous viability assays. Following treatment, cells were washed with 100 μL of PBS, trypsinized, and resuspended in complete DMEM. Microscope slides pre-coated with a layer of normal melting point agarose were prepared with 20 μL of the cell suspension mixed with 0.75% low melting point agarose. Once the gel solidified, the slides were placed back-to-back and immersed in an ice-cold lysis solution [10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10% DMSO, and 1% Triton X-100, pH 10] for at least 1 h to lyse the cells and release intracellular content. Slides were then transferred to a horizontal electrophoresis chamber filled with ice-cold alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) and incubated in the dark for 20 min to allow DNA unwinding. Electrophoresis was performed at 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) for 15 min. Afterward, the slides were neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), fixed (15% trichloroacetic acid, 5% zinc sulfate, and 5% glycerol), and stained with silver nitrate. Following staining, the slides were washed with distilled water and allowed to dry for 24 h at room temperature before analysis. All steps were performed under dim light to prevent additional DNA damage. DNA migration patterns were observed using an optical microscope, and 100 cells were randomly selected for each concentration test. DNA damage was scored according to comet class: class 0 for intact nuclei with no tail; class 1 for nuclei with a small tail; class 2 for a tail one to two times the diameter of the nucleus; class 3 for a tail longer than twice the nuclear diameter; and class 4 for maximum DNA damage [85] (**Figure S15**). Images were captured using an EVOS™ microscope (Invitrogen™ AMF4300, Canada). The damage index (DI) was calculated for each replicate, ranging from 0 (100 intact cells \times 0) to 400 (100 cells with class 4 damage \times 4).

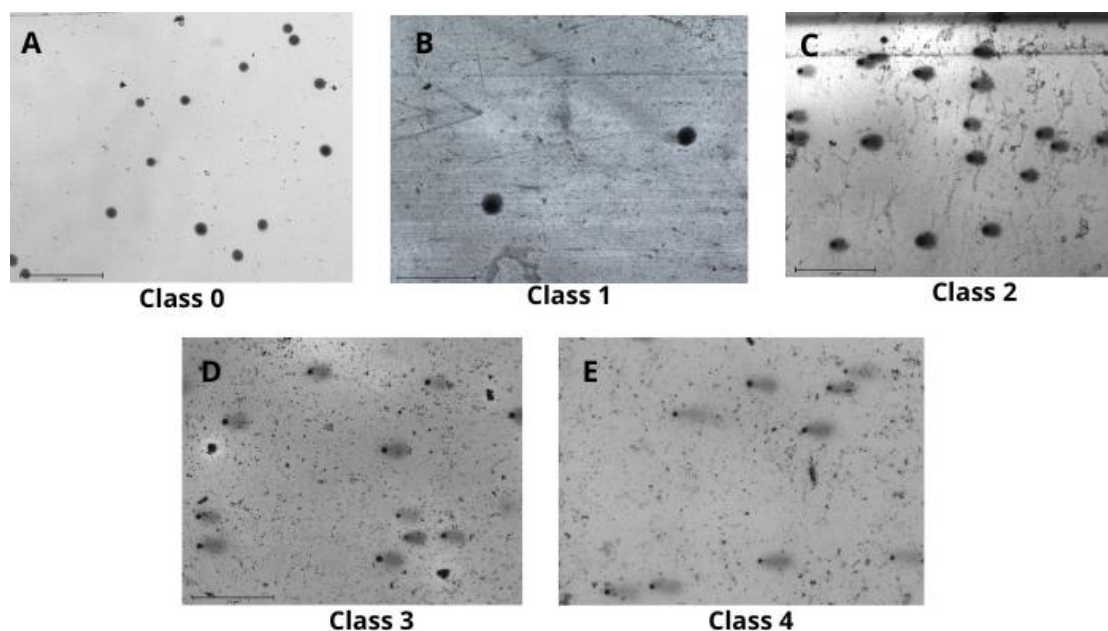


Figure S15. Classification of DNA damage by alkaline comet assay (scale bar: 275 μM). The images illustrate five classes of DNA damage, ranging from class 0 to class 4, based on DNA migration during electrophoresis. Source: author's archive.

3.1.2.7. *Ct-DNA binding study by absorption titration*

The concentration of calf thymus deoxyribonucleic acid (Ct-DNA) was determined by measuring its absorbance using UV-Vis spectroscopy at a wavelength of 260 nm, and with an ϵ value (molar extinction coefficient) of $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ct-DNA purity was verified by calculating the A_{260}/A_{280} absorbance ratio. A value greater than 1.80 indicates the absence of protein influence on DNA (83). The UV-Vis electronic spectra for compounds **1a** and **1b** without and upon successive Ct-DNA solution additions were obtained at 298.15 K and 250-1000 nm in a DMSO (0.1%)/Tris-HCl buffer (pH 7.4) mixture solution. The absorbance spectrum of the sample was collected at a 50 μM concentration of the test compound and varying concentrations of Ct-DNA, ranging from 0.7 μM to 12.9 μM . The experiments were conducted in sets of 3 ($n = 3$) to acquire consistent results.

3.1.2.8. *Reactive oxygen species (ROS) detection by flow cytometric analysis*

The ability of the Schiff base compounds **1a** and **1b** to induce the formation of reactive oxygen species (ROS) was evaluated in three human cell lines: MRC-5, HCT-116, and SW620. The Invitrogen™ MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator Kit (cat. no. M36008; Thermo Fisher Scientific) was used to quantify

superoxide levels within the mitochondria of viable cells. Cells were exposed to four different concentrations of the compounds (10, 30, and 50 μM) for 24 h at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. Cells treated with 5 μM doxorubicin served as the positive control. After treatment, cells were washed with PBS and stained with 200 μM of pre-diluted MitoSOX™ Red reagent in PBS. The staining was performed in the dark, and cells were incubated for 20 min at 37 °C. After incubation, the staining solution was removed, and cells were transferred to centrifuge tubes and spun at 2000 rpm for 10 min to pellet the cells. The supernatant was discarded, and the entire cell pellet was transferred to flow cytometry tubes for analysis. A minimum of 10,000 gated events were acquired per sample using a BD Biosciences FACS Canto flow cytometer, with data collected in the FITC and PerCP channels, following the protocol described by Kauffman et al. (2016) [87]. Data were analyzed using FlowJo software (v7.6.3; Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) and expressed as dot plots and histograms showing cell counts based on fluorescence emission, representing the proportion of cells with mitochondrial superoxide accumulation. A bar graph of the mean fluorescence intensity was generated using Prism 6 (GraphPad Software, version 6.0b) to quantify mitochondrial ROS levels.

3.1.2.9. Cell cycle analysis

Flow cytometry analysis (FACS) was performed to determine the proportions of cells and the perturbations in the different phases of the cell cycle, induced by compounds **1a** and **1b**. Cells were plated at a density of 1×10^5 cells per well (24 h), and cells were treated with **1a** and **1b** at different concentrations (10, 25, 50, 75, and 100 μM). 5-Fluorouracil (5-FU) was used as the reference chemotherapy (positive control). After treatment, the cells were collected by trypsinization, washed twice with PBS, and fixed in 70% ethanol and stored at -20 °C for 2 h until the second step, PI staining. Subsequently, the fixed cells were centrifuged (2000 rpm, 4°C, for 10 min) and washed twice with PBS to remove traces of ethanol. The cells were resuspended in 250 μL of 0.5% Trinton X-100 (diluted in PBS) for exactly 5 min for each sample and centrifuged again (2000 rpm, 4°C, for 10 min). The cells were then treated with RNase for 30 minutes and stained with propidium iodide (PI) for 30 min at room temperature. The cell cycle profile was analyzed using FACS Symphony flow cytometry, considering that 10,000 to 20,000 events were acquired from each sample.

3.1.2.10. Cell death assay

An annexin V-FITC apoptosis detection kit was used to assess the percentage of cell death by flow cytometry, according to the manufacturer's protocol (BD Bioscience). The cells were plated at a density of 6×10^5 cells/mL in a 24-well plate and treated with different concentrations of compounds (10, 30, 50, and 75 μM) for a period of 72 h at 37 °C and 5% CO_2 . Subsequently, the treated cells were washed in PBS and collected with trypsin, which was inactivated by the addition of complete medium. The cells were centrifuged at 3000 rpm for 5 min and suspended in 500 μL of an annexin-binding buffer at room temperature. The cells were stained with 10 μL of annexin V-FITC and 10 μL of propidium iodide (PI, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated at room temperature for 15 min under light-free conditions, following the manufacturer's instructions (Apoptosis Detection Kit FITC; Invitrogen, USA). The untreated cells were considered the control group, and those treated with 5 μM of 5-fluorouracil (5-FU) were considered the positive reference group. The samples were then immediately analyzed by BD FACSCaliburTM flow cytometry. Annexin V was detected as green fluorescence, and propidium iodide (PI) as red fluorescence, and bivariate analysis was performed at FL1 for Annexin V and FL3 for PI detection channels. Data was collected from 10,000 cells per sample, and dot plots of FL1 vs FL3 were generated. The experiment was performed on at least three different occasions, and the acquisition data was interpreted using FlowJo software (version 10.8, USA).

3.2.1.11. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with **1a** and **1b**

The interaction of compounds **1a** and **1b** with bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins was investigated through UV-Vis absorption and fluorescence quenching titrations. Stock solutions of bovine serum albumin (BSA, 0.357 mM) and human serum albumin (HSA, 0.486 mM) were prepared by dissolving 40 mg of each protein in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The solutions were stored at 8 °C and protected from light. Protein concentrations were confirmed by UV-Vis spectrophotometry using molar extinction coefficients of $\epsilon_{(280)} = 44,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for BSA and $\epsilon_{(280)} = 36,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for HSA. The metal complex was initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and subsequently diluted in phosphate-buffered saline (PBS) to obtain the desired working concentrations. For UV-Vis spectroscopic measurements, the final concentration of the complex in the cuvette was adjusted to 0.05 mM, with a final DMSO content of 5% (v/v). To evaluate the interaction between

the complex and the serum proteins, successive aliquots of 15 μL of either BSA or HSA stock solution were added to the compound solution. After each addition, UV-Vis absorption spectra were recorded to monitor changes in absorbance intensity and possible shifts in characteristic absorption bands, enabling analysis of binding events and interaction dynamics.

For fluorescence quenching titrations studies, the concentrations of BSA and HSA were fixed in the cuvette at 0.1 μM and 0.14 μM , respectively. Gradual volumes of compounds **1a** and **1b** solutions (5 μL –185 μL), at a concentration of 500 μM , were then added to the BSA and HSA solutions. The initial and final concentrations of the compounds ranged from 0.9 μM to 32 μM . After each addition, fluorescence spectra were recorded to monitor changes in fluorescence intensity and possible shifts in the characteristic bands.

The static and dynamic quenching processes were evaluated using the Stern–Volmer Equation (79).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{Eq 1.}$$

Where F_0 and F are the fluorescence intensities of albumin (HSA or BSA) in the absence and presence of the ligand, respectively. K_{sv} and $[Q]$ represent the Stern–Volmer constant and the concentration of the compound, respectively. The bimolecular quenching rate constant (K_q) is calculated using Equation 2 [88, 89].

$$K_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad \text{Eq 2.}$$

Where τ_0 is the average fluorescence lifetime of the fluorophore in the absence of a quencher, with a value of 10^{-8} s. The number of binding sites (n) was calculated using the double logarithmic equation (85).

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Eq 3.}$$

Where K_b is the binding constant. For the calculation of the Gibbs free energy (ΔG), Equation 4 was used. (85).

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad \text{Eq 4.}$$

Where R is equal to $8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ and T is the temperature in Kelvin.

3.1.2.12. Statistical analysis

In this study, the mean values were obtained from at least three independent experiments for each technique or test. The data were compared with GraphPad Prism software (GraphPad InStat – NIH), using the ANOVA test (one-way or two-way, depending on the variable analysed), followed by the Dunnett multiple comparison test, Tukey's post hoc test, or Student's t-test, when appropriate. Cell cycle and cell death assay data were analysed using flowJo.com and floreada.io software, respectively, and subsequently analyzed with GraphPad Prism software, followed by Student's t-test. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$, compared to the control group, and were expressed as mean \pm standard deviation (SD).

3.3. Docking calculations

Initial structures of **1a** and **1b** were optimized with xtb [90]. Conformations of compounds **1a** and **1b** were generated with Crest (88) at the gfn2 level of theory [92] using water as implicit solvent. Target structure of DNA (PDB Code: 1BNA) [93] was prepared via AutoDock Tools with the removal of organic and solvent molecules [94]. Visualization of the interactions between the ligands and DNA was produced with the UCSF Chimera software [95]. To elucidate the specific interactions between ligand moieties and receptor residues, the Protein–Ligand Interaction Profiler (PLIP) [95] and the Discovery Studio tool (93) were employed. Visual Molecular Dynamics (VMD) [97] was used to visualize the interactions between functional groups.

4. Conclusion

This study has demonstrated that Schiff base derivatives **1a** and **1b** possess promising antitumor profiles against colorectal cancer cell lines, with **1a** displaying superior potency and selectivity. Compound **1a** achieved IC_{50} values of 36.4 μ M (HCT-116) and 48.5 μ M (SW620), coupled with an SI > 3.0 relative to normal MRC-5 fibroblasts, a selectivity that underscores its potential as a lead compound. In contrast, **1b** showed moderate cytotoxicity ($IC_{50} \approx 56\text{--}60$ μ M for colorectal lines) with a lower SI, suggesting a narrower therapeutic window.

Mechanistic investigations reveal that **1a** principal mode of action is direct interaction with DNA, as evidenced by a high binding constant ($K_b = 1.1 \times 10^5$ M^{-1}) and marked genotoxicity at early time points (significantly elevated damage index starting from 10 μ M after 2 h). This direct DNA targeting precipitates S-phase arrest, likely via activation of intra-S checkpoints, and culminates in apoptosis, confirmed by

flow cytometry (~40% Annexin V-positive cells at 75 μM). By contrast, **1b** exhibits a lower DNA affinity ($K_b = 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) and relies partially on mitochondrial ROS generation for cytotoxic effects, requiring higher concentrations ($\geq 50 \mu\text{M}$) to induce significant genotoxicity. The complementary nature of these two mechanisms, direct genotoxicity (**1a**) and oxidative stress (**1b**), suggests that structural features of the phenolic core (*tert*-butyl vs. naphthyl substituents) modulate each compound's intracellular targeting. Molecular docking shows that the binding affinities of the molecules are very similar, with a slightly lower value to **1a** ($-7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$) as compared to **1b** ($-7.6 \text{ kcal mol}^{-1}$). Moreover, compound **1a** exhibits higher affinity for HSA, whereas compound **1b** interacts more strongly with BSA. From a translational perspective, the pronounced selectivity of **1a** toward colorectal cancer cells highlights its potential for further development. Incorporation of metal ions (e.g., Cu (II) into the Schiff base scaffold could amplify DNA intercalation and redox activity, yielding derivatives with enhanced potency and tumor specificity. Additionally, optimization of lipophilicity and electronic properties, guided by the observed structure–activity relationships, may improve cellular uptake and pharmacokinetic profiles. In conclusion, Schiff base **1a** emerges as a lead candidate for anticancer drug development, with a clear mechanism centered on DNA binding and apoptosis induction. Further studies should explore metal coordination, *in vivo* efficacy, and ADME/Tox profiling to advance these ligands toward preclinical validation and eventual therapeutic application.

