



# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

**COMPOSTOS NAFTOQUINÔNICOS: ATIVIDADE BIOLÓGICA,  
FOTOPROTETORA E ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM *ct*DNA**

ARI SOUZA GUIMARÃES

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 – Maceió - AL

ARI SOUZA GUIMARÃES

**COMPOSTOS NAFTOQUINÔNICOS: ATIVIDADE BIOLÓGICA,  
FOTOPROTETORA E ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM *ct*DNA**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, como requisito parcial para à obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Isis Martins Figueiredo

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Helena Cardoso

**Maceió-AL**

**2019**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

G963c Guimaraes, Ari Souza

Compostos naftoquinônicos: Atividade biológica, fotoprotetora e estudos de interação com *ctDNA*/ Guimaraes, Ari Souza – 2019.  
89 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isis Martins Figueiredo

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Cardoso

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 77-87.

Anexos: f. 88-89.

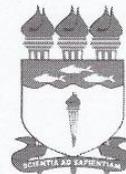
1. Naftoquinonas 2. Filtro solar.3. Antioxidantes.4. *ctDNA* (*Calf thymus*). 5. Fluorescência. 6. Espectro ultravioleta. B. I. Título.

CDU: 661.725.852:547.567



# PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

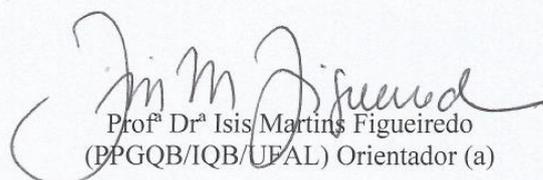


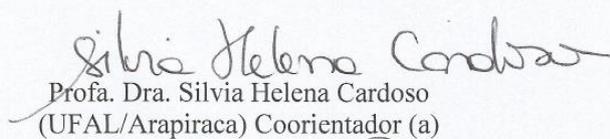
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email:ppgqb.ufal@gmail.com

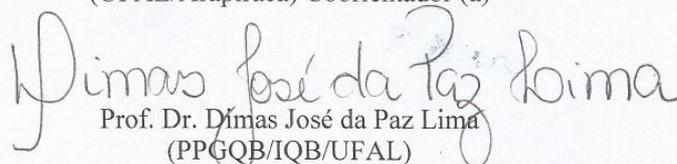
## FOLHA DE APROVAÇÃO

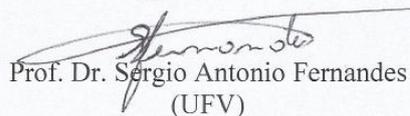
Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **ARI SOUZA GUIMARÃES**, intitulada: **“Compostos naftoquinônicos: atividade biológica, fotoprotetora e estudos de interação com *cr*DNA”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 25 de julho de 2019, às 9h30, na sala de reuniões do IQB/UFAL.

### COMISSÃO JULGADORA

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isis Martins Figueiredo  
(PPGQB/IQB/UFAL) Orientador (a)

  
Profa. Dra. Silvia Helena Cardoso  
(UFAL/Arapiraca) Coorientador (a)

  
Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Sérgio Antonio Fernandes  
(UFV)

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora prof. Dr<sup>a</sup> Isis Martins Figueiredo, pelas orientações, todos os momentos de descontração e por ter me aceitado como orientando, o que me levou engajar-me no grupo de pesquisa LINQA, permitindo-me um maior amadurecimento pessoal e profissional.

Ao prof. Dr<sup>o</sup> Josué Carinhonha Caldas Santos, por tamanho profissionalismo, pela confiança, apoio, orientação sempre quando requisitada, tenho muito respeito e admiração por sua pessoa.

A minha co-orientadora prof. Dr<sup>a</sup> Silvia Helena Cardoso por ter aberto a porta inicial me aceitando como orientando e permitindo um maior contato com o caminho da pesquisa científica.

A Universidade Federal de Alagoas-UFAL, até o momento pública, que forneceu subsídios para minha formação.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia-IQB a ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, pela oportunidade de crescimento científico e profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq e aos demais órgãos de fomento, CAPES e FAPEAL pelo apoio financeiro.

A professora Mary Ann Foglio pela realização dos estudos da atividade antiproliferativa.

Aos meus pais, Maria e Francisco, irmãos e irmãs Adeildo, Alexandre, Adriely, Samara e Samila, sobrinhas e sobrinhos Mayra, Valentina, Albert e Pedro pela compreensão, paciência, amor e primordial apoio, vocês são os catalisadores da minha jornada.

Aos meus tios João e Larissa por todo o apoio durante essa jornada que venho trilhando. As minhas primas Luana, Renata e ao amigo Adriel por todo o apoio durante minha chegada em Maceió.

A minha namorada Mayane, pelo apoio, compreensão, companheirismo, carinho e confiança durante a realização deste trabalho.

As minhas companheiras de curso Camila e Roberta pela amizade, risadas, farras, sem vocês essa jornada não seria a mesma.

Aos companheiros de convivência diária durante a construção dessa pesquisa, Everton, Giclênio e Raul (que engoliram todo o ego dos físicos kkkk... e me incluíram no ciclo de amizade) que aguentaram meus sensos de veracidade (patadas inconscientes).

A todos os amigos do laboratório de instrumentação e desenvolvimento em química analítica (LINQA), por todo o apoio, companheirismo, ajuda e paciência durante a realização deste trabalho, em especial a Marina e Wood pelos conhecimentos partilhados e por todas as horas que me cederam, meu muito obrigado!

Aos amigos da Física, Júlio, Ícaro, Fabi, Laís, Pâmela e Fernanda por todos os momentos de descontração quando eu estava a beira de pirar.

E a todos que não foram citados, mais estão cientes de sua participação direta ou indireta na realização deste trabalho.

## RESUMO

Atualmente vêm se intensificando o interesse pela química das naftoquinonas devido ao seu vasto espectro de atividades biológicas. As naftoquinonas fazem parte da classe das quinonas, que são descritas por provocarem o estresse oxidativo no meio celular, o que lhes confere atividades farmacológicas expressivas, estando a atividade antiproliferativa em evidência. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo: i) determinar o Fator de Proteção Solar (FPS); ii) investigar a capacidade antioxidante; iii) determinar as propriedades ADME *in silico* iv) avaliar a atividade antiproliferativa, bem como, v) determinar os mecanismos de interação com DNA de derivados naftoquinônicos *in vitro*, empregando técnicas espectroscópicas de absorção no UV-Visível e fluorescência molecular. Inicialmente foi realizado a avaliação do FPS-UVB *in vitro*, a partir da qual pôde-se observar que alguns dos compostos avaliados apresentaram um FPS expressivo, nos quais, na concentração de 200  $\mu\text{M}$  estes valores variaram de 4,2-25,6. Além disso, 3 dos 5 derivados naftoquinônicos nitrogenados apresentaram um FPS aproximado ou superior ao padrão benzofenona-3 (24,6). Para o estudo da capacidade antioxidante, foi possível observar que todos os compostos avaliados foram ativos como sequestradores dos radicais DPPH e ABTS, com uma faixa de  $\text{IC}_{50}$  entre 14,7-26,9 e 3,8-34,1  $\mu\text{m}/\text{mL}$  respectivamente. Os compostos avaliados mostraram-se mais ativos de acordo com o segundo método, evidenciando uma maior capacidade hidrofílica dos compostos. Em seguida, foram calculadas as propriedades ADME *in silico* das moléculas, demonstrando que essas propriedades estão de acordo as regras que preveem a eficácia de novos candidatos a fármacos. O estudo da atividade antiproliferativa foi realizado frente a nove linhagens celulares tumorais humanas. Os compostos apresentaram-se ativos a uma concentração inferior a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e, em alguns casos, houve derivados com atividade superior ou similar ao fármaco padrão doxorubicina. Os estudos de interação mostraram que os compostos avaliados interagem com o *ctDNA* formando um complexo supramolecular não fluorescente por meio do mecanismo de *quenching* estático, com uma constante ( $K_{sv}$ ) da ordem de  $10^4 \text{ L mol}^{-1}$  e uma constante de ligação ( $K_b$ ) de  $1,38 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ . A partir dos estudos de competição com sondas hoechst e brometo de etídio, foi possível avaliar o modo de ligação desses compostos, o qual foi estabelecido ocorrer via *groove*.