Declaration of Competing Interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication, and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 10/2021-ARD/ARC-Grant numbers 22/2551-0000500-4 and FAPERGS).

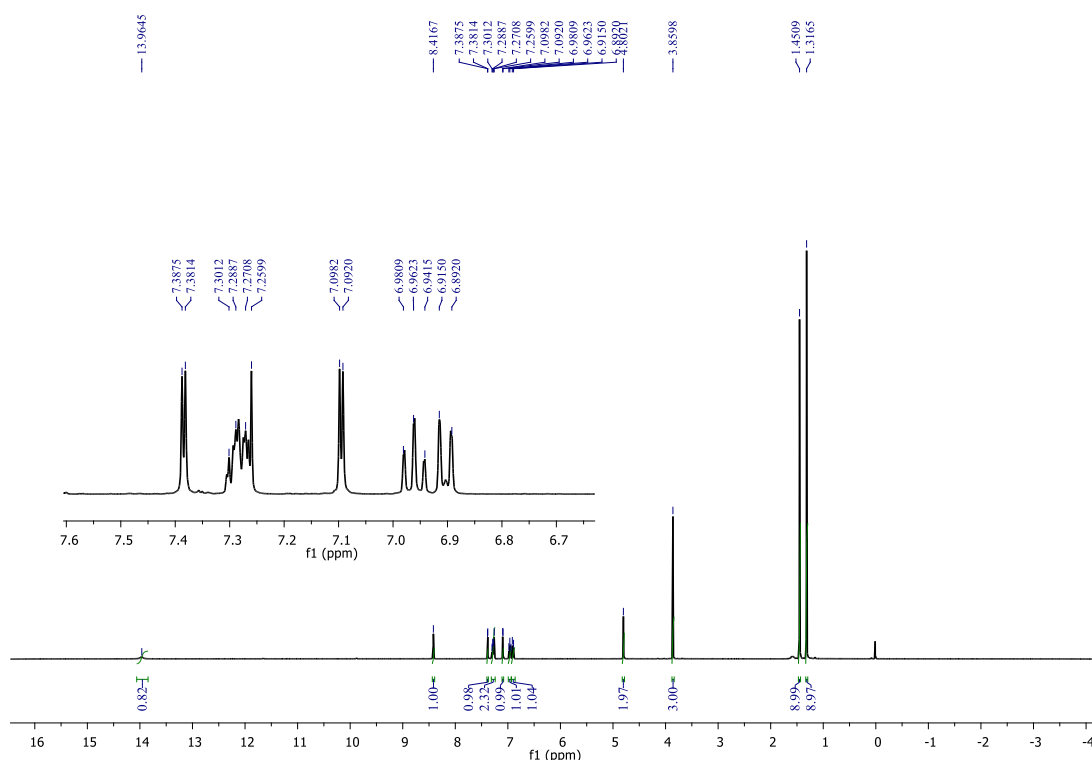
Supporting Information

1. Experimental section

1.1. Synthesis of compound 1a

Compound **1a** was obtained by reacting 2.00 g (14.6 mmol) of 2-methoxybenzylamine with 3.42 g (14.6 mmol) of 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxybenzaldehyde in refluxing methanol for 18 h. After cooling, a light-yellow solid was collected and dried under vacuum. The yield was 91.0%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ_{H} : 1.30 (s, 9H, 3 CH_3), 1.43 (s, 9H, 3 CH_3), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 4.79 (s, 2H, CH_2), 6.88–6.96 (m, 2H, Ar–H), 7.08 (d, 1H, Ar–H), 7.24–7.28 (m, 2H, Ar–H), 7.36 (d, 1H, Ar–H), 8.40 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}-$), 13.95 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 29.58 (3 CH_3), 31.67 (3 CH_3), 34.26 (C, *tert*-butyl), 35.17 (C, *tert*-butyl), 55.47 (CH_2), 57.65 (OCH_3), 110.41–139.97 (Ar–C), 157.31, 158.41 (C–O), 166.81 ($\text{CH}=\text{N}$).

Elemental analysis for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_2$:
Calcd (%): C, 78.15; H, 8.84; N, 3.96.
Found (%): C, 78.01; H, 8.58; N, 3.97. **IR** (ATR, cm^{-1}): $\nu = 1625$ (C=N). **UV-Vis** (CH_2Cl_2 , 25 °C): $\lambda_{\text{max}} = 230$ nm ($\pi \rightarrow \pi^*$, aromatic), 260 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$, imine), 329 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Melting point: 92 °C.



- Elemental analysis** for $C_{19}H_{17}NO_2$:
 Calcd (%): C, 78.33; H, 5.88; N, 4.81.
 Found (%): C, 78.02; H, 5.42; N, 4.66.

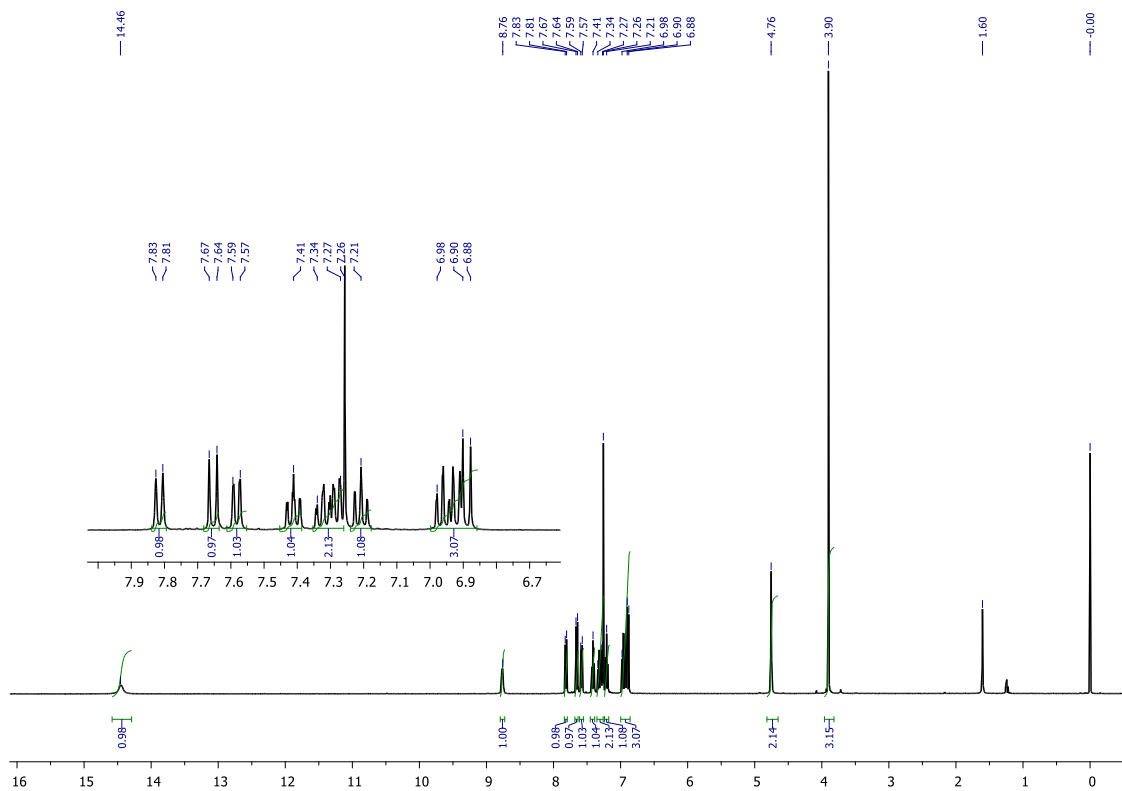


Figure A3. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, 25 °C) of compound **1b**.

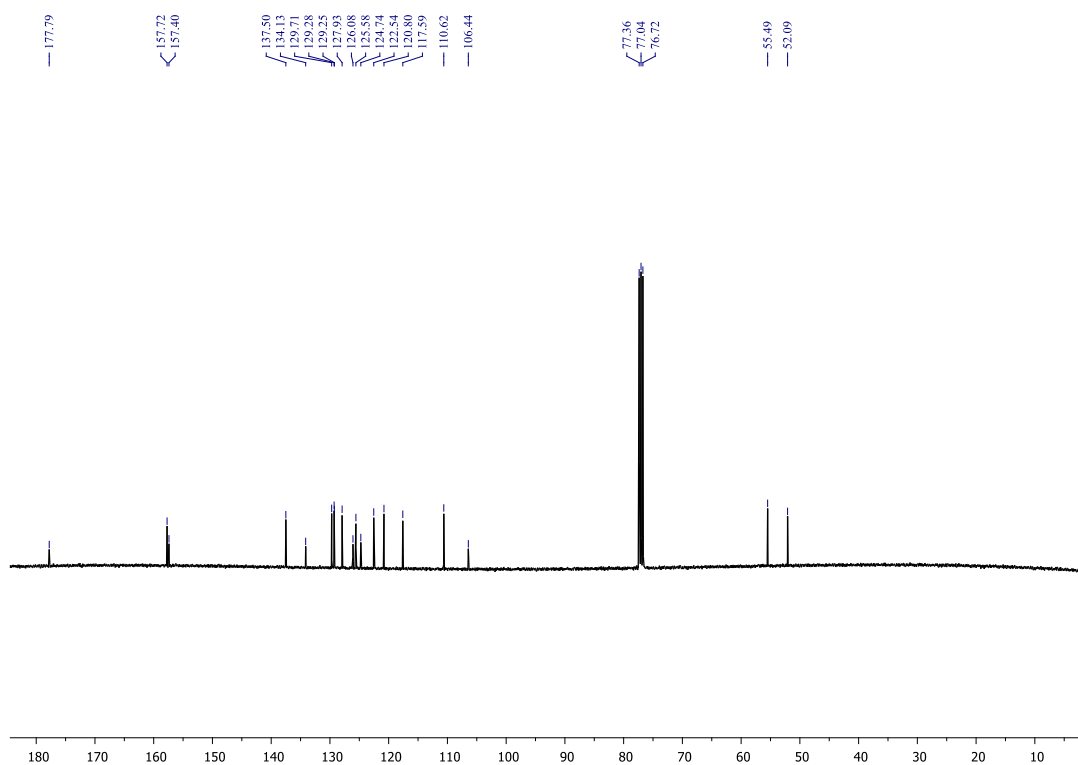


Figure A4. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz, 25 °C) of compound **1b**.

2. Biological Assessment

2.1. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet assay)

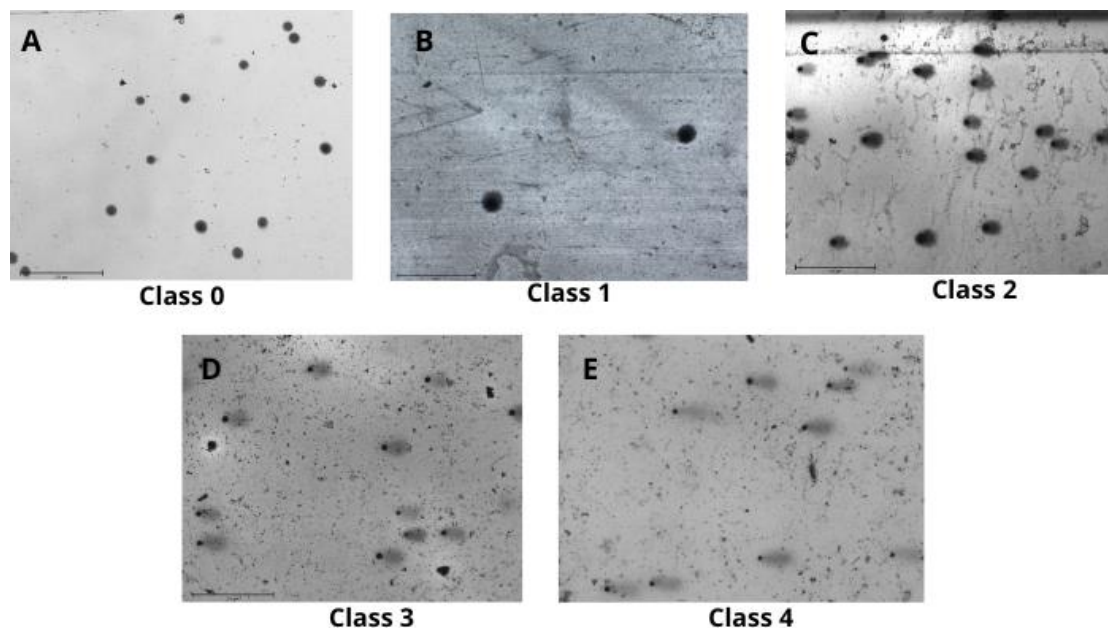
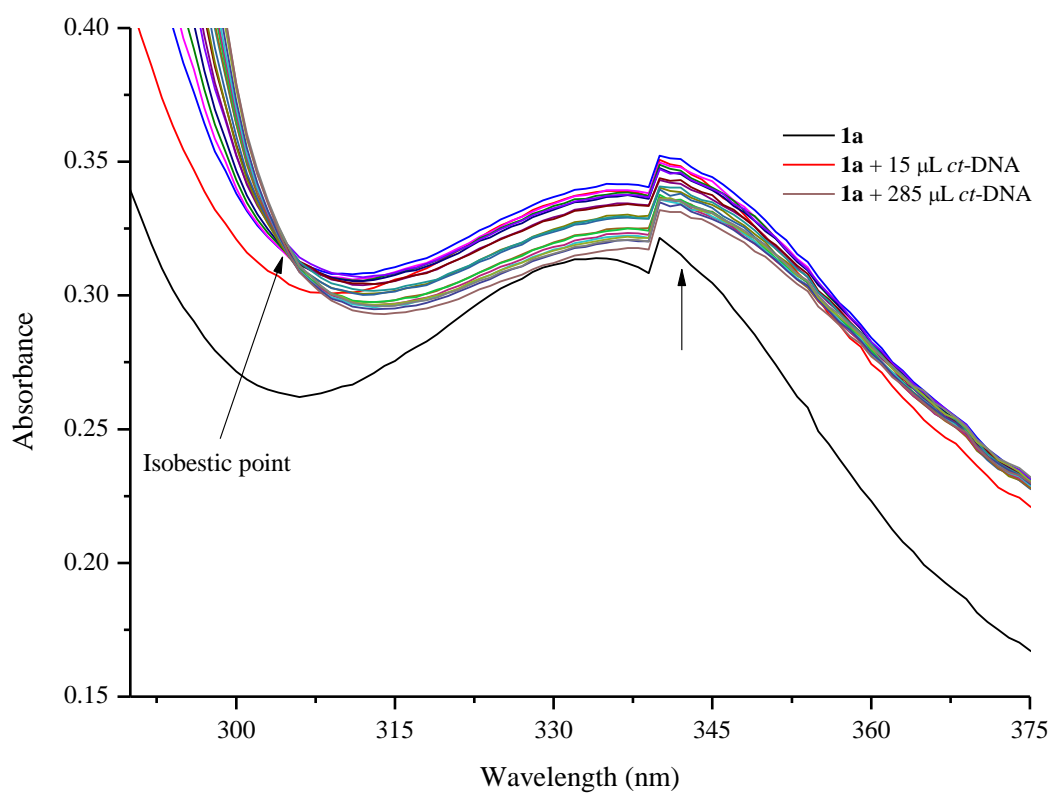


Figure 2. Classification of DNA damage by alkaline comet assay (scale bar: 275 μM). The images illustrate five classes of DNA damage, ranging from class 0 to class 4, based on DNA migration during electrophoresis. Source: author's archive.