**Palavras-chave:** Naftoquinonas; FPS-UVB; Antioxidantes; *ctDNA* (*Calf thymus*); UV-Vis; Fluorescência molecular.

## ABSTRACT

Currently have been intensifying interest in the chemistry of naphthoquinones because of their wide range of biological activities. The naphthoquinones are part of the class of quinones, which are described as provoking oxidative stress in the cellular environment, which gives them expressive pharmacological activities and the antiproliferative activity being evidence. In this context, the present work aimed at: i) to determine the Sun Protection Factor (SPF); ii) to investigate antioxidant capacity; iii) to determine ADME properties *in silico* iv) to evaluate the antiproliferative activity, as well as, v) to determine the mechanisms of DNA interaction of naphthoquinone derivatives *in vitro* using spectroscopic techniques for UV-visible absorption and molecular fluorescence. Initially the SPF-UVB evaluation *in vitro* was carried out, from which it could be observed that some compounds showed an expressive SPF, in which in the concentration of 200  $\mu\text{M}$  these values ranged from 4.2-25.6. In addition, 3 of the 5 nitrogenated naphthoquinone derivatives had an SPF of approximately or higher than the benzophenone-3 standard (24.6). For the study of the antioxidant capacity, it was possible to observe that all compounds analyzed were active as DPPH and ABTS radicals sequesters with a range of between  $\text{IC}_{50}$  14.7-26.9 and 14.7-26.9 and 3.8-34.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, being these more active against the second method, evidencing a greater hydrophilic character of the compounds. Then, the ADME *in silico* properties of the molecules were calculated, demonstrating that these properties are in accordance with rules that predict the efficacy of new drug candidates. The study of antiproliferative activity was performed against nine human tumor cell lines. The compounds were active at a concentration below 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and in some cases there were derivatives with superior or similar activity to the standard drug doxorubicin. The interaction studies showed that the evaluated compounds interact with the ctDNA forming a non-fluorescent supramolecular complex by means of the static quenching mechanism, with a constant ( $K_{sv}$ ) of the order of  $10^4 \text{ L mol}^{-1}$  and a binding constant ( $K_b$ ) of  $1.38 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ . From the competition studies with hoechst probes and ethidium bromide, it was possible to evaluate the mode of binding of these compounds, which was established to occur via groove.

**Keywords:** Naphthoquinones; SPF-UVB; Antioxidants; ctDNA (Calf thymus); UV-Vis; Molecular fluorescence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Naftoquinonas básicas e alguns isômeros dessa classe.....	16
<b>Figura 2.</b> Estruturas de alguns iminos, aminos e acetaminos derivados da antraquinona e naftoquinona. ....	17
<b>Figura 3.</b> Estimativas mundial para a taxa de incidência de cânceres, em ambos os sexos entre idade de 0-74 anos para 2018. ....	19
<b>Figura 4.</b> Estrutura de alguns agentes antineoplásicos utilizados atualmente.....	21
<b>Figura 5.</b> Estrutura dupla hélice do DNA e emparelhamento de bases. ....	23
<b>Figura 6.</b> Conformações do DNA: A, B, Z, <i>G-quadruplex</i> e <i>i-motif</i> .....	24
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática de possíveis modos de interação DNA-ligante. ....	28
<b>Figura 8.</b> Adição nucleofílica as naftoquinonas do tipo 1,2 e 1,4. ....	40
<b>Figura 9.</b> Estruturas dos compostos naftoquinônicos estudados e do padrão BZF-3 e INH. ...	41
<b>Figura 10.</b> Espectro de absorção dos compostos de <b>1-8</b> demonstrando regiões de máxima absorção (UVA e UVB). ....	43
<b>Figura 11.</b> Transições eletrônicas nos compostos <b>4, 6 e 7</b> .....	44
<b>Figura 12.</b> FPS-UVB dos compostos de <b>1 a 8</b> , do <b>INH</b> e do <b>BZF-3</b> nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{M}$ .....	45
<b>Figura 13.</b> Espectros de absorção dos compostos naftoquinônicos de <b>1 a 3 (a)</b> e dos derivados nitrogenados de <b>4 a 8 (b)</b> na concentração de 100 $\mu\text{M}$ na região do UVB e UVA.....	46
<b>Figura 14.</b> Ligação de hidrogênio intramolecular existente entre os derivados naftoquinônicos nitrogenados de <b>4 a 8</b> . ....	48
<b>Figura 15.</b> Atividade antioxidante dos derivados naftoquinônicos de <b>1 a 8</b> e dos padrões trolox e quercetina pelo método de sequestro do radical DPPH $\cdot$ . ....	51
<b>Figura 16.</b> Atividade antioxidante dos derivados naftoquinônicos de <b>1 a 8</b> e dos padrões trolox e quercetina pelo método de ABTS $\cdot^+$ .....	54
<b>Figura 17.</b> Fotoprotetores regulamentados e aprovados mundialmente, que possuem baixo log P.....	58
<b>Figura 18.</b> Coeficiente de partição octanol/água (log P) dos compostos de 1 a 8 e do padrão BZF-3. ....	59
<b>Figura 19.</b> Permeabilidade cutânea (log Kp) dos compostos de <b>1 a 8</b> e do padrão <b>BZF-3</b> . ....	60

<b>Figura 20.</b> Atividade antiproliferativa do composto <b>6</b> e do padrão doxorrubicina frente a ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K562).....	63
<b>Figura 21.</b> Avaliação da interação <i>ctDNA</i> -ligante por fluorescência molecular. <b>a)</b> Espectro do composto <b>5</b> (10 $\mu$ M) com adições crescentes de <i>ctDNA</i> ; <b>b)</b> Curva para cálculo da constante Stern-Volmer, $K_{sv}$ , (processo de <i>quenching</i> ); <b>c)</b> Curva logarítmica para cálculo da constante de ligação ( $K_b$ ) e $n$ do complexo <i>ctDNA</i> -composto. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.....	65
<b>Figura 22.</b> Representação do processo de <i>quenching</i> <b>a)</b> dinâmico <b>b)</b> estático.....	66
<b>Figura 23.</b> Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema HO- <i>ctDNA</i> ( <b>a</b> ) e BE- <i>ctDNA</i> . a 30 °C ( <b>b</b> ) por competição com o composto <b>4</b> . Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	70
<b>Figura 24.</b> Constante de Stern-Volmer normalizada a $10^4$ para os dois sistemas sonda- <i>ctDNA</i> (HO e BE) para os compostos de <b>4</b> a <b>6</b> . Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	71
<b>Figura 25.</b> Espectro de absorção UV do <i>ctDNA</i> e dos compostos <b>4</b> ( <b>a</b> ), <b>5</b> ( <b>b</b> ) e <b>6</b> ( <b>c</b> ) (10 $\mu$ M) na ausência e na presença de <i>ctDNA</i> (10 $\mu$ M). Inserção: Os gráficos denotam o efeito hipercrômico causado com o aumento gradual da concentração de <i>ctDNA</i> (1-150 $\mu$ M) aos compostos de <b>4</b> a <b>6</b> . .....	73
<b>Figura 26.</b> Curva analítica para determinação da faixa ótima de análise dos compostos de <b>1-8</b> e da <b>BZF-3</b> . .....	88

## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Interação de elétrons não compartilhados com orbitais  $\sigma^*$  de ligantes adjacentes em compostos que possuem heteroátomos.....48
- Esquema 2.** Esquema reacional entre o radical DPPH• e um composto antioxidante.....50
- Esquema 3.** Propriedades redox das naftoquinonas. Redução de um elétron do núcleo da naftoquinona, para a formação do radical semiquinona e depois para a hidroquinona.....52
- Esquema 4.** Esquema representacional da formação genérica do radical ABTS<sup>•+</sup> .....53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo. ....	20
<b>Tabela 2.</b> Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda da região UVB. ....	36
<b>Tabela 3.</b> Comprimentos de onda de absorção máxima e absortividade molar dos compostos de <b>1 a 8</b> aferidos na concentração de 100 $\mu\text{M}$ . ....	44
<b>Tabela 4.</b> Propriedades ADME <i>in silico</i> dos compostos de <b>1 a 8</b> e do padrão para FPS, BZF-3. ....	56
<b>Tabela 5.</b> Concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular ( $\text{GI}_{50}$ ) em $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos compostos de <b>1 a 8</b> frente a nove linhagens de células tumorais humanas. ....	62
<b>Tabela 6.</b> Absorvância dos derivados naftoquinônicos nitrogenados avaliados de <b>4 a 6</b> (10 $\mu\text{M}$ ), <i>ctDNA</i> (10 $\mu\text{M}$ ) e composto- <i>ctDNA</i> (10 $\mu\text{M}$ ) no comprimento de onda de máxima absorção dos compostos. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C. ...	74
<b>Tabela 7.</b> Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) dos compostos de <b>1 a 8</b> , da BZF-3 e da INH aferidos a partir da curva analítica. ....	88
<b>Tabela 8.</b> Comprimentos de onda de absorção máxima e absortividade molar dos compostos de <b>1-8</b> aferidos na concentração de 200 $\mu\text{M}$ . ....	88
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros de interação dos derivados de naftoquinônicos com o <i>ctDNA</i> calculados a partir do ensaio HO. ....	89
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros de interação dos derivados de naftoquinônicos com o <i>ctDNA</i> calculados a partir do ensaio com BE. ....	89

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BE	Brometo de etídio
<i>ctDNA</i>	DNA <i>Calf Thymus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila
F	Fluorescência
FDA	Food and Drug Administration
FPS	Fator de proteção solar
FPS-UVB	Fator de Proteção Solar na região do ultravioleta B (290-320 nm)
GI <sub>50</sub>	Concentração mínima do fármaco capaz de gerar 50% de inibição do crescimento
HO	Hoechst
IC <sub>50</sub>	Concentração mínima do fármaco capaz de produzir citotoxicidade de 50% da cultura celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
IV	Infravermelho
K <sub>b</sub>	Constante de ligação
K <sub>SV</sub>	Constante de Stern Volmer
LaSOM	Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal
MFA	Microscopia de força atômica
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
Vis	Visível
μM	Micromolar

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Naftoquinonas.....	15
1.2 Câncer: Generalidades, estatísticas, tipos e opções terapêuticas.....	17
1.2.1 DNA: Estrutura, características e funções.....	22
1.2.2 Fotoprotetores.....	25
1.2.3 Importância do estudo de interação DNA-ligante.....	26
1.2.4 Modo de ligação DNA-ligante.....	27
1.3 Técnicas empregadas para o estudo da interação DNA-ligante, FPS-UVB <i>in vitro</i> e a atividade antioxidante.....	29
1.3.1 Espectroscopia no UV-Visível.....	30
1.3.2 Espectroscopia de fluorescência molecular.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos.....	33
4. EXPERIMENTAL.....	34
4.1 Reagentes e Soluções.....	34
4.2 Equipamentos utilizados.....	35
4.3 Procedimento experimental.....	36
4.3.1 Fator de Proteção Solar UVB <i>in vitro</i> .....	36
4.3.2 Sequestro do radical DPPH•.....	36
4.3.3. Ensaio do sequestro do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	37
4.3.4 Determinação das propriedades ADME <i>in silico</i> .....	37
4.3.5 Determinação da atividade antiproliferativa dos compostos.....	38
4.3.6 Determinação da concentração do <i>ctDNA</i> ( <i>Calf thymus</i> ).....	38
4.3.7 Avaliação da interação <i>ctDNA</i> -ligante por fluorescência molecular e UV-Vis.....	38
4.3.8 Estudo de competição com Brometo de etídio (BE) e Hoechst (HO).....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
5.1 Avaliação do FPS-UVB.....	42
5.2 Atividade antioxidante.....	49
5.2.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila (DPPH•).....	49
5.2.2 Sequestro do Radical 2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS <sup>•+</sup> ).....	53

5.3 Propriedades ADME <i>in silico</i> .....	55
5.4 Toxicidade dos compostos avaliados .....	61
5.5 Atividade Antiproliferativa .....	61
5.6.1 Avaliação da interação <i>ct</i> DNA-naftoquinonas por fluorescência molecular .....	64
5.6.3 Estudos por UV-Vis (Mecanismo de <i>Quenching</i> ).....	72
6. CONCLUSÃO.....	75
7. PERSPECTIVAS .....	76
8. REFERÊNCIAS .....	77
9. ANEXOS.....	88

## 1. INTRODUÇÃO

Diversas moléculas orgânicas com propriedades bioativas são isoladas de fontes naturais e utilizadas para fins medicinais. Neste contexto, destaca-se a classe de compostos naturais das quinonas que, são agentes terapêuticos e também tem sido utilizada como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas, com intuito de potencializar suas atividades biológicas por meio de modificações estruturais (RAMOS-PERALTA, 2015; THOMSON, 1997).

Dentre as quinonas, as naftoquinonas são consideradas estruturas privilegiadas na química medicinal, pois possuem características químicas que dependem tanto de suas propriedades ácido-base, bem como redox, o que leva à atividades biológicas diversificadas (KAMO; KURAMOCHI; TSUBAKI, 2018). As naftoquinonas são descritas na literatura por suas propriedades anticancerígenas (MALLAVADHAN, et al. 2014; HONG, et al. 2015; ARAÚJO; ALENCAR; NETO, 2002; MORAES, et al., 2014; ESPINOSA-BUSTOS, et al. 2018), antioxidante (GOUDA, et al., 2013), antiparasitária (toxoplasmose), leishmanicida, antiviral (AIDS) (TANDON, et al 2006; JORDÃO et al., 2015) e, recentemente, por sua ação fotoprotetora (ARAÚJO, et al., 2014) entre outras.

Sendo assim, diante das atividades biológicas dos derivados da classe de compostos naturais das naftoquinonas, no presente trabalho avaliou-se, o fator de proteção solar ultravioleta B (FPS-UVB) *in vitro*, a atividade antioxidante, a atividade antiproliferativa, bem como o processo de interação com DNA (*Calf thymus*, *ctDNA*) de alguns derivados naftoquinônicos. Os compostos foram obtidos em colaboração com o grupo de pesquisa LaSOM, da UFAL *Campus* Arapiraca e os estudos foram realizados por espectroscopia UV-visível e fluorescência molecular.

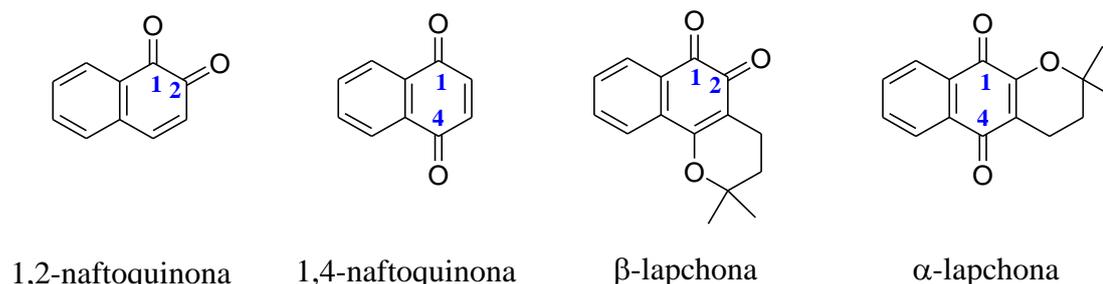
### 1.1. Naftoquinonas

As naftoquinonas são quinonas que apresentam um sistema  $\alpha,\beta$ -dienonas cíclicas conjugadas ligadas a um anel aromático (sistema naftalênico) (**Figura 1**). São geralmente encontradas em várias famílias de plantas, em fungos, algas e bactérias.

As naftoquinonas podem ser encontradas como constituinte das plantas da família *Boraginaceae*, *Plumbaginaceae*, *Vertenaceae* e *Proteaceae*, porém, é na família *Bignoniaceae* gênero da *Tabebuia Avellanadae* que sua ocorrência é maior (SUÁREZ-

ROZAS, et al. 2019; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Com base na sua estrutura molecular, as naftoquinonas podem ter diferentes arranjos em seu anel quinônico (isomeria de posição) influenciando suas propriedades químicas, físicas e atividades biológicas dos isômeros. Quando as duas carbonilas estão nas posições 1,2 do anel naftaleno, o isômero resultante é a 1,2-naftoquinona ou *o*-naftoquinona, de modo semelhante temos a 1,4-naftoquinona ou *p*-naftoquinona (LITIVACK JÚNIOR, 2009, p. 19). Um exemplo típico de como a isomeria tem influência sobre as propriedades das naftoquinonas é a  $\beta$ -lapachona, uma *o*-naftoquinona que apresenta diferentes propriedades físicas e características farmacológicas superiores contra o *Trypanosoma cruzi* quando comparado com o seu isômero  $\alpha$ -lapachona (MENNA-BARRETO et al., 2005; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003) (**Figura 1**). Além disso, atualmente a  $\beta$ -lapachona se encontra em estudos clínicos de fase II nos Estados Unidos para o tratamento de tumores sólidos avançados (SUÁREZ-ROZAS, et al. 2019; ZHANG, et al. 2017).

**Figura 1.** Naftoquinonas básicas e alguns isômeros dessa classe.



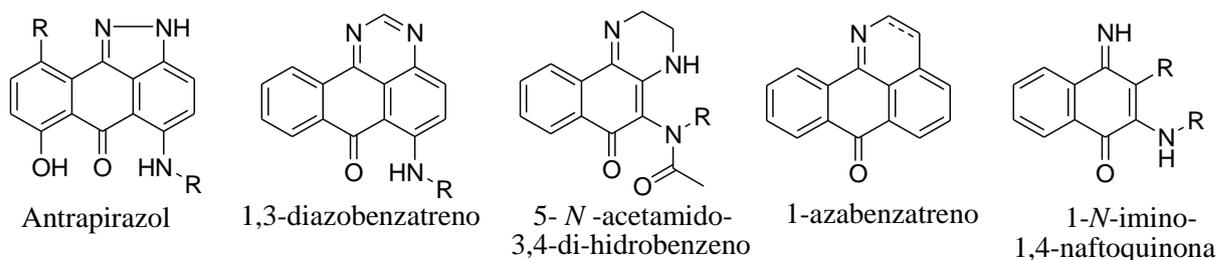
**Fonte:** Autor, 2019.