Table 1. Genotoxicity effects of compounds **1a** and **1b** in human tumor cell lines (HCT116 and SW60) and normal cell line (MRC5), assessed by the alkaline comet assay after 2 and 24 hours. The results are expressed as damage index (DI) \pm standard deviation (SD).

Compounds	Dose (μM)	DNA Damage Index (DI) \pm DP		
		MRC-5	SW620	HCT-116
Control	0	16.0 \pm 6.4 (2h)	30.5 \pm 4.8 (2h)	49.7 \pm 9.8 (2h)
		11.67 \pm 4.2 (24h)	27.5 \pm 1.3 (24h)	41.9 \pm 7.6 (24h)
1^a	10	18.3 \pm 4.8 (2h)	31.0 \pm 6.5 (24h)	53.9 \pm 11.0 (2h)
		11.3 \pm 1.2 (24h)	24.2 \pm 0.3 (2h)	46.8 \pm 2.3 (2h)
	25	57.4 \pm 20.2 (24h)	96.3 \pm 5.2 (2h)	110.5 \pm 6.3 (2h)

	50	48.7 ± 8.1 (24h)	58.4 ± 13.0 (24h)	64.2 ± 3.8 (24h)	
		79.7 ± 7.7 (2h)	119.1 ± 12.9 (2h)	146.7 ± 15.6 (2h)	
	100	63.4 ± 6.6 (24h)	106.4 ± 6.6 (24h)	109.5 ± 7.3 (24h)	
		97.6 ± 8.8 (2h)	177.0 ± 48.2 (2h)	199.0 ± 64.5 (2h)	
			96.4 ± 5.2 (24h)	123.5 ± 9.2 (24h)	144.0 ± 13.1 (24h)
1b	10	4.7 ± 0.3 (2h)	22.3 ± 1.8 (2h)	15.5 ± 2.6 (24h)	
		4.3 ± 0.5 (24h)	26.8 ± 2.3 (24h)	10.8 ± 2.6 (2h)	
	25	30.4 ± 0.9 (2h)	64.2 ± 3.8 (2h)	19.2 ± 2.2 (2h)	
		11.4 ± 2.4 (24h)	57.4 ± 12.8 (24h)	22.3 ± 1.8 (24h)	
	50	30.6 ± 2.1 (24h)	87.6 ± 12.2 (24h)	51.61 ± 4.6 (2h)	
		13.2 ± 2.1 (2h)	85.3 ± 8.1 (2h)	45.6 ± 2.0 (24h)	
	100	69.9 ± 9.0 (2h)	129.1 ± 17.6 (2h)	112.0 ± 31.1 (2h)	
		56.7 ± 9.5 (24h)	110.6 ± 9.3 (24h)	106.5 ± 6.3 (24h)	
	Doxorrubicin	5	24.3 ± 2.6 (2h)	63.3 ± 3.3 (2h)	97.33 ± 9.4 (2h)
		10	17.8 ± 1.3 (24h)	72.1 ± 6.2 (24h)	129.0 ± 32.9 (24h)



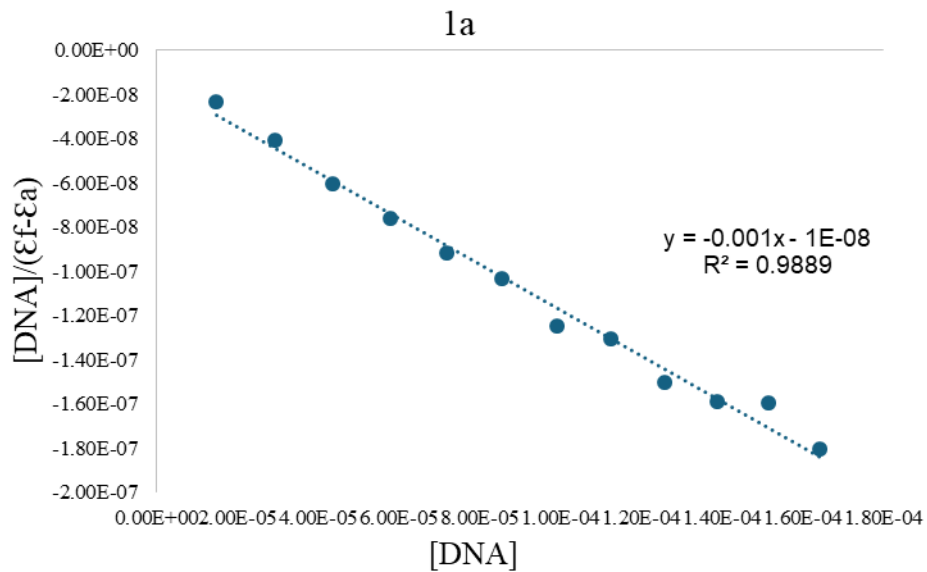
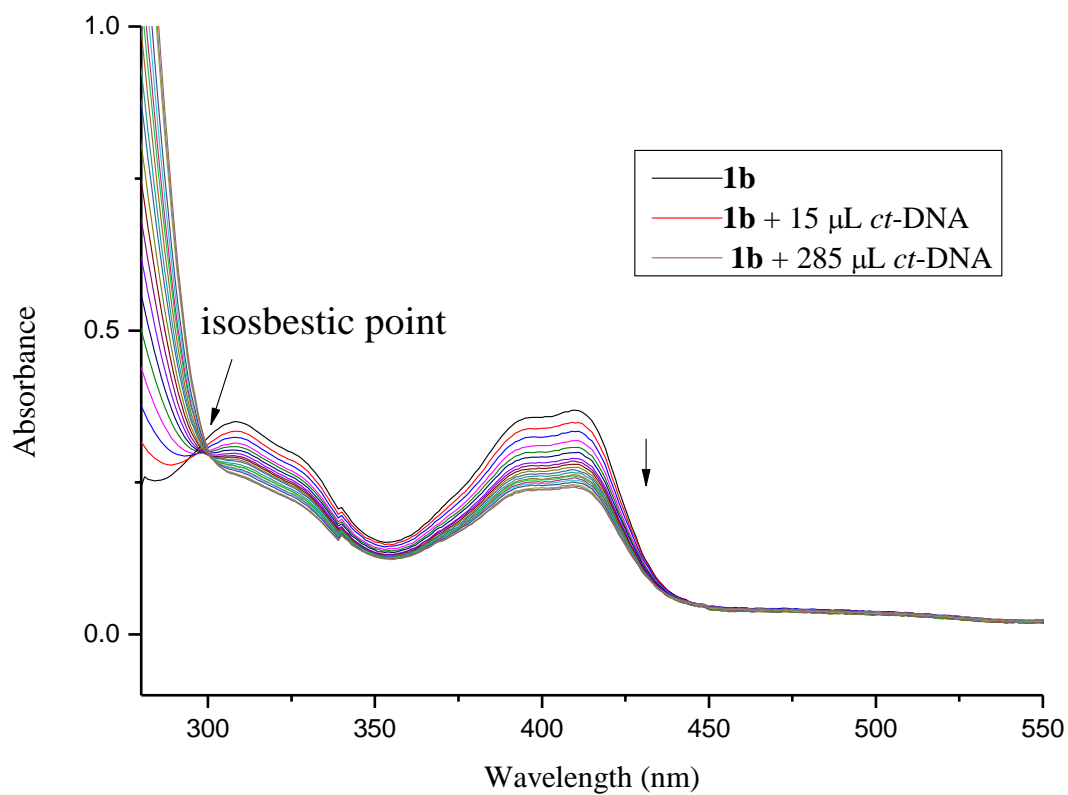


Figure 3. Absorption spectra of **1a** (50 μ M) in a mixture of DMSO (0.1%) and Tris-HCl buffer (pH 7.4), in the absence and presence of increasing amounts of DNA (0– 285 μ L). Insets: plot of $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs. $[DNA]$ for **1a**.



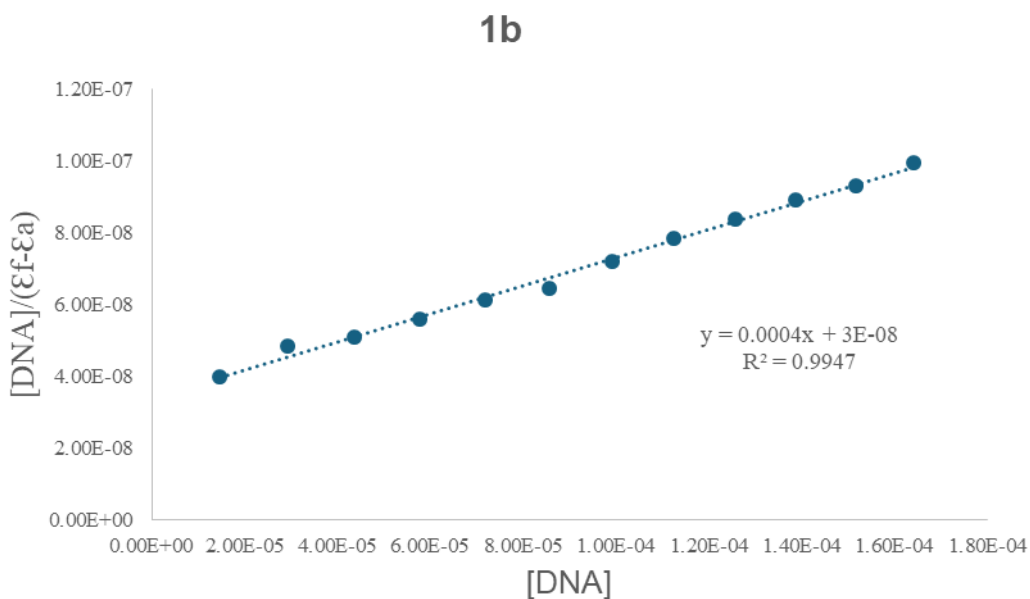


Figure 4. Absorption spectra of **1b** (50 μ M) in a mixture of DMSO (0.1%) and Tris-HCl buffer (pH 7.4), in the absence and presence of increasing amounts of DNA (0–285 μ L). Insets: plot of $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs. $[DNA]$ for **1b**.

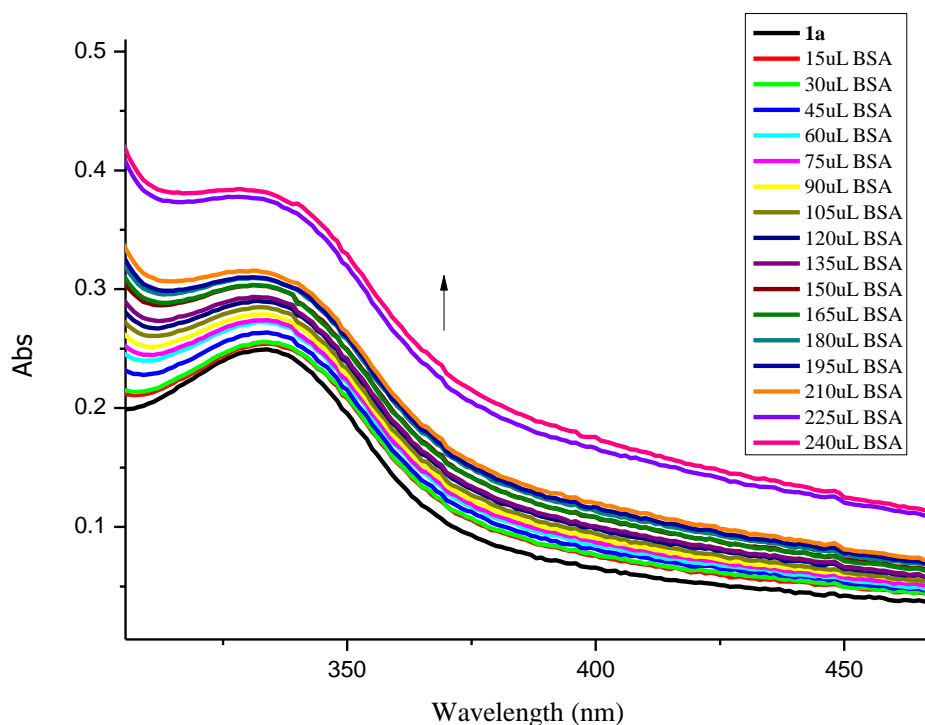


Figure 5A. UV-Vis absorption spectra overlay of compound **1a** interacting with BSA, obtained by spectrophotometric titration in the wavelength range of 220 to 800 nm.

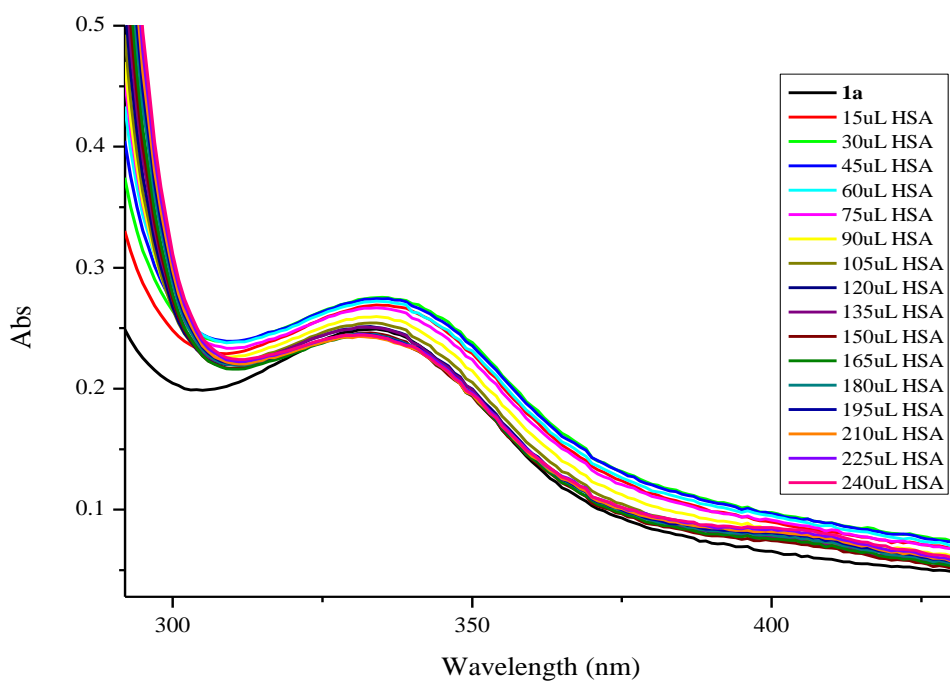


Figure 6. UV–Vis absorption spectra overlay of compound **1a** interacting with HSA, obtained by spectrophotometric titration in the wavelength range of 220 to 800 nm.