Os derivados da 1,4-naftoquinona têm sido amplamente reportados em relação às suas propriedades biológicas e, particularmente, às suas atividades antiproliferativa frente a linhagens celulares tumorais, a saber: adenocarcinoma gástrico (AGS), pulmão (SK-MES1), bexiga (J82) e leucemia (HL-60), entre outras (SUÁREZ-ROZAS, et al. 2019; GACH, et al. 2016). Além disso, vários mecanismos de ação têm sido reportados para essa classe de compostos, incluindo aqueles que envolvem a interação dessas substâncias com topoisomerasas, bem como sua capacidade de gerar ânions radicais semiquinona e espécies reativas de oxigênio (ROS), além de sua interação com DNA (NEVES, et al. 2013; SACAU et al., 2003; WELLINGTON, 2015).

Mesmo possuindo uma vasta gama de atividades biológicas, infelizmente, o uso de quinonas é limitado devido a sua alta cardiotoxicidade, baixa seletividade ao alvo e o

desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos pelas células tumorais (SUÁREZ-ROZAS, et al. 2019). Porém, diversas estratégias têm sido estudadas para minimizar esses efeitos secundários, como por exemplo, a incorporação de um heterociclo adicional de cinco ou seis membros fundido ao farmacóforo, a presença de grupos amino e *N*-acetamido, entre outras. Essas e outras modificações aumentam sua atividade citotóxica e reduzem sua cardiotoxicidade (ANTONINI, et al., 1995; SUÁREZ-ROZAS, et al. 2019). Exemplos disto são os iminoderivados antrapirazol (1,3-diazabenzantrona), 1-azabenzantrona e 1-aza-2,3-dihidrobenzantrona (CASTRO-CASTILLO et al., 2013; SUÁREZ-ROZAS, et al. 2019) descritos na **Figura 2**.

**Figura 2.** Estruturas de alguns iminos, aminos e acetaminos derivados da antraquinona e naftoquinona.



**Fonte:** Adaptado de Suáres-Rozas, et al., 2019.

Neste sentido, essa classe de compostos tem sido alvo de vários estudos farmacológicos para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos, como o intuito de desenvolver drogas mais eficazes, com menos efeitos colaterais.

## 1.2 Câncer: Generalidades, estatísticas, tipos e opções terapêuticas

O câncer é um conjunto de doenças que tem por característica o crescimento descontrolado e proliferação de células em um órgão ou tecido, invasão ou disseminação em partes resultante do corpo. Atualmente há quase 200 tipos de cânceres que correspondem aos vários sistemas de célula do corpo, os quais podem ser distinguidos pelo modo de proliferação nos tecidos e órgãos (ALMEIDA, et al., 2005).

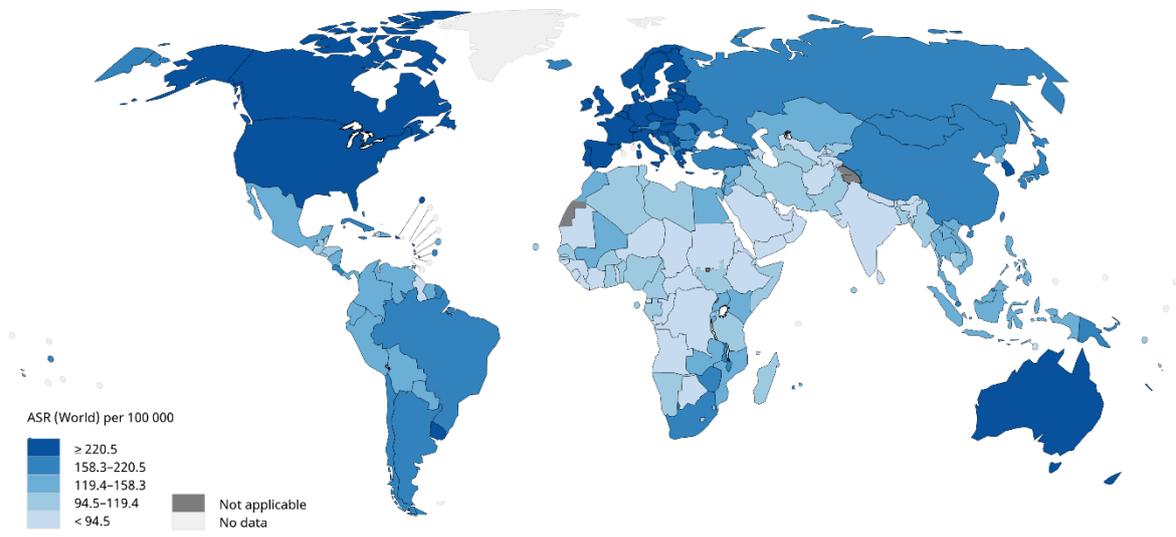
Estima-se que aproximadamente 9,6 milhões de mortes foram globalmente computadas em 2018 tendo o câncer como agente, sendo esta a segunda principal causa de morte no mundo. As estimativas mostram que para 2010 foram gastos aproximadamente US \$ 1,16 trilhão para o tratamento dessas neoplasias (OMS, 2018). A organização mundial da

saúde, prevê-se que em 2040, 29,5 milhões de novos casos de câncer serão identificados em todo o mundo e 16,4 milhões de pessoas morrerão dessa doença.

Os riscos de câncer estão associados a fatores ambientais e genéticos. Os fatores ambientais englobam o meio geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (quando insalubre), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos) (ALMEIDA, et al., 2005). As alterações provocadas no ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer. A organização mundial de saúde (2007) estima que os fatores de riscos mais comuns são: i) tabagismo; ii) uso de álcool; iii) alimentação; iv) inatividade física; v) sobrepeso e obesidade; vi) radiação UV; vii) exposição a produtos químicos e viii) infecções. Esses fatores são ainda agravados devido a causa de múltiplos carcinomas, como é o caso do tabagismo, que dentre outros, pode causar o câncer de pulmão, esôfago, laringe, boca, garganta, rim, bexiga, pâncreas, estômago e colo do útero.

A estimativa mundial mostra que, em 2018, ocorreram 18,08 milhões de casos de câncer. Houve um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (52,3%) quanto na mortalidade (56,4%). De um modo geral, as maiores taxas foram observadas para a América do Norte, Europa Ocidental, Sul da Europa, Europa Central e Oriental, além de Austrália e Nova Zelândia. As menores taxas são vistas em grande parte da África ocidental e no Sul e Oeste da Ásia (OMS, 2018) **Figura 3**. Já nos países desenvolvidos, predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto), nos países de baixo e médio desenvolvimentos, ainda é alta a ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado) (INCA, 2018).

**Figura 3.** Estimativas mundial para a taxa de incidência de cânceres, em ambos os sexos entre idade de 0-74 anos para 2018.

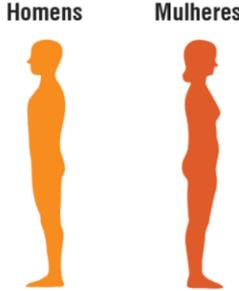


**Fonte:** OMS, 2018.

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (2,09 milhões), mama (2,08 milhões), colo retal (1,85 milhões), próstata (1,27 milhões), estômago (1,03 milhões), fígado (842 mil) e esôfago (527 mil). Nas mulheres, os mais frequentes foram mama (24,2%), colo retal (9,5%), pulmão (8,4%), colo do útero (6,6%) e tireoide (5,1%). Já nos homens, as maiores incidências foram pulmão (14,5%), próstata (15,5%), colo retal (10,9%), estômago (7,2%), fígado (6,3%) e bexiga (4,5%) (OMS, 2018).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estima-se para o biênio 2018-2019, no Brasil, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Tendo o câncer de pele não melanoma cerca de 170 mil novos casos e previsão de 420 mil casos novos de câncer (INCA, 2018). Um cálculo global corrigido para o sub-registro, aponta a ocorrência de 640 mil novos casos. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2018). Na **Tabela 1** está sumarizado a distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil que foram estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2018).

**Tabela 1.** Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68,220	31,7			Mama	59,700	29,5
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18,740	8,7		Colo retal	18,980	9,4	
Colo retal	12,974	8,1		Colo de útero	16,370	8,1	
Estômago	13,540	6,3		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12,530	6,2	
Cavidade Oral	11,200	5,2		Tireoide	8,040	4,0	
Esôfago	8,240	3,8		Estômago	7,750	3,8	
Bexiga	6,690	3,1		Corpo de útero	6,600	3,3	
Laringe	6,390	3,0		Ovário	6,150	3,0	
Leucemia	5,940	2,8		Sistema nervoso central	5,510	2,7	
Sistema nervoso central	5,810	2,7		Leucemia	4860	2,4	
Melanoma	2,920	1,3		Melanoma	3,340	1,6	

**Fonte:** Adaptado de INCA, 2018.

Como é perceptível nos dados acima, o câncer é um problema de saúde universal, que possui alta morbidade e mortalidade. De acordo com a OMS entre 30-50% das mortes por câncer poderiam ser evitadas modificando ou evitando os principais fatores de risco, incluindo evitar os produtos do tabaco, reduzir o consumo de álcool, manter um peso saudável, fazer exercícios regularmente e abordar os fatores de risco relacionados à infecção. A prevenção oferece a estratégia de longo prazo com melhor relação custo-benefício para o controle do câncer, no caso do câncer de pele, bem como outros problemas associados a exposição excessiva a radiação UV. Para evitar o câncer de pele a recomendação pelos órgãos competentes é a utilização de filtro solares pelos (INCA, 2018; NASCIMENTO, et. al, 2018). No que se refere ao tratamento, os principais tipos de tratamento do câncer utilizados atualmente, são a cirurgia, a radioterapia e quimioterapia, sendo a cirurgia, para alguns tipos de câncer, o tratamento inicial (DUVAL, et al., 2010; ALMEIDA, et al. 2005).

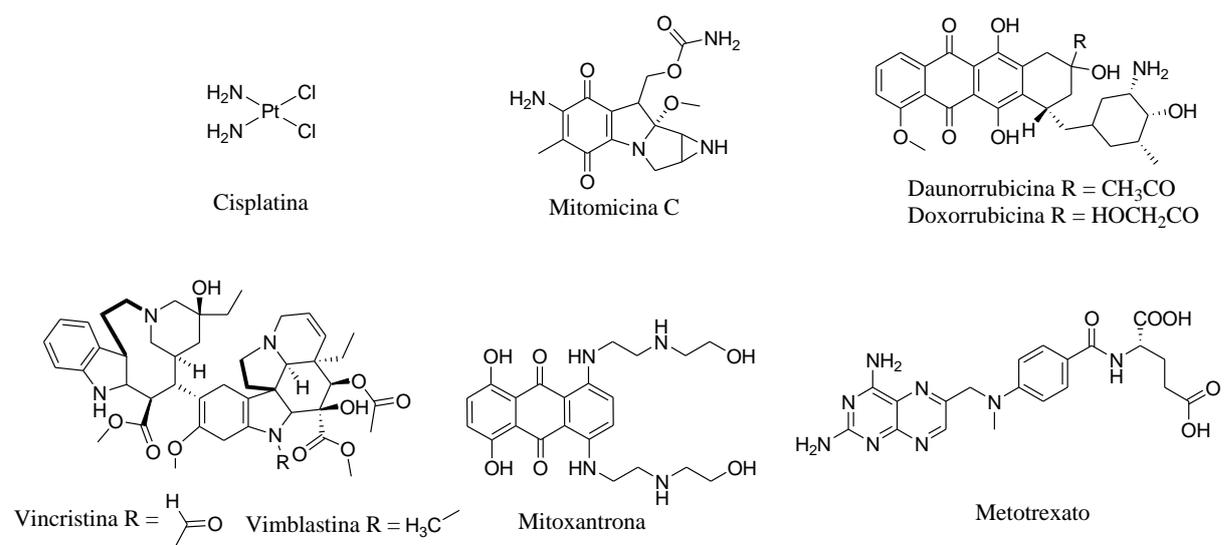
A cirurgia e a radioterapia são procedimentos experimentais e adequados para tratamento da doença localizada e regional, e pode curar nos estágios precoces do câncer. Por outro lado, a quimioterapia representa uma das formas de tratamento contra o câncer de maior escolha visando controle, palição e em algumas situações até mesmo a cura (SAWADA, et al., 2009).

A quimioterapia é um tratamento sistêmico, o que significa que as drogas anticâncer circulam através do sangue até atingir às células cancerosas. O objetivo da quimioterapia é aniquilar colônias de células cancerosas e em processos de metástase no corpo do paciente. Entretanto, por não ser um método seletivo, as células normais também acabam sendo

danificadas ocasionando os efeitos colaterais da quimioterapia que são anemia, diarreia, náuseas, vômitos, perda de cabelo e enfraquecimento do sistema imunológico (ALMEIDA, 2005; INCA, 2018). Um fator importante para a eficácia da quimioterapia é a precocidade no diagnóstico do tumor, sendo um tratamento eficiente quando há entre 10-12 células tumorais, ou seja, quando o tumor se encontra com tamanho inferior a 1 cm (ALMEIDA, et al. 2005; JAGER; JAGER; KNUTH, 2002). A resistência a drogas quimioterápicas também pode ser desenvolvida por células cancerígenas, sendo assim, devido às várias limitações das terapias convencionais como o mau prognóstico e os sérios efeitos colaterais das terapias anticâncer (WANG, et al., 2012), é notório a necessidade de pesquisas na descoberta de ações abrangentes para o controle do câncer, com maior eficácia e menos efeitos colaterais. É nesse contexto que o desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos a partir de produtos naturais e sintéticos vem sendo considerado uma das principais metas dos estudos em química medicinal (FAN, et al., 2012; CHEN; XUE, 2019).

Atualmente, os agentes antineoplásicos mais utilizados como quimioterápicos no tratamento do câncer incluem compostos alquilantes, como a cisplatina e a mitomicina C, antimetabólitos como a metotrexato, alguns produtos naturais como os alcaloides vegetais como: vimblastina e vincristina, antibióticos antitumorais como as antraciclina que são derivados de quinonas (ex.: doxorubicina; daunorrubicina) (**Figura 4**), entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; ALMEIDA, et al., 2005; OLIVEIRA; ALVES, 2002).

**Figura 4.** Estrutura de alguns agentes antineoplásicos utilizados atualmente.



**Fonte:** Adaptado de Almeida, et al., 2005.

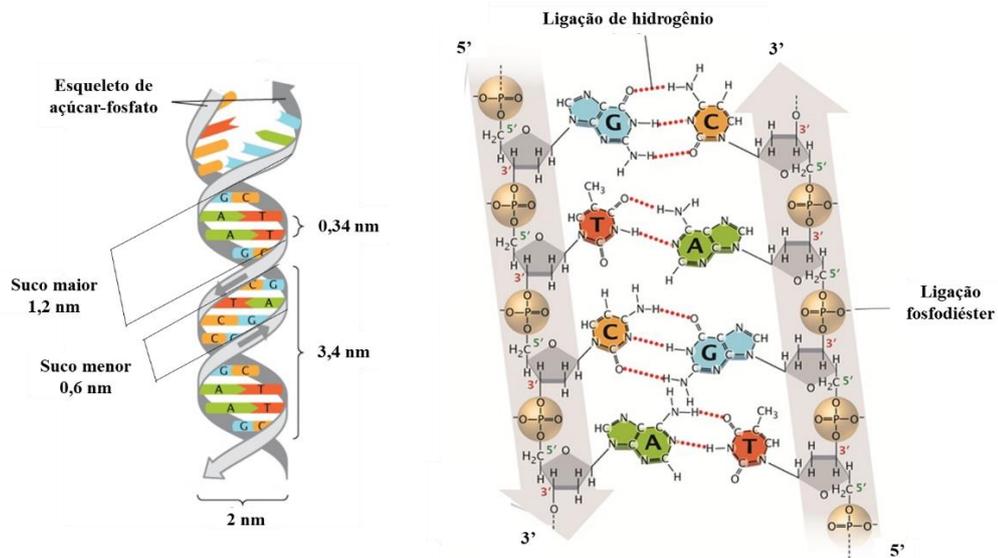
Mediante a todos os dados estatísticos, as diversas complicações desencadeadas pelo câncer, bem como aos processos de prevenção e tratamento desta doença citados acima é notório que os tratamentos dessa neoplasia são responsáveis por uma grande fatia de todos os orçamentos nacionais para a saúde. Além disso, as terapias disponíveis são, invasivas e onerosas ao sistema único de saúde (SUS). Desse modo, é de interesse a exploração de novas substâncias sintéticas inspiradas em produtos naturais, que possam resultar em produtos alternativos e de menor custo em relação às terapias disponíveis para a prevenção e tratamento de carcinomas que tenham o DNA como alvo biológico.

### 1.2.1 DNA: Estrutura, características e funções

O ácido desoxirribonucleico (DNA), é um polímero orgânico, fino e longo. Essa biomolécula teve sua estrutura tridimensional inicialmente descrita em 1953 pelos cientistas James D. Watson e Francis Crick, o qual foi apresentado como sendo formado por unidades monoméricas de nucleotídeos, e cada nucleotídeo tem três componentes: grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), responsáveis por deixarem o DNA carregado negativamente; um grupo de açúcar desoxirribose e as bases nitrogenadas.

Normalmente, a unidade básica do DNA citado acima, consiste em duas fitas poliméricas, que se entrelaçam em um mesmo eixo formando a dupla-hélice. A estrutura hidrofílica dos grupos alternantes de desoxirribose e fosfatos se encontram na parte externa da dupla fita interagindo com a água circundante (**Figura 5**); e no interior da dupla hélice as bases purínicas e pirimidínicas de ambas as fitas estão empilhadas (NELSON; COX, 2014; PRAY, 2008). Como mencionado anteriormente, cada fita é composta por uma combinação de nucleotídeos, quatro para ser mais exato, ligados a desoxirribose, que se mantém unidos por ligação fosfodiéster, sendo as bases: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Sendo que as bases nitrogenadas seguem a regra de Chargaff, no qual a adenina (A) de uma fita sempre forma duas ligações de hidrogênio com a timina (T) da outra, enquanto a guanina (G) forma três ligações de hidrogênio com a citosina (C) da fita complementar (NELSON; COX, 2014; NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008) (**Figura 5**).