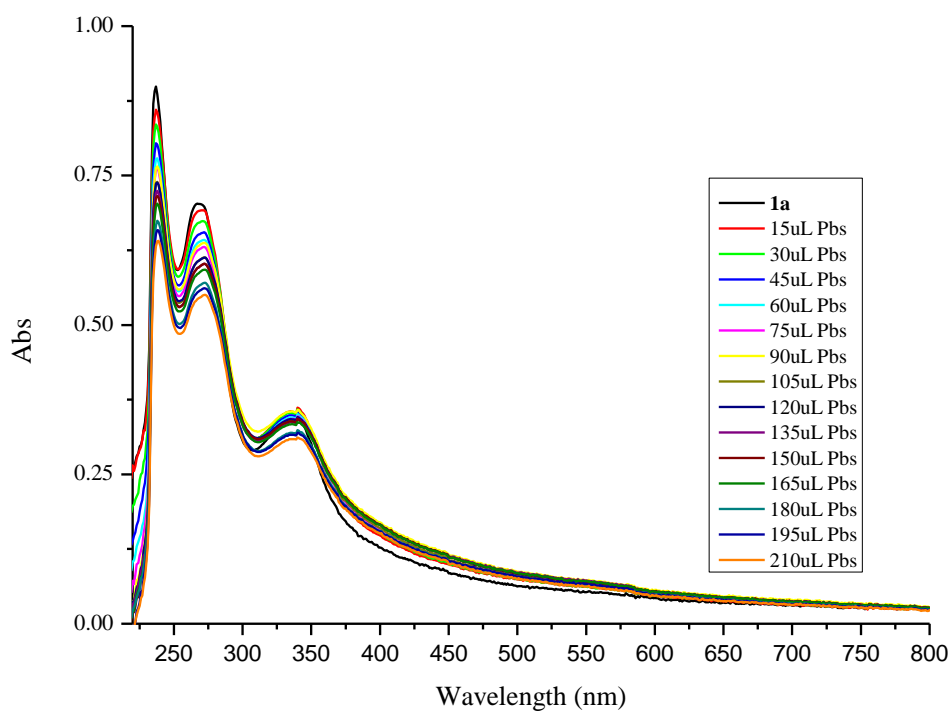


Figure 7. UV–Vis absorption spectra overlay of **1a** interacting with PBS, obtained by spectrophotometric titration in the wavelength range of 220 to 800 nm.

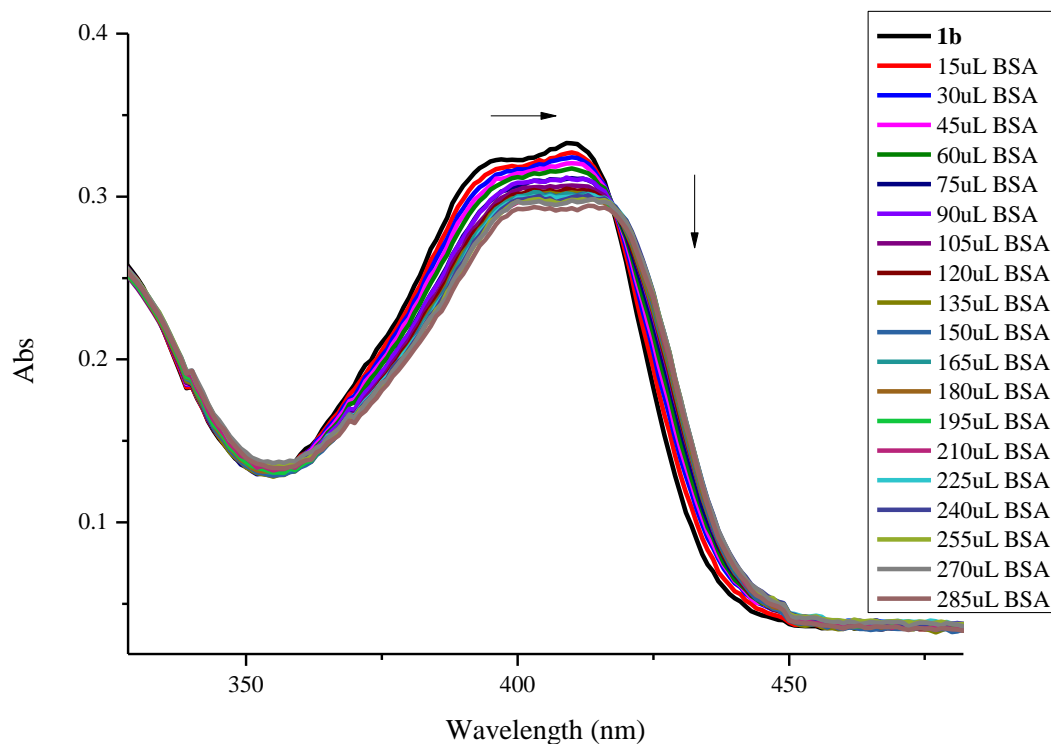


Figure 6 B. UV-Vis absorption spectra overlay of ligand **1b** interacting with BSA, obtained by spectrophotometric titration in the wavelength range of 220 to 800 nm.

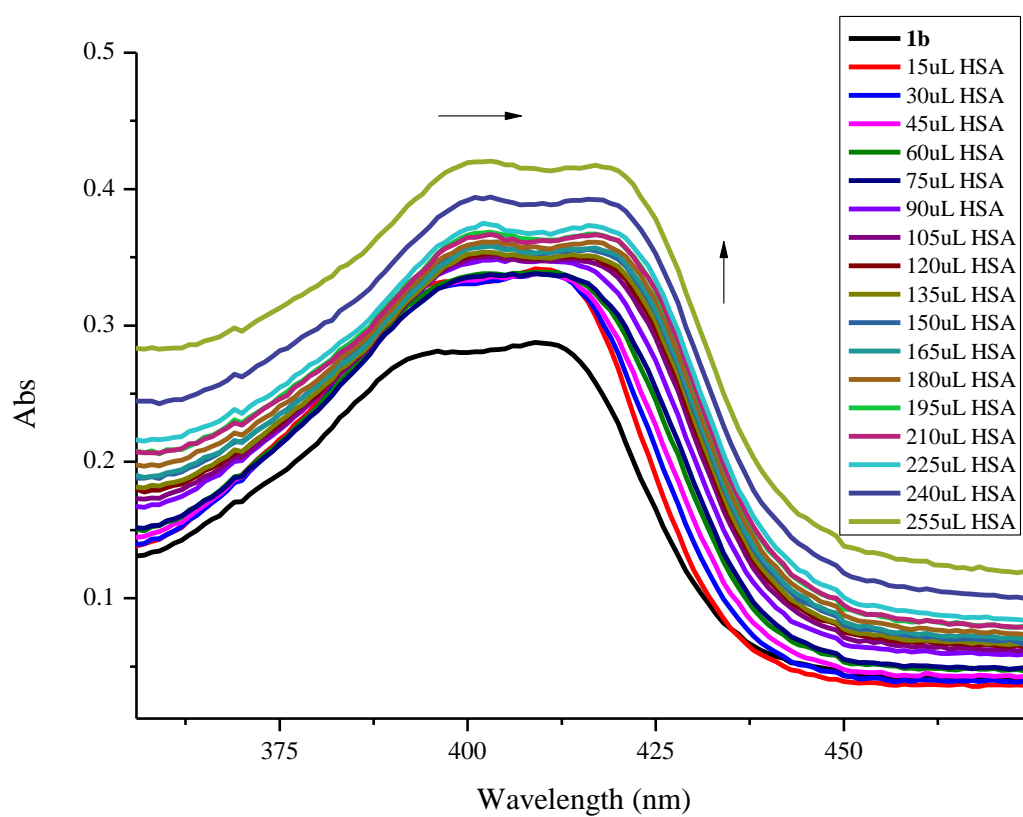


Figure 8. UV-Vis absorption spectra overlay of ligand **L10** interacting with HSA, obtained by spectrophotometric titration in the wavelength range of 220 to 800 nm.

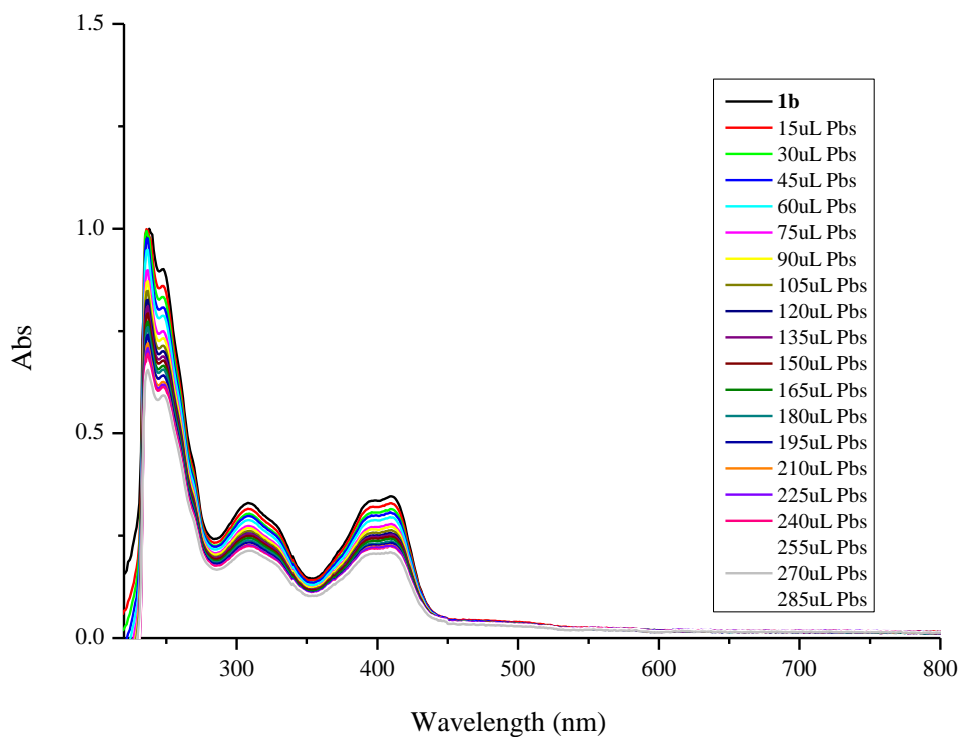


Figure 9. UV-Vis absorption spectra overlay of ligand **1b** interacting with PBS, obtained by spectrophotometric titration in the wavelength range of 220 to 800 nm.

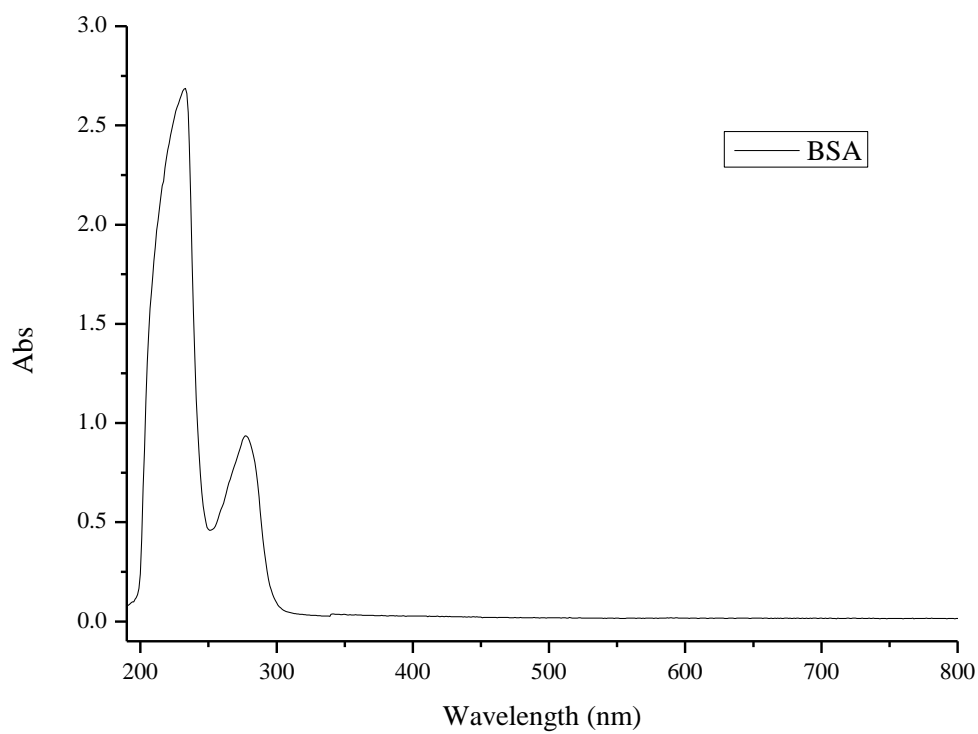


Fig 10. Espectro de absorção no UV-vis da BSA.

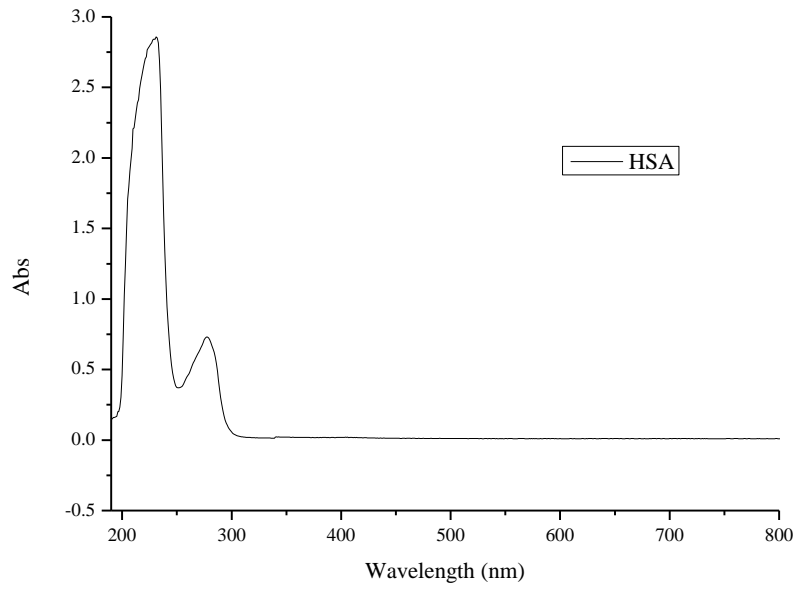


Fig 11. Espectro de absorção no UV-vis da HSA.

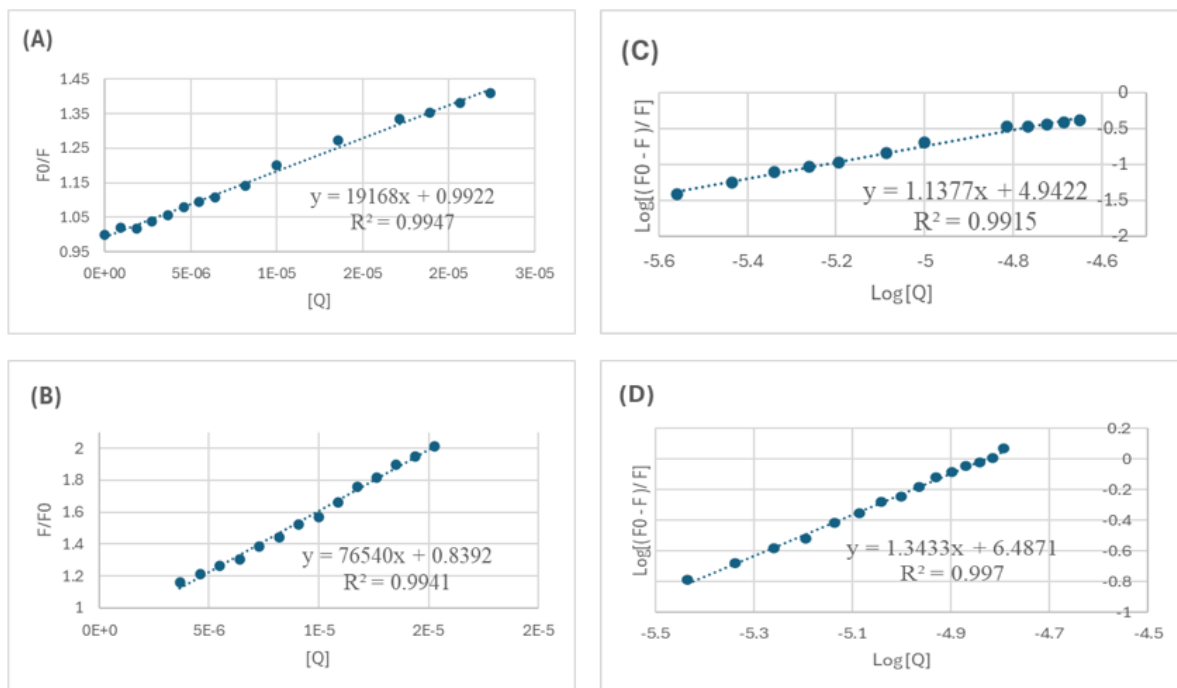


Figure 12. Analysis of binding interactions with BSA. (A and B) Stern-Volmer plots for compounds **1a** and **1b**, respectively. (C and D) Double logarithmic plots of $\log((F_0 - F)/F)$ versus $\log[Q]$, also for **1a** and **1b**, respectively, with BSA.