**Figura 5.** Estrutura dupla hélice do DNA e emparelhamento de bases.

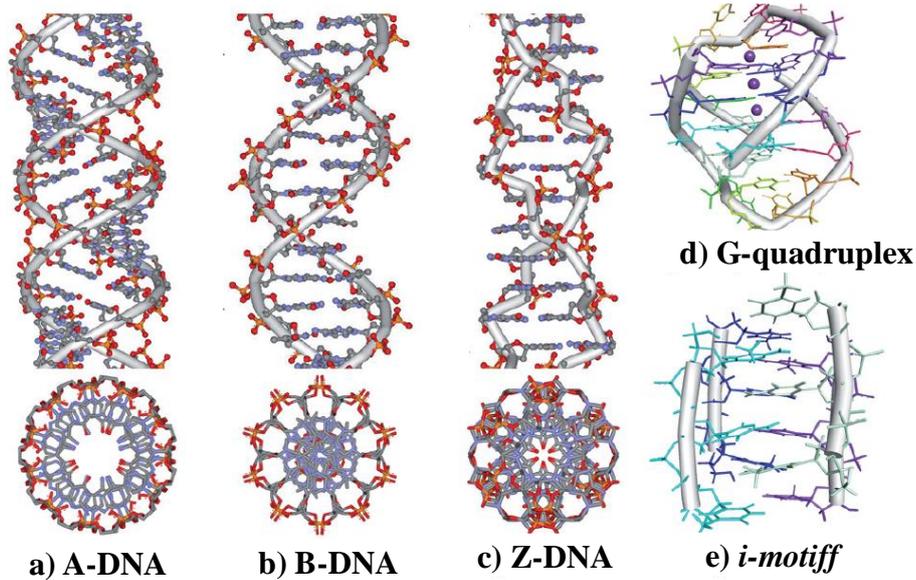


**Fonte:** Adaptado de PRAY, 2008.

O DNA duplex é antiparalelo, onde a extremidade 5' (grupo fosfato) de uma fita está emparelhada com a extremidade 3' (grupo hidroxila) de sua fita complementar (**Figura 5**), e vice-versa.

Apesar de o modelo da dupla hélice, formalizado por Watson e Crick, ser o mais conhecido, há outros formatos de DNA (isoformas), as quais são dependentes do meio onde se encontram, podendo assumir três conformações: A-DNA, B-DNA e Z-DNA (NELSON; COX, 2014). Além disso, o DNA também pode adotar outras formas, como a cruciforme ou tetraplex (G-quadruplex e *i-motiff*), tendo a conformação *i-motiff* sua estrutura confirmada em publicação recente da revista *nature* (ZERAAT, et al. 2018) (**Figura 6**).

**Figura 6.** Conformações do DNA: A, B, Z, G-quadruplex e *i-motiff*.



**Fonte:** Adaptado de García-Ramos, et al., 2013.

A conformação mais comum em meio fisiológico e também a mais estável é a B-DNA, a mesma proposta por Watson e Crick. Neste sentido, essa estrutura é a mais usada como padrão de referência para estudos de propriedades do DNA, além de ser a forma mais encontrada no organismo. Por outro lado, as demais isoformas requerem condições mais específicas: a isoforma A-DNA é formada em condições com baixa concentração de água, enquanto que a Z-DNA é favorecida em condições com alta concentração de sal e requer um tipo especial de sequências de bases. Quanto à rotação das hélices, diferente das duas primeiras isoformas, a Z-DNA gira para a esquerda (NELSON; COX, 2014; ALMEIDA, et al., 2005). O DNA G-quadruplex, geralmente, é formado em regiões de oncogênese (GARCÍA-RAMOS, et al., 2013). Já a isoforma *i-motiff* requer condições levemente ácidas ou neutras para se estabilizarem (ZERAAT, et al. 2018; GARCÍA-RAMOS, et al., 2013).

Quando se refere a papéis biológicos dessa macromolécula, o DNA desempenha importantes papéis fisiológicos no processo da vida, pois carrega importantes informações genéticas e orienta a síntese biológica de proteínas e enzimas por meio de duplicação, transporte e tradução da informação genética (NELSON; COX, 2014; SHAMSI; YADAV; ARJMAND, 2014; SHI, et al. 2015). Neste sentido, como é amplamente relatado na literatura danos no DNA podem levar ao desenvolvimento de câncer, portanto, a busca por pequenas moléculas orgânicas naturais ou sintéticas que possam interferir no processo de prevenção a esses danos, tais como fotoprotetores ou antioxidantes ou ainda compostos que possam se ligar ao DNA por meio de interações covalentes ou não covalentes que resultem em alteração

ou inibição da função do DNA (antitumorais) (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; STREKOWSKI; WILSON, 2007) são de grande relevância e poderão trazer contribuições para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento do câncer no futuro.

### 1.2.2 Fotoprotetores

Dentre os fatores exógenos que podem iniciar ou contribuir para alterações na homeostasia celular, destaca-se a exposição à radiação solar, por seus efeitos cumulativos (GUARATINI, et al. 2009). A exposição à radiação ultravioleta (UV) está diretamente ligada ao surgimento de problemas na pele sendo que o comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação solar determina o poder de penetração desta no tecido. Neste sentido, a partir da exposição acumulativa na pele dos raios solares, sem proteção, podem surgir manchas, despigmentações cutâneas, queimaduras, envelhecimento precoce e fotossensibilidade sendo que nos casos mais graves há o surgimento de neoplasias malignas cutâneas, conhecidas como câncer de pele (NASCIMENTO, et al., 2014).

A ocorrência de eritemas e até mesmo do câncer de pele está associada à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são formadas pela ação da radiação UV no organismo e podem acarretar a ruptura da cadeia do DNA (ácido desoxirribonucleico). Especificamente, quando o DNA absorve a radiação UV, principalmente a UVB, podem ocorrer processos mutagênicos. Assim, a ação dos raios UVB no DNA leva a divisão celular acelerada produzindo novas células tumorais (NASCIMENTO, et al., 2014; IVRY, et al., 2006). Neste contexto, o controle da formação das ROS pela radiação UV é de suma importância para a prevenção dos efeitos deletérios da exposição solar, principalmente a prevenção do câncer de pele, o qual é um dos mais frequentes na população brasileira e que mais cresce em número de casos no mundo todo (GUARATINI, et al. 2009).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) e a Sociedade Brasileira de Dermatologia, a prevenção do câncer de pele se dá por meio do uso frequente de agentes fotoprotetores ou filtros solares. Os filtros solares consistem em preparações cosméticas que contém agentes fotoprotetores e estes atuam minimizando os efeitos deletérios dos raios UV através da absorção, reflexão ou difusão dos raios solares incidentes na pele. Os fotoprotetores podem ser substâncias inorgânicas ou orgânicas. Em geral, os compostos inorgânicos agem via reflexão dos raios UV e os orgânicos por meio da absorção destes. Os principais fotoprotetores inorgânicos são ZnO e TiO<sub>2</sub>, porém, filtros contendo essas substâncias podem deixar uma película branca sobre a pele o que os torna esteticamente desfavorável em altas

concentrações. Os fotoprotetores orgânicos são classificados de acordo com sua região de absorção dos raios UV. Isso ocorre porque esses compostos não possuem um amplo espectro de proteção UV e atuam especificamente apenas em uma das faixas UVA I (340-400nm), UVA II (320-340nm) e UVB (290-320nm) (GUARATINI, et al. 2009).

Dentre as normas que regulam a utilização de protetores solares, destaca-se a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 30 de 1° de janeiro de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que tem por objetivo estabelecer o regulamento técnico Mercosul sobre protetores solares em cosméticos e dá outras providências, a qual institui que os protetores solares devem ter como requisito um fator de proteção solar (FPS) de no mínimo 6 (ANVISA, 2012) . Já a Food and Drug Administration (FDA), agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos Estados Unidos, regulamentou um FPS de no mínimo 15 para um composto ser utilizado em loções cosméticas (FDA, 2017).

Sendo assim, por atuarem de maneira preventiva no tecido cutâneo, os fotoprotetores agem minimizando a exposição excessiva aos raios UV, que favorecem a formação de ROS que são alguns dos fatores que acarretam na ruptura da cadeia do DNA e posteriormente em processos cancerígenos.

### **1.2.3 Importância do estudo de interação DNA-ligante**

O DNA desempenha um papel importante na proliferação celular, em mutações genéticas e no reparo do mecanismo de desordem. As alterações irreversíveis e danos a essa macromolécula resultam em câncer, assim, o DNA é o principal alvo intracelular no desenvolvimento de agentes terapêuticos anticâncer (ALI; BHATTACHARYA, 2014; BAS, et al., 2019). Neste sentido, os estudos de interação DNA-ligante são de extrema importância para a compreensão dos mecanismos de interações e, também para o provimento de informações que venham a contribuir para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, controle da expressão gênica e no planejamento de novos fármacos para esta finalidade ou antitumorais (QAIS, et al. 2017; KHAJEH, et al. 2018).

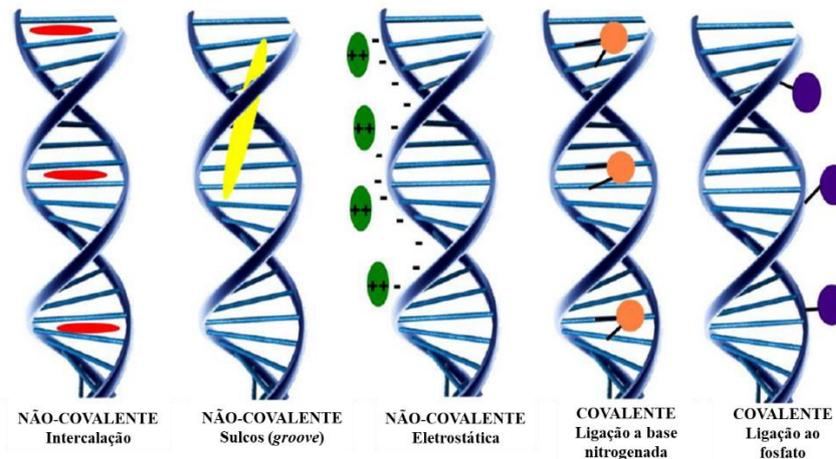
Pequenas moléculas podem se ligar ao DNA a partir de diferentes interações, resultando em alteração ou inibição da função dessa macromolécula. Neste contexto, as pesquisas sobre a interação de ligação entre DNA e pequenas moléculas têm sido consideradas como um dos tópicos-chave no campo das ciências da vida, química e medicina, representando um estudo significativo para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer (SHI, et al. 2015). Assim, a investigação sobre a interação de ligação do DNA com

pequenas moléculas é útil para entender as características estruturais do DNA, origem de algumas doenças e mecanismos de ação de algumas drogas que visem o DNA celular a fim de obter alta seletividade, fortes efeitos, baixa toxicidade e menos efeitos colaterais. Além disso, esses dados também podem ajudar a prever o efeito de drogas combinadas e fornecer orientação para o desenvolvimento e aplicação clínica de medicamentos. (DING, et al. 2018; SHI, et al. 2015). Vale ressaltar que pequenas moléculas, como as drogas antitumorais, interagem com o DNA principalmente por meio de três modos de ligação diferentes: intercalação, ligação ao sulco e interações iônicas e estas serão descritas a seguir.

#### 1.2.4 Modo de ligação DNA-ligante

A interação DNA-ligante pode seguir três formas distintas (BARONE, et al. 2013). No primeiro modo, os fármacos podem interagir com proteínas de ligação do DNA, como polimerases e fatores de transcrição. A segunda maneira implica a ligação do RNA às hélices duplas do DNA para formar híbridos tripla-hélice de RNA-DNA que podem interferir na atividade de transcrição (AUSUBEL, et al. 2002; BARONE, et al. 2013). O último modo, o qual será explorado neste estudo, consiste na interação do DNA com pequenas moléculas (BARRA; NETTO, 2015; LERMAN, 1961), denominadas drogas. A maioria das drogas anticâncer usadas exerce seu efeito antitumoral danificando o processo de replicação do DNA. Esse dano ocorre por dois modos de ligação: 1) pelo modo de ligação covalente, o qual ocorre por meio da ligação direta ligante-DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato; e 2) não covalente, o qual ocorre por meio de interações eletrostáticas, interações nos sulcos (*groove*) do DNA, ou por meio da intercalação (BARRA; NETTO, 2015; KOMEDA, et al. 2006) como pode ser visto na **Figura 7** abaixo.

**Figura 7.** Representação esquemática de possíveis modos de interação DNA-ligante.



**Fonte:** Adaptado de Barros;Netto, 2015.

As interações que envolvem as ligações covalentes possuem alta energia, deste modo, são difíceis de serem rompidas e, dessa forma, os complexos fármaco-receptor são raramente desfeitos, ou seja, é um modo de ligação irreversível que forma espécies que impedem a replicação celular (BARONE, et al. 2013). Esse modo de ligação normalmente envolve ligantes de caráter eletrofílico e bionucleófilos orgânicos. No DNA, o ligante pode interagir com as bases nitrogenadas ou grupos fosfatos, como visto na **Figura 7** (BARREIRO; FRAGA, 2015), como por exemplo, a cisplatina, a qual é um potente agente anticancerígeno que se liga covalentemente aos pares de base adenina e guanina do DNA, resultando na inibição da transcrição e replicação do mesmo, além de induzir à morte celular (BARONE, et al. 2013; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

O modo de ligação não covalente é reversível, e a espécie ou molécula alvo ao interagir com o DNA pode alterar a conformação, provocar tensão torsional e interromper/inibir o processo de interação DNA-proteína nos processos biológicos (SILVESTRI; BRODBELT, 2012; STREKOWSKI; WILSON, 2007). Como mencionado anteriormente, há três formas de ligações não covalentes entre o DNA e ligantes e estas serão descritas a seguir.

A intercalação consiste na inserção do composto ligante entre os pares de bases vizinhos do DNA ligando-se perpendicularmente ao eixo da hélice (MARKY, et al., 1983). Este processo envolve a distorção da conformação da cadeia do DNA e, portanto, a interferência da interação proteína-DNA (GARCÍA, et al., 2009; STREKOWSKI; WILSON, 2007). As forças intermoleculares que mantém a estabilidade do complexo DNA-agente intercalador, leva esta entidade a possuir maior estabilidade que o DNA sozinho. Estas forças são associadas à formação de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas,

interações de empilhamento  $\pi$  (interação  $\pi$  *stack*) entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e as estruturas aromáticas (BARONE, et al., 2013).

A interação nos sulcos também conhecida *groove*, consiste na interação direta do ligante com as bases nitrogenadas, tanto pelo sulco maior quanto pelo sulco menor (**Figura 7**). O sulco menor resulta da depressão entre as duas cadeias complementares e possui um sítio de ligação menor de 0,6 nm. No entanto, os sulcos menores geralmente têm o benefício de serem livres e podem proporcionar espaço disponível para se ligarem a moléculas pequenas. Por outro lado, o sulco maior resulta da depressão existente entre os giros adjacentes da hélice, e devido ao seu tamanho (1,2 nm) oferece fácil acesso a ligantes volumosos (**Figura 5**) (KHAN, et al., 2012).

A interação eletrostática denominada de associação externa envolve a ação do DNA como um arcabouço que possibilita a interação externa droga-droga (GARCÍA, et al., 2010). Assim, pode-se observar que tanto a intercalação quanto a ligação nos sulcos (*groove*) estão relacionados com a parte mais interna da dupla hélice do DNA, enquanto a ligação eletrostática está associada com interação fora do sulco ou na superfície da molécula de DNA (parte externa). Esse modo de ligação ocorre entre as espécies catiônicas e os grupos fosfatos carregados negativamente presentes no DNA (REHMAN, et al., 2015).

### **1.3 Técnicas empregadas para o estudo da interação DNA-ligante, FPS-UVB *in vitro* e a atividade antioxidante**

Diversas técnicas podem ser utilizadas para o estudo do mecanismo de interação entre os ligantes e o DNA, entre elas podemos citar: UV-visível (REHMAN, et. al., 2015) fluorescência molecular (NI; WANG; KOKOT, 2011), ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia de força atômica (MFA), eletroquímica (ESPINOSA-BUSTOS, et al., 2018) calorimetria, infravermelho (IV), medidas de viscosidade, dicroísmo circular, espectrometria de massas, eletroforese (capilar e em gel) (RYVOLOVA, M. et al., 2012), espectroscopia Raman e difração de raios-X. Além disso, estudos teóricos como *docking* e dinâmica molecular têm sido utilizados para obter mais informações sobre o processo de interação. Essas técnicas e estratégias têm sido utilizadas como importantes ferramentas para caracterizar a natureza do complexo supramolecular formado DNA-ligante e os efeitos da interação sobre a estrutura do DNA (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

No caso da determinação do fator de Proteção Solar *in vitro*, esse será realizado pelo método descrito por Mansur que se utiliza da espectrofotometria de absorção na região do

UV-Vis. Esse método é bastante útil visto sua boa correlação dos dados gerados, com os dados obtidos por meio de estudos *in vivo*. Já para a atividade antioxidante, podem ser utilizadas distintas técnicas, a depender do método utilizado, sendo essas: UV-Vis, fluorescência molecular, métodos eletroquímicos, entre outros.