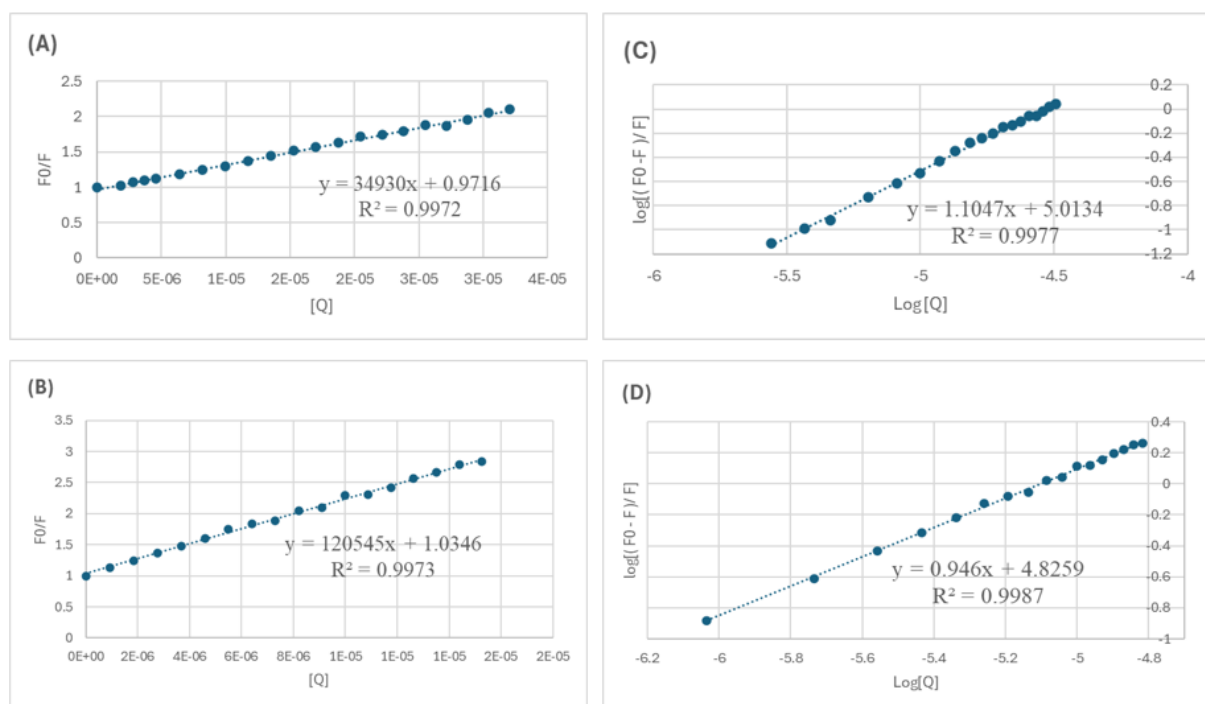


Figure 13. Analysis of binding interactions with HSA. (A, B) Stern-Volmer plots for compounds **1a** and **1b**, respectively. (C, D) Double logarithmic plots of $\log((F_0 - F)/F)$ versus $\log[Q]$, also for **1a** and **1b**, respectively, with HSA.

References

1. Sung, H.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Jiang, C.; Morgan, E.; Zahwe, M.; Cao, Y.; Bray, F.; Jemal, A. Colorectal cancer incidence trends in younger versus older adults : an analysis of population-based cancer registry data. *Lancet Oncol.* **2025**, *26* (1), 51–63.
2. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* **2024**, *74* (3), 229–263.
3. Liu, B.; Zhou, H.; Tan, L.; Siu, K.T.H.; Guan, X, Y.; Exploring treatment options in cancer : tumor treatment strategies. *Signal Transduct Target Ther.* **2024**, *17* (1), 175.
4. Siegel, R. L.; Wagle, N. S.; Cercek, A.; Smith, R. A.; Jemal, A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* **2023**, 233–54.
5. Weledji, E. The Etiology and Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Rem Publ LLC.* **2024**, *9*, 1–7.
6. Matsuda, T.; Fujimoto, A.; Igarashi, Y. Colorectal Cancer : Epidemiology, Risk Factors, and Public Health Strategies. *Digestion.* **2025**, 91–99.
7. Ionescu, V.A.; Gheorghe, G.; Bacalbasa, N.; Chiotoroiu, A.L.; Diaconu, C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas).* **2023**, *59* (9), 1646.
8. Fraker, J.L.; Clune, C. G.; Sahni, S.K.; Yaganti, A.; Vegunta, S. Prevalence, impact, and diagnostic challenges of benign breast disease: A narrative review. *Int J Womens Health.* **2023**, *15*, 765–778.
9. Mavrommati, I.; Johnson, F.; Echeverria, G, V. Subclonal heterogeneity and evolution in breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* **2021**, *7*, 55.
10. Siegel, R.L.; Kratzer, T.B.; Giaquinto, A.N.; Sung, H.; Jemal, A. Cancer statistics, 2025. *CA Cancer J Clin.* **2025**, *75* (1), 10–45.
11. Anand, U.; Dey, A.; Chandel, A.K.S.; Sanyal, R.; Mishra, A.; Pandey, D.K.; De Falco, V.; Upadhyay, A.; Kandimalla, R.; Chaudhary, A.; Dhanjal, J.K.; Dewanjee, S.; Vallamkondu, J.; Pérez de la Lastra, J. M. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis.* **2023**, *10* (4), 1367–1401.
12. Wilairat, P.; Kengkla, K.; Kaewpanan, T.; Kaewthong, J.; Ruankon, S.;

- Subthaweesin, C.; Stenehjem, D.D.; Saokaew, S. Comparative efficacy and safety of interventions for preventing chemotherapy-induced oral mucositis in adult cancer patients: A systematic review and network meta-analysis. *Eur J Hosp Pharm.* **2020**, 27 (2), 103–110.
13. Pratap, D.; Kumar, A.; Verma, A. Results in Chemistry Schiff bases and their possible therapeutic applications: A review. *Results Chemistry.* **2025**, 13, 101941.
 14. Raczuk, E.; Dmochowska, B.; Samaszko-Fiertek, J.; Madaj, J. Different Schiff Bases-Structure, Importance and Classification. *Molecules.* **2022**, 27 (3), 787.
 15. Fabbrizzi, L. Beauty in chemistry: Making artistic molecules with schiff bases. *J Org Chem.* **2020**, 85 (19), 12212–12226.
 16. Islam, T.; Bitu, A.; Chaki, M.; Hossain, J. Water-soluble Schiff base ligands and metal. *RSC Adv.* **2024**, 14, 25256–25272.
 17. Akhuseyin, E.; Pepe, Y.; Demir, N.; Yıldız, M. Chromogenic sensing, biological, and optical properties of Schiff bases. *J. Mol. Struct.* **2024**, 1295.
 18. Rana, M. S.; Rayhan, N. M. A.; Emon, M. S. H.; Islam, M.T.; Rathry, K.; Hasan, M. M.; Islam, Mansur, M. M.; Srijon, B. C.; Islam, M. S.; Ray, A.; Rakib, M. A.; Islam, A.; Kudrat-E-Zahan, M.; Hossen, M. F.; Asraf, M. A. Antioxidant activity of Schiff base ligands using the DPPH scavenging assay: an updated review. *RSC Adv.* **2024**, 14 (45), 33094–330123.
 19. Kizilkaya, H. Dag, B. Aral, T. Genc, N. Erenler, R. Synthesis, characterization, and antioxidant activity of heterocyclic Schiff bases. *J Chinese Chem Soc.* **2020**, 67 (9), 1696–1701.
 20. Deghadi, R.G.; Abbas, A. A.; Mohamed, G. G. Theoretical and experimental investigations of new bis (amino triazole) schiff base ligand: Preparation of its UO₂(II), Er (III), and La (III) complexes, studying of their antibacterial, anticancer, and molecular docking. *Appl Organomet Chem.* **2021**, 35 (8), 1–17.
 21. Al-Aghbari, S. A.; Al-Shuja'a, O. M.; Al-Badani, R.; Japir, A. A. W. M. Synthesis, Characterization and Anticancer Activity Studies of New Schiff Base Pt (II) Complex. *J Mater Sci Chem Eng.* **2019**, 7 (08), 1–8.
 22. Mohamed, S. S.; Tamer, A. R.; Bensaber, S. M.; Jaeda, M. I.; Ermeli, N. B.; Allafi, A. A.; Mrema, I. A.; Erhuma, M.; Hermann, A.; Gbaj, A.M. Design, synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of sulfanilamide-imines derivatives as potential anticancer agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch*

- Pharmacol.* **2013**, 386 (9), 813–822.
23. Khaldoune, K.; Hasnaoui, A.; Fdil, N.; Oubella, A.; Lafhal, K.; Oubahmane, M. Exploring anticancer activity, acute toxicity, and molecular docking of synthesized schiff bases and schiff base-palladium complex. *Inorg Chem Commun.* **2023**, 156, 111089.
 24. Abd-Elzaher, M. M.; Labib, A. A.; Mousa, H. A.; Moustafa, S.A.; Ali MM, El-Rashedy, A. A. Synthesis, anticancer activity and molecular docking study of Schiff base complexes containing thiazole moiety. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci.* **2016**, 5(1), 85–96.
 25. Levenson, A. S.; Jordan, V.C. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* **1997**, 57 (15), 3071–3080.
 26. Aroua, L. M.; Al-Hakimi, A. N.; Abdulghani, M. A. M.; Alhag, S. K. Cytotoxic urea Schiff base complexes for multidrug discovery as anticancer activity and low in vivo oral assessing toxicity. *Arab J Chem.* **2022**, 15 (8), 103986.
 27. Kamil, D.Q.; Wasmi, A. H.; AL Hassan, A. W.A.; Al-Hussainawy, M. K.; Kadhim, K. H. A. Synthesis, molecular docking, ADMET profiling, and anti-PC3 activity of new Schiff base derivatives. *Results Chem.* **2024**, 12, 101916.
 28. Uddin, N.; Rashid, F.; Ali, S.; Tirmizi, S. A.; Ahmad, I.; Zaib, S.; Zubair, M.; Diaconescu, P. L.; Tahir, M. N.; Iqbal, J.; Haider, A. Synthesis, characterization, and anticancer activity of Schiff bases. *J Biomol Struct Dyn.* **2020**, 38 (11), 3246–3259.
 29. Thakur, S.; Jaryal, A.; Bhalla, A. Recent advances in biological and medicinal profile of schiff bases and their metal complexes: An updated version (2018–2023). *Results Chem.* **2024**, 7, 101350.
 30. Dasgupta, S.; Karim, S.; Banerjee, S.; Saha, M.; Das Saha, K.; Das, D. Designing of novel zinc(ii) Schiff base complexes having acyl hydrazone linkage: Study of phosphatase and anti-cancer activities. *Dalt Trans.* **2020**, 49 (4), 1232–40.
 31. Pinheiro, A.C.; Nunes, I. J.; Ferreira, W.V, Tomasini, P. P.; Trindade, C.; Martins, C. C.; Wilhelm, E.A.; Oliboni, R. D. S.; Netz, P. A.; Stieler, R.; Casagrande, O. L. Jr.; Saffi J. Antioxidant and Anticancer Potential of the New Cu(II) Complexes Bearing Imine-Phenolate Ligands with Pendant Amine N-Donor Groups. *Pharmaceutics.* **2023**, 15 (2).
 32. Bora, A.; Maiti, S. K.; Singh, A.; Barman, P. Studies on the effect of remote substituents on the DNA binding activity of novel chiral Schiff bases. *J Mol*

- Struct.* **2021**,1234 (2), 130179.
33. Li, S.; Cooper, V. R, Thonhauser, T.; Lundqvist, B. I.; Langreth, D. C. Stacking interactions and DNA intercalation. *J Phys Chem B.* **2009**, 113 (32), 11166–11172.
 34. de Souza, M. M.; Gini, A. L. R.; Moura, J. A.; Scarim, C.B.; Chin, C.M.; dos Santos, J. L. Prodrug Approach as a Strategy to Enhance Drug Permeability. *Pharmaceuticals.* **2025**, 18 (3).
 35. Heba, K.A.; El-Mawgoud, A M.; Fouda, M, A.A.; El-Nassag, A. A.; Elhenawy, M. Y.; Alshahrani, A.M.E. A. Discovery of novel rigid analogs of 2-naphthol with potent anticancer activity through multi-target topoisomerase I & II and tyrosine kinase receptor EGFR & VEGFR-2 inhibition mechanism. *Chem Biol Interact.* **2022**, 355 (109838).
 36. Mahesha, P.; Shetty, N. S.; Naphthyl-Based Chalcone Derivatives: A Multifaceted Player in Medicinal Chemistry. *ChemistrySelect.* **2024**, 9 (19).
 37. de Oliveira, L. L.; da Silva, S. M.; Casagrande, A. C. A.; Stieler, R.; Casagrande O. L. Synthesis and characterization of Ni (II) complexes supported by phenoxy/naphthoxy-imine ligands with pendant N- and O-donor groups and their use in ethylene oligomerization. *Appl Organomet Chem.* **2018**, 32 (7), 1–13.
 38. Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci.* **2021**, 22 (23).
 39. Fotakis, G.; Timbrell, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* **2006**, 160 (2), 171–177.
 40. Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* **1986**, 89 (2), 271–277.
 41. Ates, G.; Vanhaecke, T.; Rogiers, V.; Rodrigues, R. M. Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. *Methods Mol Biol.* **2017**, 1601, 19–26.
 42. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nat Protoc.* **2008**, 3(7), 1125–1131.
 43. Strober, W. Tryptan blue exclusion of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* **2017**, 176 (3), 139–148.

44. Cai, Y.; Prochazkova, M.; Kim, Y.S.; Jiang, C.; Ma, J.; Moses, L.; Martin, K.; Pham, V.; Zhang, N.; Highfill, S.L.; Somerville, R.P.; Stroncek, D. F.; Jin, P. Assessment and comparison of viability assays for cellular products. *Cytotherapy*. **2024**, 26 (2), 201–209.
45. Wang, H.; Guo, M.; Wei, H.; Chen, Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther*. **2023**, 8 (1), 1–35.
46. Park, H.Y.; Park, S. H.; Jeong, J. W.; Yoon, D.; Han, M. H.; Lee, D. S.; Choi, G.; Yim, M. J.; Lee, J. M.; Kim, D. H.; Kim, G. Y.; Choi, I.W.; Kim, S.; Kim, H. S.; Cha, H. J.; Choi, Y. H. Induction of p53-independent apoptosis and G1 cell cycle arrest by fucoidan in HCT116 human colorectal carcinoma cells. *Mar Drugs*. **2017**, 15 (6), 1–14.
47. Alese, O. B.; Wu, C.; Chapin, W. J.; Ulanja, M. B.; Zheng-Lin, B.; Amankwah, M.; Eads, J. Update on Emerging Therapies for Advanced Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. **2023**, 1–18.
48. Biller, L. H.; Schrag, D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: A review. *JAMA - J Am Med Assoc*. **2021**, 325 (7), 669–685.
49. Gottesman, M. M.; Lavi, O.; Hall, M. D.; Gillet, J. P. Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2016**, 56, 85–102.
50. Heck, K. A.; Lindholm, H. T.; Niederdorfer, B.; Tsirvouli, E.; Kuiper, M.; Flobak Å.; Læg Reid, A.; Thommesen, L. Characterisation of Colorectal Cancer Cell Lines through Proteomic Profiling of Their Extracellular Vesicles. *Proteomes*. **2023**, 11 (1), 1–20.
51. Liu, T.; Liu, X. H.; Olajide, T. M.; Xu, J.; Weng, X. Two Novel Lipophilic Antioxidants Derivatized from Curcumin. *Antioxidants*. **2022**, 11 (4), 1–11.
52. Ihmels, H.; Karbasiyoun, M.; Löhl, K. Stremmel C. Structural flexibility: Versus rigidity of the aromatic unit of DNA ligands: Binding of aza- and azoniastilbene derivatives to duplex and quadruplex DNA. *Org Biomol Chem*. **2019**, 17 (26), 6404–6413.
53. Rafehi, H.; Orłowski, C.; Georgiadis, G. T.; Ververis, K.; El-Osta, A.; Karagiannis, T. C. Clonogenic assay: Adherent cells. *J Vis Exp*. **2011**, 15–17.
54. Kciuk, M.; Gielecińska, A.; Mujwar, S.; Kołat, D.; Kałuzińska-Kołat, Ż.; Celik, I.; Kontek, R. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer

- Activity. *Cells*. **2023**, 12 (4), 26–32.
55. Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. **2014**, 1845 (1), 84–89.
 56. Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H. A. Review on the binding of anticancer drug doxorubicin with DNA and tRNA: Structural models and antitumor activity. *J Photochem Photobiol B Biol*. **2016**, 158, 274–279.
 57. Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J Photochem Photobiol B Biol*. **2013**, 124, 1–19.
 58. Arif, R.; Akrema, Pulaganti, M.; Rubab, U.; Ali, A.; Khan, M. S. Evaluation of in vitro antibacterial, DNA binding, DNA damage, DFT and antioxidant studies of aminobenzaldehyde-based heterocyclic Schiff base derivatives. *Chem Pap*. **2024**, 78 (5), 2867–2883.
 59. Ghosh, N.; Afzal, M.; Das, D.; Ray, P. P.; Pramanik, S.; Pathak, S. Crystallographic, theoretical and conductivity studies of two new complexes [Ni(II) and Cu(II)] based on mixed ligands approach. *J Mol Struct* . **2024**, 1298, 137106.
 60. Nayab, P. S.; Irfan, M.; Abid, M.; Pulaganti, M.; Nagaraju, C.; Chitta, S. K.; Rahisuddin. Experimental and molecular docking investigation on DNA interaction of N-substituted phthalimides: antibacterial, antioxidant and hemolytic activities. *Luminescence*. **2017**, 32 (3), 298–308.
 61. Ribeiro, D.; Proença, C.; Varela, C.; Janela, J.; Tavares da Silva, E. J.; Fernandes E. New phenolic cinnamic acid derivatives as selective COX-2 inhibitors. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationships. *Bioorg Chem*. **2019**, 91, 103179.
 62. Lindman, B.; Medronho, B.; Alves, L.; Norgren, M.; Nordenskiöld, L. Hydrophobic interactions control the self-assembly of DNA and cellulose. *Q Rev Biophys*. **2021**, 54.
 63. Zhao, Y.; Ye, X.; Xiong, Z.; Ihsan, A.; Ares, I.; Martínez, M.; Lopez-Torres, B.; Martínez-Larrañaga, M. R.; Anadón, A.; Wang, X.; Martínez, M. A. Cancer Metabolism: The Role of ROS in DNA Damage and Induction of Apoptosis in Cancer Cells. *Metabolites*. **2023**, 13 (7).
 64. Glorieux, C.; Liu, S.; Trachootham, D.; Huang, P. Targeting ROS in cancer: rationale and strategies. *Nat Rev Drug Discov*. **2024**, 23, 583–606.

65. Srinivas, U. S.; Tan, B. W. Q.; Vellayappan, B. A.; Jeyasekharan, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* **2019**, *25*, 101084.
66. Cavalu, S.; Abdelhamid, A. M.; Saber, S.; Elmorsy, E. A.; Hamad, R. S.; Abdel-Reheim, M. A., Yahya, G.; Salama, M. M. Cell cycle machinery in oncology: A comprehensive review of therapeutic targets. *FASEB J.* **2024**, *38* (11), 1–17.
67. Carrasco-Torres, G.; Baltiérrez-Hoyos, R.; Andrade-Jorge, E.; Villa-Treviño, S.; Trujillo-Ferrara, J. G.; Vásquez-Garzón, V. R. Cytotoxicity, Oxidative Stress, Cell Cycle Arrest, and Mitochondrial Apoptosis after Combined Treatment of Hepatocarcinoma Cells with Maleic Anhydride Derivatives and Quercetin. *Oxid Med Cell Longev.* **2017**.
68. Alhazmi, H. A.; Alam, M. S.; Albratty, M.; Najmi, A.; Abdulhaq, A. A.; Hassani R. Binding Investigation of Some Important Metal Ions Copper (I), Nickel (II), and Aluminium (III) with Bovine Serum Albumin Using Valid Spectroscopic Techniques. *J Chem.* **2023**.
69. Parveen, M.; Uzma, N.; Khan, A. A.; Nami, S. A. A.; Kataria, R.; Malik, A.; Amali, N. A. M.; Abd Kadir, N. H.; Alam, M. Isolation, Characterization, and Single-Crystal X-ray Analysis of Lantabetulic Acid from *Rhus alata*: Insights into HSA and BSA Binding Interactions, with In-Silico Study. *ACS Omega.* **2024**.
70. Ketrat, S.; Japrun, D.; Pongprayoon, P. Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin. *J Mol Graph Model.* **2020**, *98*, 107601.
71. Maier, R.; Fries, M. R.; Buchholz, C.; Zhang, F.; Schreiber, F. Human versus Bovine Serum Albumin: A Subtle Difference in Hydrophobicity Leads to Large Differences in Bulk and Interface Behavior. *Cryst Growth Des.* **2021**, *21* (9) 5451–5459.
72. Szymaszek, P.; Fiedor, P.; Chachaj-Brekiesz, A.; Tyszka-Czochara, M.; Świergosz, T.; Ortyl, J. Molecular interactions of bovine serum albumin (BSA) with pyridine derivatives as candidates for non-covalent protein probes: a spectroscopic investigation. *J Mol Liq.* **2022**, 347.
73. Ender B.; Özdemir, N.; Macit, M. Electrochemical and Molecular Docking Studies on DNA, HSA and BSA Bindings and In Silico Physicochemical Properties of (E)-1-((2,4-dichlorophenylimino)methyl)naphthalen-2-ol and (E)-1-((2-chloro-4-nitrophenylimino)methyl)naphthalen-2-ol. *Russ J Electrochem.* **2024**, *60* (11), 937–55.

74. Özbağcı Dİ.; Gültekin, B.; Aydın, İ.; Aydın, R.; Arı, F.; Zorlu, Y. New copper (II) complexes bearing tryptophan-based Schiff bases and 2,2'-bipyridine: Crystal structures, DNA/BSA interactions and antiproliferative activities. *Appl Organomet Chem.* **2024**, 38 (4) 1–16.
75. Koundal, S.; Pathania, A.; Kour, H. D.; Pathania, A. R.; Santhosh, A. J. Molecular interaction study of L-Ornithine with bovine serum albumin using spectroscopic and molecular docking methods. *Sci Rep.* **2025**, 1–16.
76. Hadichegeni, S.; Goliaei, B.; Taghizadeh.; Davoodmanesh, S.; Taghavi, F.; Hashemi, M. Characterization of the interaction between human serum albumin and diazinon via spectroscopic and molecular docking methods. *Hum Exp Toxicol.* **2018**, 37 (9), 959–971.
77. Gurusamy, S.; Krishnaveni, K.; Sankarganesh, M.; Nandini, Asha, R.; Mathavan, A. Synthesis, characterization, DNA interaction, BSA/HSA binding activities of VO(IV), Cu(II) and Zn(II) Schiff base complexes and its molecular docking with biomolecules. *J Mol Liq.* **2022**, 345, 17045.
78. Paliwal, K.; Haldar, P.; Antharjanam, P. K. S.; Kumar, M. Synthesis, Characterization, DNA/HSA Interaction, and Cytotoxic Activity of a Copper(II) Thiolate Schiff Base Complex and Its Corresponding Water-Soluble Stable Sulfinato-O Complex Containing Imidazole as a Co-ligand. *ACS Omega.* **2023**, 8 (24), 21948–21968.
79. Siddiqui, S.; Ameen, F.; Ur Rehman, S.; Sarwar, T.; Tabish, M. Studying the interaction of drug/ligand with serum albumin. *J Mol Liq.* **2021**, 336, 116200.
80. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *RSC Adv.* **2016**, 6 (80), 76600–76613.
81. Lica, J. J.; Wiczór, M.; Grabe, G. J.; Heldt, M.; Jancz, M.; Misiak, M.; Gucwa, K.; Brankiewicz, W.; Maciejewska, N.; Stupak, A.; Bagiński, M.; Rolka, K.; Hellmann, A.; Składanowski, A. Effective drug concentration and selectivity depends on fraction of primitive cells. *Int J Mol Sci.* **2021**, 22 (9).
82. Pu, X.; Wang, Z.; Klaunig, J. E. Alkaline comet assay for assessing DNA damage in individual cells. *Curr Protoc Toxicol.* **2015**, 65.
83. Gan, C.; Huang, X.; Zhan, J.; Liu, X.; Huang, Y.; Cui, J. Study on the interactions between B-norcholesteryl benzimidazole compounds with ct-DNA. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* **2020**, 227, 117525.

84. Kauffman, M.; Kauffman, M.; Traore, K.; Zhu, H.; Trush, M, Jia, Z, Li, Y. R. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species (Apex)*. **2016**, 2 (5), 361–370.
85. Wang, Y.; Li, J.; Li, X.; Gao, B.; Chen, J.; Song, Y. Spectroscopic and molecular docking studies on binding interactions of camptothecin drugs with bovine serum albumin. *Sci Rep*. **2025**, 15 (1), 1–16.
86. Fayed, E. A.; Eldin, R. R. E.; Mehany, A.; Bayoumi, A. H.; Ammar, Y. A. Isatin-Schiff's base and chalcone hybrids as chemically apoptotic inducers and EGFR inhibitors; design, synthesis, anti-proliferative activities and in silico evaluation. *J Mol Struct*. **2021**, 1234, 130159.
87. Dassault Systèmes BIOVIA. BIOVIA Discovery Studio Visualizer. 3DEXPERIENCE Co 1. **2016**, 1–2.
88. Pracht, P.; Bohle, F.; Grimme, S. Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods. *Phys Chem Chem Phys*. **2020**, 22 (14), 7169–7192.
89. Bannwarth, C.; Ehlert, S.; Grimme, S. GFN2-xTB - An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions. *J Chem Theory Comput*. **2019**, 15 (3), 1652–1671.
90. Wardell, M.; Wang, Z.; Ho, J. X.; Robert, J.; Ruker, F.; Ruble, J.; Carter, D. C. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. *Biochem Biophys Res Commun*. **2002**, 291 (4), 813–819.
91. Allouche, A. R. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J Comput Chem*. **2012**, 32, 174–182.
92. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C, Couch, G. S, Greenblatt, D. M, Meng EC, Ferrin, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. **2004**, 25 (13), 1605–1612.
93. Biovia DS. Discovery studio modeling environment. Release San Diego, CA; **2017**.
94. Yamada, Y.; Gohda, S.; Abe, K.; Togo, T.; Shimano, N.; Sasaki, T.; Haruki, T, Hironobu, O.; Tomonori, O.; Shingo, K.;Takahiro, O.; Satoshi S. Carbon materials with controlled edge structures. *Carbon N Y*. **2017**, 122, 694–701.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados promissores obtidos neste estudo, várias perspectivas podem ser consideradas para a continuidade e aprofundamento da investigação sobre os complexos bimetálicos de Cu(II) derivados de bases de Schiff:

- ❖ Investigar as vias moleculares envolvidas incluindo a participação de enzimas-chave, e proteínas reguladoras da apoptose e necrose, mecanismos de reparo do DNA, análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, sinalização de morte celular e regulação do ciclo celular (ex.: caspases, p53, Bcl-2, Bax, e marcadores de estresse oxidativo);
- ❖ Aplicar modelos 3D de cultura celular (esferóides) que simulam melhor o ambiente tumoral *in vivo* e validam a atividade citotóxica e antiproliferativa dos compostos;
- ❖ Aplicar estudos de formulação e veiculação para os sistemas de entrega (como por exemplo os lipossomos) que permitam aumentar a estabilidade, a biodisponibilidade e a seletividade dos complexos metálicos, minimizando efeitos adversos às células normais;
- ❖ Realizar ensaios de migração das linhagens tumorais tratadas com os compostos.

Continuar a desvendar o mecanismo molecular e biológico de ação, principalmente do complexo **2b**, refinará o nosso entendimento sobre a interação desses compostos com o sistema celular tumoral e nossas estratégias de combate ao câncer colorretal e de mama, transformando as perspectivas de resultados à fase pré-clínica envolvendo modelos mais complexos *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Macdonald WJ, Purcell C, Pinho-schwermann M, Stubbs NM, Srinivasan PR, El-deiry WS. Heterogeneity in Cancer. 2025;1:1–28.
2. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the Definition of Cancer. 2023;1142–7.
3. Gatenby RA, Avdeyev S, Tsai KY, Brown JS. Integrating genetic and nongenetic drivers of somatic evolution during carcinogenesis : The biplane model. 2020;(March):1651–9.
4. Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. In: Sunderland (MA): Sinauer Associates [Internet]. 2000 [cited 2025 Apr 28]. p. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>
5. Boutry J, Tissot S, Ujvari B, Capp J Pascal, Giraudeau M, Nedelcu AM, et al. The evolution and ecology of benign tumors. 2021;
6. Visser KE De, Joyce JA. Review The evolving tumor microenvironment : From cancer initiation to metastatic outgrowth. Cancer Cell [Internet]. 2023;41(3):374–403. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
7. Rosen RD SA. National Library of Medicine. 2023 [cited 2025 Apr 28]. TNM Classification. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>
8. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
9. Hortobagyi G, Connolly JL, D’Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL, Winchester DJ GA. AJCC cancer staging manual. In: Springer Nature. 8th edn. New York: Breast; 2017. p. 587–628.
10. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Byrd DR, Winchester DP. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual : Continuing to Build a Bridge From a Population-Based to a More “ Personalized ” Approach to Cancer Staging. 2017;67(2):93–9.
11. Karidio ID, Sanlier SH. Reviewing cancer ’ s biology : an eclectic approach. 2021;
12. Iannolo G, Conticello C, Memeo L, De Maria R. Apoptosis in normal and cancer stem cells. Crit Rev Oncol Hematol. 2008;66(1):42–51.
13. Dieli R, Liroy R, Crispo F, Cascelli N, Martinelli M, Lerosé R, et al. The Oncoprotein Mucin 1 in Pancreatic Cancer Onset and Progression : Potential Clinical Implications. 2025;1–21.
14. Hanselmann RG, Welter C. Origin of Cancer : Cell work is the Key to Understanding Cancer Initiation and Progression. 2022;10(March):1–14.
15. Compton C. Cancer : The Enemy from Within.
16. Zhang S. Tumor initiation and early tumorigenesis : molecular mechanisms and interventional targets. 2024;(January):1–36.
17. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. Int J Cancer. 2021;149(4):778–89.

18. Mph RLS, Sung H, Mph TBK, Msph ANG. Cancer statistics , 2025. 2025;(October 2024):10–45.
19. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
20. Barleben A, Mills S. Anorectal Anatomy and Physiology. *Surg Clin NA* [Internet]. 2010;90(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2009.09.001>
21. Houston SA, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat AM, Milling S. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Soc Mucosal Immunol* [Internet]. 2016;9(2):468–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2015.77>
22. Ascending CA. *Colon and Rectum.* 2002;
23. ã GHS, Zouros E, Peros G. Applied vascular anatomy of the colon and rectum : Clinical implications for the surgical oncologist. 2007;(2006):243–55.
24. Canal A. ANORECTAL ANATOMY AND PHYSIOLOGY. 2001;30(1):1–13.
25. Edition S. *CANCER STAGING.*
26. Kelley MP, Gearhart S. *Diagnosis of Colorectal and Anal Diseases* [Internet]. Eighth Edi. Shackelford’s Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set. Elsevier Inc.; 1662–1675 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00143-6>
27. Jabło B. Right-Sided Versus Left-Sided Colon Cancer — A 5-Year Single-Center Observational Study. 2025;
28. Pinheiro M, Moreira DN, Ghidini M. Colon and rectal cancer : An emergent public health problem. 2024;30(7):644–51.
29. Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer B. Estimativa de 2023: Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. 2022. 2022. 162 p. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>
30. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(3):233–54.
31. Anbari K. *Colorectal Cancer : Risk Factors , Novel Approaches in Molecular Screening and Treatment.*
32. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. International Agency for Research on Cancer (IARC). [cited 2025 May 30]. Colorectal cancer – Globocan 2022. Available from: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/colorectal-cancer/>
33. Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, Brierley J, Morris E, Bray F, et al. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. *Int J Cancer.* 2019;144(12):2992–3000.
34. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol* [Internet]. 2021;14(10):101174. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174>
35. Matsuda T. *Colorectal Cancer : Epidemiology , Risk Factors , and Public Health Strategies.* 2025;91–9.

36. Sung H, Siegel RL, Laversanne M, Jiang C, Morgan E, Zahwe M, et al. Colorectal cancer incidence trends in younger versus older adults: an analysis of population-based cancer registry data. *Lancet Oncol* [Internet]. 2025;26(1):51–63. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(24\)00600-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(24)00600-4)
37. SEER. Coding and Staging Manual 2015. 2015;159(15):9992.
38. Carethers JM. Racial and ethnic disparities in colorectal cancer incidence and mortality. *Adv Cancer Res*. 2021;151(Table 1):197–229.
39. al. R et. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2018;176(5):139–48.
40. Swanton C, Weeden CE, Hill W, Lim EL, Gro E. II Impact of risk factors on early cancer evolution. 2023;(1):1541–63.
41. Factors R. *Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention*. 2024;
42. Veettil SK, Wong TY, Loo YS, Playdon MC, Lai NM, Giovannucci EL, et al. Role of Diet in Colorectal Cancer Incidence: Umbrella Review of Meta-analyses of Prospective Observational Studies. *JAMA Netw Open*. 2021;4(2):E2037341.
43. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-Analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 2013;24(6):1207–22.
44. Farvid MS, Sidahmed E, Spence ND, Mante Angua K, Rosner BA, Barnett JB. Consumption of red meat and processed meat and cancer incidence: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 2021;36(9):937–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10654-021-00741-9>
45. Sawicki T, Ruskowska M, Danielewicz A. Factors , Development , Symptoms and Diagnosis. *Mdpi*. 2021;(March2021):1–23.
46. Chu AH, Lin K, Croker H, Kefyalew S, Markozannes G, Tsilidis KK, et al. Dietary-Lifestyle Patterns and Colorectal Cancer Risk: Global Cancer Update Programme (CUP Global) Systematic Literature Review. *Am J Clin Nutr*. 2025;121(5):986–98.
47. Murphy N, Moreno V, Hughes DJ, Vodicka L, Vodicka P, Aglago EK, et al. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2019;69(March):2–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005>
48. Weledji E. The Etiology and Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Rem Publ LLC*. 2024;9(2046):1–7.
49. Xiong L, Liu H shan, Zhou C, Yang X, Huang L, Jie H qing, et al. A novel protein encoded by circINSIG1 reprograms cholesterol metabolism by promoting the ubiquitin-dependent degradation of INSIG1 in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2023;22(1):1–16.
50. Kim LA, Han J, Kim T Il, Park JJ, Lee JM, Kim JK, et al. Circulating RNA Markers Associated with Adenoma–Carcinoma Sequence in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2025;26(4):1–14.
51. Dwyer ML, Colombo A, Bozzi G. Retrieval technique of a PTCA guidewire. *G Ital Cardiol*. 1989;19(2):170–2.

52. Khan I. Understanding and Targeting the Colon Cancer Pathogenesis: A Molecular Perspective. *Brazilian J Pharm Sci.* 2022;58:1–14.
53. Papaccio F, Cabeza-Segura M, García-Micó B, Gimeno-Valiente F, Zúñiga-Trejos S, Gambardella V, et al. Decoding chromosomal instability insights in CRC by integrating omics and patient-derived organoids. *J Exp Clin Cancer Res [Internet].* 2025;44(1):1–21. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13046-025-03308-8>
54. Li H, Yang F, Bai B, Jiang Z, Li B, Fu G, et al. Tumor associated chromosomal instability drives colorectal adenoma to adenocarcinoma progression based on 17 year follow up evidence. *Sci Rep.* 2025;15(1):1–11.
55. Gupta R, Sinha S, Paul RN. The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer [Internet].* 2018;42(6):548–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2018.06.010>
56. Smit WL, Spaan CN, De Boer RJ, Ramesh P, Garcia TM, Meijer BJ, et al. Driver mutations of the adenoma-carcinoma sequence govern the intestinal epithelial global translational capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(41):25560–70.
57. Fredrick S. Leach, Nicholas C. Nicolaidis, Nickolas Papadopoulos, Bo Liu, Jin Jen, Ramon Parsons, et al. Mutations of mutS Homolog in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cell.* 1993;75:1215–25.
58. Zhang X, Chen S, Yu J, Zhang Y, Lv M, Zhu M. Analysis of human muts homolog 2 missense mutations in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(5):6275–82.
59. Taieb J, Svrcek M, Cohen R, Basile D, Tougeron D, Phelip JM. Deficient mismatch repair/microsatellite unstable colorectal cancer: Diagnosis, prognosis and treatment. *Eur J Cancer [Internet].* 2022;175:136–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.07.020>
60. Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Med.* 2023;59(9).
61. Ionescu VA, Gheorghe G, Baban IA, Barbu A, Georgescu TF, Tiuca LC, et al. Prognostic Differences Between Early-Onset and Late-Onset Colorectal Cancer. *Med.* 2025;61(3).
62. Debela DT, Muzazu SGY, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, et al. New approaches and procedures for cancer treatment : Current perspectives. 2021;
63. Pathak PS, Chan G, Deming DA, Chee CE. State-of-the-Art Management of Colorectal Cancer: Treatment Advances and Innovation. *Am Soc Clin Oncol Educ B.* 2024;44(3).
64. Fadlallah H, El Masri J, Fakhereddine H, Youssef J, Chemaly C, Doughan S, et al. Colorectal cancer: Recent advances in management and treatment. *World J Clin Oncol.* 2024;15(9):1136–56.
65. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther [Internet].* 2020;206:107447. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>
66. Peng C, Saffo S, Oberstein PE, Shusterman M, Thomas C, Becker DJ, et al. Omission of 5-Fluorouracil Bolus From Multidrug Regimens for Advanced

- Gastrointestinal Cancers: A Multicenter Cohort Study. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2024;22(8):1–7.
67. Maslarinou A, Manolopoulos VG, Ragia G. Pharmacogenomic-guided dosing of fluoropyrimidines beyond DPYD: time for a polygenic algorithm? *Front Pharmacol*. 2023;14(May):1–22.
68. Minegaki T, Takara K, Hamaguchi R, Tsujimoto M, Nishiguchi K. Factors affecting the sensitivity of human-derived esophageal carcinoma cell lines to 5-fluorouracil and cisplatin. *Oncol Lett*. 2013;5(2):427–34.
69. Shiga T, Hiraide M. Cardiotoxicities of 5-Fluorouracil and Other Fluoropyrimidines. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21(4).
70. Alese OB, Wu C, Chapin WJ, Ulanja MB, Zheng-Lin B, Amankwah M, et al. Update on Emerging Therapies for Advanced Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2023;(43):1–18.
71. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol*. 2014;20(30):10316–30.
72. Kumar A, Gautam V, Sandhu A, Rawat K, Sharma A, Saha L. Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. *World J Gastrointest Surg*. 2023;15(4):495–519.
73. Neugut AI, Lin A, Raab GT, Hillyer GC, Keller D, O’Neil DS, et al. FOLFOX and FOLFIRI Use in Stage IV Colon Cancer: Analysis of SEER-Medicare Data. *Clin Colorectal Cancer* [Internet]. 2019;18(2):133–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.01.005>
74. Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, Miles D, Coleman RL, Deurloo R, et al. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2020;86(December 2019):102017. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102017>
75. Beniwal SS, Lamo P, Kaushik A, Lorenzo-Villegas DL, Liu Y, MohanaSundaram AS. Current Status and Emerging Trends in Colorectal Cancer Screening and Diagnostics. *Biosensors*. 2023;13(10).
76. Marra A, Morganti S, Pareja F, Campanella G, Bibeau F, Fuchs T, et al. Artificial intelligence entering the pathology arena in oncology: current applications and future perspectives. *Ann Oncol* [Internet]. 2025;xxx(xxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2025.03.006>
77. Thakur N, Yoon H, Chong Y. Current trends of artificial intelligence for colorectal cancer pathology image analysis: A systematic review. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1–19.
78. Babu B, Singh J, Felipe J, González S, Zalmi S, Ahmed A, et al. A Narrative Review on the Role of Artificial Intelligence (AI) in Colorectal Cancer Management. 2025;17(2):1–15.
79. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: A review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2021;325(7):669–85.

80. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2015;(February 2016):1–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
81. Mirza-Aghazadeh-Attari M, Darband SG, Kaviani M, Mihanfar A, Aghazadeh Attari J, Yousefi B, et al. DNA damage response and repair in colorectal cancer: Defects, regulation and therapeutic implications. *DNA Repair (Amst)*. 2018;69(May):34–52.
82. Shinji S, Ogawa Y, Yamada T, Matsuda A, Uehara K, Yokoyama Y, et al. Morphological and functional analysis of colorectal cancer cell lines in 2D and 3D culture models. *Sci Rep* [Internet]. 2025;15(1):3047. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39856264%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC11760527>
83. Heck KA, Lindholm HT, Niederdorfer B, Tsirvouli E, Kuiper M, Flobak Å, et al. Characterisation of Colorectal Cancer Cell Lines through Proteomic Profiling of Their Extracellular Vesicles. *Proteomes*. 2023;11(1):1–20.
84. Kifle ZD, Tadele M, Alemu E, Gedamu T, Ayele AG. A recent development of new therapeutic agents and novel drug targets for cancer treatment. *SAGE Open Med*. 2021;9.
85. Anand U, Dey A, Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis*. 2023;10(4):1367–401.
86. Leibovitz A. The Establishment of Cell Lines from Human Solid Tumors. Elsevier,. 1985;4(Advances in Cell Culture):249–60.
87. Hewitt RE, McMarlin A, Kleiner D, Wersto R, Martin P, Tsoskas M, et al. Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol*. 2000;192(4):446–54.
88. Siekmann W, Tina E, VON SYDOW AK, Gupta A. Effect of lidocaine and ropivacaine on primary (SW480) and metastatic (SW620) colon cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2019;18(1):395–401.
89. Martínez-Jiménez F, Muiños F, Sentís I, Deu-Pons J, Reyes-Salazar I, Arnedo-Pac C, et al. A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2020;20(10):555–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-0290-x>
90. Mccombs B, Mccoy E, St JC, So IN, Berlix JERRYD. Morphologic and immunologic studies of.
91. De'angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De'angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018;89(2):97–101.
92. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2010;138(6):2059–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>
93. Rajput A, Dominguez San Martin I, Rose R, Beko A, LeVea C, Sharratt E, et al. Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. *J Surg Res*. 2008;147(2):276–81.
94. Wangsa D, Braun R, Schiefer M, Gertz EM, Bronder D, Quintanilla I, et al. The evolution of single cell-derived colorectal cancer cell lines is dominated by the

continued selection of tumor-specific genomic imbalances, despite random chromosomal instability. *Carcinogenesis*. 2018;39(8):993–1005.

95. Kirkland SC. Cell Differentiation in Colorectal Carcinoma. *Color Cancer*. 1989;322–9.

96. Brattain MG, Marks ME, McCombs J, Finely W, Brattain DE. Characterization of human colon carcinoma cell lines isolated from a single primary tumour. *Br J Cancer*. 1983;47(3):373–81.

97. Olejniczak A, Szaryńska M, Kmiec Z. In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2018;52(2):599–612.

98. Druzhkova I, Potapov A, Ignatova N, Bugrova M, Shchechkin I, Lukina M, et al. Cell hiding in colorectal cancer: correlation with response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2024;14(1):1–13.

99. Bazira PJ, Ellis H, Mahadevan V. Anatomy and physiology of the breast. *Surg (United Kingdom)* [Internet]. 2022;40(2):79–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.015>

100. Cuadrado G de A, de Andrade MFC, Akamatsu FE, Jacomo AL. Lymph drainage of the upper limb and mammary region to the axilla: anatomical study in stillborns. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2018;169(2):251–6. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4686-1>

101. Davies BP, Crew RC, Cochrane ALK, Davies K, Figueiredo Baptista A, Jeckel S, et al. An ovine model for investigation of the microenvironment of the male mammary gland. *J Anat*. 2024;245(3):405–19.

102. Madrid EIB. Anatomy and physiology of lactation. *Gac Med Caracas*. 2021;129(1):S538–45.

103. Fraker JL, Clune CG, Sahni SK, Yaganti A, Vegunta S. Prevalence, impact, and diagnostic challenges of benign breast disease: A narrative review. *Int J Womens Health*. 2023;15(May):765–78.

104. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229–63.

105. Fernández CY, Rocha A, Azam M, Alvarez N, Min K, Batista AA, et al. Synthesis, Characterization, DNA Binding and Cytotoxicity of Copper(II) Phenylcarboxylate Complexes. *Inorganics*. 2023;11(10):1–12.

106. Santucci C, Mignozzi S, Malvezzi M, Boffetta P, Collatuzzo G, Levi F, et al. European cancer mortality predictions for the year 2024 with focus on colorectal cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 2024;35(3):308–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2025.01.014>

107. Hossain MS, Ferdous S, Karim-Kos HE. Breast cancer in South Asia: A Bangladeshi perspective. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2014;38(5):465–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2014.08.004>

108. American Cancer Society. Breast Cancer What is breast cancer? *Am Cancer Soc Cancer Facts Fig Atlanta, Ga Am Cancer Soc* [Internet]. 2022;1–19. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>

109. INCA. A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas [Internet]. 2019. 1–89 p. Available from: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf
110. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, Kramer JL, Newman LA, Minihan A, et al. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(6):524–41.
111. MICHA R. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(1):100–106.
112. Dubsy P, Jackisch C, Im SA, Hunt KK, Li CF, Unger S, et al. BRCA genetic testing and counseling in breast cancer: how do we meet our patients' needs? *npj Breast Cancer* [Internet]. 2024;10(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41523-024-00686-8>
113. Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. *N Engl J Med.* 2021;384(5):428–39.
114. Sokolova A, Johnstone KJ, McCart Reed AE, Simpson PT, Lakhani SR. Hereditary breast cancer: syndromes, tumour pathology and molecular testing. *Histopathology.* 2023;82(1):70–82.
115. Fortner RT, Sisti J, Chai B, Collins LC, Rosner B, Hankinson SE, et al. Parity, breastfeeding, and breast cancer risk by hormone receptor status and molecular phenotype: Results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Res.* 2019;21(1):1–9.
116. Britt K, Ashworth A, Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14(4):907–33.
117. Carvalho E, Canberk S, Schmitt F. Molecular Subtypes and Mechanisms of Breast Cancer : Precision Medicine Approaches for Targeted Therapies. 2025;
118. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Med (United States).* 2024;103(3):E36905.
119. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening [Internet]. Vol. 151, *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Elsevier Inc.; 2017. 1–32 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>
120. Mo L, Puglisi M, Pavone G, Mo G, Martorana F. Unveiling Prostate-Specific Membrane Antigen's Potential in Breast Cancer Management. 2025;1–12.
121. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanislawek A. Łukasiewicz.Pdf. *Cancers (Basel).* 2021;13:4287.
122. Ishii K, Morii N, Yamashiro H. <p>Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy</p>. *Core Evid.* 2019;Volume 14:51–70.
123. Wang J, Wu SG. Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast Cancer Targets Ther.* 2023;15(October):721–30.
124. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1997;57(15):3071–8.

125. Aniogo EC, George BP, Abrahamse H. Characterization of resistant MCF-7 breast cancer cells developed by repeated cycles of photodynamic therapy. *Front Pharmacol.* 2022;13(September):1–10.
126. Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel).* 2017;9(5):1–45.
127. Li Y, Yang D, Yin X, Zhang X, Huang J, Wu Y, et al. Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer–Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor–Positive Breast Cancer. *JAMA Netw Open.* 2020;3(1):E1918160.
128. Wu JR, Zhao Y, Zhou XP, Qin X. Estrogen receptor 1 and progesterone receptor are distinct biomarkers and prognostic factors in estrogen receptor-positive breast cancer: Evidence from a bioinformatic analysis. *Biomed Pharmacother [Internet].* 2020;121(November 2019):109647. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109647>
129. Holliday DL, Speirs V. Choosing correct breast cancer cell line for breast cancer research. *Breast cancer Res [Internet].* 2011;13(4):1–7. Available from: <http://download.springer.com/static/pdf/110/art%253A10.1186%252Fbcr2889.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fbreast-cancer-research.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2Fbcr2889&token2=exp=1494268443~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F110%2Fart%25253A10.1186%25252Fbcr2889.pdf>
130. Dissanayake R, Towner R, Ahmed M. Metastatic Breast Cancer: Review of Emerging Nanotherapeutics. *Cancers (Basel).* 2023;15(11):20–30.
131. Xu H, Xu B. Breast cancer: Epidemiology , risk factors and screening. 2023;35(6):565–83.
132. Mustapha A, Ismail A, Abdullahi SU, Hassan ON, Ugwunnaji PI, Berinyuy EB. Cancer Chemotherapy: A Review Update of the Mechanisms of Actions, Prospects, and Associated Problems. *BIOMED Nat Appl Sci.* 2021;01(01):01–19.
133. Konieczny M, Sawicka J, Izabela G. Health-Related Quality of Life and Disease Acceptance Among Women with Breast Cancer Pre- and Post-Neoadjuvant Chemotherapy. 2025;1–12.
134. Kaur R, Bhardwaj A, Gupta S. Cancer treatment therapies : traditional to modern approaches to combat cancers. 2023;9663–76.
135. Qi L, Luo Q, Zhang Y, Jia F, Zhao Y, Wang F. Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chem Res Toxicol.* 2019;32(8):1469–86.
136. Zhang C, Xu C, Gao X, Yao Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics.* 2022;12(5):2115–32.
137. Makovec T. Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol.* 2019;53(2):148–58.
138. Elmorsy EA, Saber S, Hamad RS, Abdel-Reheim MA, El-kott AF, AlShehri MA, et al. Advances in understanding cisplatin-induced toxicity: Molecular mechanisms and protective strategies. *Eur J Pharm Sci [Internet].* 2024;203(August):106939. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106939>
139. Festa RA, Thiele DJ. Copper: an Essential Metal in Biology Copper in prokaryotes. Festa RA, Thiele DJ *Copp An Essent Met Biol Curr Biol [Internet].*

- 2011;21(21):877–83. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3718004/pdf/nihms487405.pdf>
140. Li C, Li Y, Ding C. The role of copper homeostasis at the host-pathogen axis: From bacteria to fungi. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1):1–15.
141. Nierengarten J. In *My Element : Copper*. *Chem – A Eur J.* 2019;25(1):16–8.
142. Ji P, Wang P, Chen H, Xu Y, Ge J, Tian Z, et al. Potential of Copper and Copper Compounds for Anticancer Applications. *Pharmaceuticals.* 2023;16(2).
143. Chen Z, Jiang R, Chen M, Zheng J, Chen M, Braidy N, et al. Multi-copper ferroxidase deficiency leads to iron accumulation and oxidative damage in astrocytes and oligodendrocytes. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–9.
144. Quist DA, Diaz DE, Liu JJ, Karlin KD. Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes. *J Biol Inorg Chem.* 2017;22(2–3):253–88.
145. Rondanelli M, Faliva MA, Infantino V, Gasparri C, Iannello G, Perna S, et al. Copper as dietary supplement for bone metabolism: A review. *Nutrients.* 2021;13(7):1–9.
146. Intakes DR, Vanadium U, Levels ZR, Intakes DR, Committee S, Evaluation S, et al. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc : a report of the Panel on Micronutrients ... [et al.], Standing Committee on the Scientific Eva. 2002.
147. Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch Toxicol.* 2014;88(11):1929–38.
148. Guo Z, Orädd F, Bågenholm V, Grønberg C, Ma JF, Ott P, et al. Diverse roles of the metal binding domains and transport mechanism of copper transporting P-type ATPases. *Nat Commun.* 2024;15(1).
149. Fatfat M, Merhi RA, Rahal O, Stoyanovsky DA, Zaki A, Haidar H, et al. Copper chelation selectively kills colon cancer cells through redox cycling and generation of reactive oxygen species. *BMC Cancer.* 2014;14(1):1–12.
150. Molinaro C, Martoriati A, Pelinski L, Cailliau K. Copper complexes as anticancer agents targeting topoisomerases i and ii. Vol. 12, *Cancers.* MDPI AG; 2020. p. 1–26.
151. Ceramella J, Mariconda A, Iacopetta D, Saturnino C, Barbarossa A, Caruso A, et al. From coins to cancer therapy: Gold, silver and copper complexes targeting human topoisomerases. *Bioorganic Med Chem Lett [Internet].* 2020;30(3):126905. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126905>
152. Xie J, Yang Y, Gao Y, He J. Cuproptosis: mechanisms and links with cancers. *Mol Cancer [Internet].* 2023;22(1):1–30. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01732-y>
153. Liu ZL, Chen HH, Zheng LL, Sun LP, Shi L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):1–39.
154. Ge EJ, Bush AI, Casini A, Cobine PA, Cross JR, DeNicola GM, et al. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nat Rev Cancer.* 2022;22(2):102–13.

155. Cong Y, Li N, Zhang Z, Shang Y, Zhao H. Cuproptosis : molecular mechanisms , cancer prognosis , and therapeutic applications. 2025;1:1–17.
156. Ma ZY, Qiao X, Xie CZ, Shao J, Xu JY, Qiang ZY, et al. Activities of a novel Schiff Base copper(II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2012;117:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.08.007>
157. Małyszko M, Przybyłkowski A. Copper and Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024;16(21):1–15.
158. Kizilkaya H, Dag B, Aral T, Genc N, Erenler R. Synthesis, characterization, and antioxidant activity of heterocyclic Schiff bases. *J Chinese Chem Soc*. 2020;67(9):1696–701.
159. Matela G. Schiff Bases and Complexes: A Review on Anti-Cancer Activity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020;20(16):1908–17.
160. Schiff H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: eine neue Reihe organischer Basen. *Justus Liebigs Ann Chem*. 1864;131(1):118–9.
161. Fabbrizzi L. Beauty in chemistry: Making artistic molecules with schiff bases. *J Org Chem*. 2020;85(19):12212–26.
162. Akhuseyin E, Pepe Y, Demir N, Yıldız M. Chromogenic sensing , biological , and optical properties of Schiff bases of. 2024;1295(September 2023).
163. Ghanghas P, Choudhary A, Kumar D, Poonia K. Coordination metal complexes with Schiff bases : Useful pharmacophores with comprehensive biological applications. *Inorg Chem Commun* [Internet]. 2021;130(June):108710. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108710>
164. Marinova PE. Synthesis , Investigation , Biological Evaluation , and Application of Coordination Compounds with Schiff Base — A Review. 2025;
165. Soliman AIA, Sayed M, Elshanawany MM, Younis O, Ahmed M, El-dean AMK, et al. Base-Free Synthesis and Photophysical Properties of New Schiff Bases Containing Indole Moiety. 2022;
166. Pratap D, Kumar A, Verma A. Results in Chemistry Schiff bases and their possible therapeutic applications : A review. *Results Chem* [Internet]. 2025;13(September 2024):101941. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101941>
167. Khaldoune K, Hasnaoui A, Fdil N, Oubella A, Lafhal K, Oubahmane M, et al. Exploring anticancer activity, acute toxicity, and molecular docking of synthesized schiff bases and schiff base-palladium complex. *Inorg Chem Commun* [Internet]. 2023;156(July):111089. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111089>
168. Krasnovskaya O, Naumov A, Guk D, Gorelkin P, Erofeev A, Beloglazkina E, et al. Copper coordination compounds as biologically active agents. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).
169. Iacopetta D, Catalano A, Ceramella J, Mariconda A, Amato AD, Checconi P, et al. Chitosan-Based Schiff Bases (CSBs) and Their Metal Complexes : Promising Antimicrobial Agents. 2025;

170. Sohel Rana M, Azbar Rayhan NM, Hossain Emon MS, Tanvir Islam M, Khandaker Rathry, Mahadi Hasan M, et al. Antioxidant activity of Schiff base ligands using the DPPH scavenging assay: an updated review. *RSC Adv* [Internet]. 2024;14(45):33094–123. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/ra/d4ra04375h>
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/ra/d4ra04375h>
171. Kaushik S, Kumar S, Malliga P, Vaishali RI. CHEMISTRY Promising Schiff bases in antiviral drug design and discovery. 2023;1063–76.
172. Raczuk E, Dmochowska B, Samaszko-Fiertek J, Madaj J. Different Schiff Bases—Structure, Importance and Classification. *Molecules*. 2022;27(3).
173. Nasir H, Abbas N, Arfan M, Aftab U, Rafi A, Hafeez H, et al. Schiff bases targeting an Sw-480 colorectal cell line: synthesis, characterization, ds-DNA binding and anticancer studies. *RSC Adv*. 2025;15(3):1527–39.
174. Malik MA, Dar OA, Gull P, Wani MY, Hashmi AA. Heterocyclic Schiff base transition metal complexes in antimicrobial and anticancer chemotherapy. *Medchemcomm*. 2018;9(3):409–36.

CURRICULUM VITAE (LATTES)


Fátima Rui Ráice

Curriculum Vitae (Lattes)

Identificação

Nome Fátima Rui Ráice

Nascimento 10/06/2000 - Maputo/ - Moçambique

Lattes ID  7231815079267868

Nome em citações bibliográficas RÁICE, F. R.; RÁICE, F

Formação acadêmica/titulação

2023 Mestrado em BIOCÊNCIAS.
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DE PORTO ALEGRE, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil

2017 - 2022 Graduação em Biologia e Saúde.
Universidade Eduardo Mondlane, UEM, Maputo, Moçambique
Título: Perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de
objectos e superfícies higienizadas no âmbito da prevenção da
COVID-19 em duas Instituições de Ensino Superior na Cidade de
Maputo, Ano de obtenção: 2022
Orientador: Cristiano Macuamule

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. FERREIRA, W. V.; RAICE, F. R.; SILVA, A. F.; NUNES, I. J.; CERVO, R.; CARGNELUTTI, R.; SAFF, J.; MILANI, J. L. S.; CASAGRANDE JR, O. L.; PINHEIRO, A. C.; **RÁICE, F. R.** Synthesis, characterization, electronic properties, and cytotoxic activities on cancer cells line of novel Cu(II) complexes with benzimidazole-Schiff base tridentate ligand. JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE. v.1327, p.1 - 17, 2025.

2. Bauhofer, AFL; MIRANDA, E.; CHISSAQUE, A.; ANTONIO, L.; CAMPOS, F.; POLOLO, R.; IAHAIA, F.; GATAMBIRE, A.; RAICE, F.; DJEDJE, M.; SALENCIA, J.; MAHOLELA, P.; GONCALVES, L.; INLAMEA, O; Deus, N. d.; **RÁICE, F. R.** Burden of COVID-19 in the Pediatric Population at Hospital Central de Maputo, Mozambique, October 2020 to October 2022. Viruses-Basel. v.16, p.1 - 9, 2024.

3. Bauhofer, AFL; MIRANDA, E.; CHISSAQUE, A.; ANTONIO, L.; POLOLO, R.; DJEDJE, M.; **RÁICE, F.**; CAMPOS, F.; SALENCIA, J.; GONCALVES, L.; INLAMEA, O; Deus, N. d.; USSIVANE, E.. SARS-CoV-2 in Mozambican primary school-aged children at Maputo City and Province: a cross-sectional study from a low-income country. BMC Pediatrics. v.16, p.1 - 9, 2024.