Vale destacar que, nesse estudo foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção no UV-Vis e fluorescência molecular. Essa avaliação possibilitou, caracterizar o modo de ligação dos compostos avaliados com o DNA, avaliar o mecanismo de *quenching*, determinar o FPS-UVB, bem como avaliar a capacidade antioxidante dos compostos. Assim, as técnicas comumente empregadas nos estudos aqui apresentados serão descritas abaixo, considerando os principais aspectos das informações que podem ser obtidas quanto a interação entre o DNA e os ligantes, FPS-UVB *in vitro* e atividade antioxidante.

### 1.3.1 Espectroscopia no UV-Visível

A espectroscopia de absorção no UV-Visível é uma das técnicas mais simples e amplamente utilizada na avaliação tanto da estabilidade do DNA quanto sua interação com ligantes (QAIS, et al., 2017; REHMAN, et al., 2015). No entanto, essa técnica não fornece informações precisas quando o ligante e a macromolécula absorvem radiação na mesma região. Como as medidas são baseadas na atenuação da radiação eletromagnética pela espécie absorvente, caso ligante, DNA e complexo formado, apresentem comprimentos de onda de máxima absorção próximos, uma espécie pode influenciar na obtenção do sinal analítico da outra, causando interferência espectral e imprecisão nas medidas realizadas. Neste sentido, a aplicação da técnica no UV-Vis para avaliação da interação de ligantes com DNA mostra variações mais acentuadas quando o ligante absorve preferencialmente no visível.

A espectrometria de absorção da radiação UV também pode ser utilizada para determinar a concentração molar do DNA, uma vez que essa macromolécula mostra uma banda característica na região do UV com comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) em 260 nm, relativo aos grupos cromóforos das purinas (adenina e guanina) e pirimidina (citosina e guanina), os quais são responsáveis pelas transições eletrônicas. Utilizando a lei de Beer, por meio da medição do valor de absorvância em 260 nm é possível avaliar a pureza do DNA, empregando-se a razão das absorvâncias  $A_{260}/A_{280}$  ou  $A_{260}/A_{230}$ , onde a proporção deve estar no intervalo 1,8-2,0 para assegurar DNA suficientemente livre de proteínas ou compostos usados no processo de purificação ou conservação (DENOVIK, 2018; SAVARIZ, et al., 2014).

Já para a avaliação do FPS-UVB *in vitro*, por se tratar de medidas quantitativas de absorção da radiação UVB (290-320 nm) por parte dos compostos avaliados (NASCIMENTO, et al., 2014), a técnica de UV-Vis torna-se a metodologia mais simples e eficaz para tal determinação, uma vez que esta técnica tem como princípio a absorção da radiação no ultravioleta (200-400 nm) e no visível (400-800 nm) (PAVIA, 2013), bem como, expressa uma correlação viável com os dados experimentais obtidos *in vivo*.

### 1.3.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma das técnicas mais comumente utilizadas nos estudos de interação entre ligantes e o DNA. As vantagens da fluorescência molecular comparada às demais técnicas espectroscópicas, são a sua alta sensibilidade, a grande faixa de concentração linear, seletividade, além de suas medidas serem relacionadas ao ligante livre, tratando-se de uma medida direta da espécie livre ou complexada, sem interferência espectral. Em geral, os ligantes que contêm grupos funcionais (poli)aromáticos possuem intensa fluorescência, em comparação com pequenas moléculas que possuam em sua estrutura radicais derivados de hidrocarbonetos alifáticos, carbonilas ou compostos altamente conjugados não aromáticos. Uma vez que o DNA não apresenta fluorescência, as mudanças no sinal de fluorescência são relacionadas ao ligante livre ou do complexo formado com o ácido nucleico (REHMAN, et al., 2015).

Assim, os estudos relacionados à variação da intensidade do sinal em função de titulações espectrofluorimétricas podem fornecer informações, como: o mecanismo de *quenching* (dinâmico, estático ou ambos), número de sítios de ligação (estequiometria), constantes de ligação ( $K_b$ ), parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ ), tipos de forças intermoleculares envolvidas no processo de interação e o modo de ligação preferencial (ZHAO, et al., 2014). Vale ressaltar que o mecanismo de *quenching* só é considerado quando ocorre redução da fluorescência, em muitos casos, a adição de DNA pode levar ao aumento do sinal.

## 2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os impactos provocados pelo câncer na saúde das pessoas e a importância desta doença na vida moderna, esse trabalho visa trazer contribuições em duas frentes distintas: 1) prevenção por meio dos estudos de fotoproteção FPS e ação antioxidante e 2) avaliação da atividade antiproliferativa e correlação dos valores da constante de ligação ( $K_b$ ) que expressam a interação com o DNA.

Considerando que o desenvolvimento de novos filtros solares irá contribuir com a prevenção do câncer de pele, a inibição de RS consegue minimizar vários tipos de mutações cancerígenas, inclusive o câncer de pele. Além disso, não há atualmente disponível no mercado nenhum fotoprotetor que tenha em sua estrutura a função 1,4-naftoquinona e, dado a sua importância econômica dentro do crescente mercado dos cosméticos, nos parece oportuno avaliar a atividade fotoprotetora dos derivados naftoquinônicos nitrogenados por meio da determinação *in vitro* do fator de proteção solar contra a radiação UVB (FPS-UVB), bem como sua atividade antioxidante, uma vez que a aplicação tópica de antioxidantes atenua os danos oxidativos induzidos pela radiação UV.

O outro viés que motiva esse trabalho, são os resultados de atividade antiproliferativa frente a diversas linhagens tumorais, apresentados por várias moléculas da classe das naftoquinonas. Como o processo de interação DNA-ligante fornece informações sobre o mecanismo em nível molecular, fica claro a necessidade de estudos utilizando estratégias/técnicas associadas à determinação de parâmetros quantitativos relacionados à interação DNA-ligante, visando selecionar candidatos a fármacos mais promissores. Além disso, ressalta-se o número reduzido de trabalho que estão disponíveis na literatura que realizam esses dois tipos de estudo explorando esta classe de compostos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar o FPS-UVB *in vitro*, a atividade antioxidante, a atividade antiproliferativa, o modo e parâmetros de ligação de derivados naftoquinônicos com *ctDNA* por meio de técnicas espectroscópicas.

#### 3.2 Específicos

- i) Avaliar a bioatividade de pequenas moléculas orgânicas derivadas da classe das naftoquinonas a partir do uso de técnicas espectroscópicas.
- ii) Otimizar as condições experimentais para estudo por espectrometria de UV-Vis dos compostos investigados no intuito de determinar a faixa ótima de análise de acordo com a lei de Beer;
- iii) Determinar o FPS-UVB *in vitro* dos derivados naftoquinônicos, bem como suas respectivas absorvidades molares;
- iv) Determinar os valores de IC<sub>50</sub> da atividade antioxidante e antiproliferativa *in vitro* dos compostos testados;
- v) Determinar as propriedades ADME *in silico* dos compostos avaliados;
- vi) Otimizar as condições experimentais para estudo por espectrofluorimetria e UV-Vis dos sistemas averiguados, com o desígnio de determinar constantes de ligação ( $K_b$ ), estequiometria;
- vii) Avaliar o modo de ligação dessas moléculas por ensaios já estabelecidos na literatura;
- viii) Monitorar as alterações nas bandas referentes às sondas que interagem *via groove* e intercalação para caracterizar o modo de ligação DNA-ligante;
- ix) Avaliar o modo de ligação de compostos padrão da literatura, para comparar se os resultados obtidos são coerentes e validar o método;

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados no trabalho possuem grau de pureza analítica, incluindo o *ctDNA* (*Calf thymus*, *ctDNA*) tipo I na forma de fibras.

Os compostos de **1** a **8** foram cedidos pelo Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal (LaSOM) da Universidade Federal de Alagoas-*Campus* Arapiraca. Os compostos foram obtidos por extração ou síntese a partir de procedimentos experimentais descritos na literatura (CARDOSO, et al., 2018).

As soluções estoque dos derivados naftoquinônicos foram preparadas pela solubilização de 1,0 mg do composto em 2,0 mL de dimetilsulfóxido-DMSO (Sigma Aldrich, Brasil) e, posteriormente armazenadas sob refrigeração a 4°C em tubos criogênicos (SILVA, 2016).

A solução tampão (Tris 50 mM, NaCl 100 mM e pH = 7,4) foi preparada pela pesagem de 1,5 g de tris-(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Sigma Aldrich, Brasil) e 1,5 g de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec, Brasil) e solubilizado em 250 mL de água ultrapura. O ajuste do potencial hidrogeniônico (pH) para 7,4 foi realizado com uma solução diluída de ácido clorídrico (HCl) (Merck, Alemanha).

A solução estoque de *ctDNA* (*Calf thymus*) foi preparada pesando-se 10 mg da macromolécula e solubilizando-se a mesma em 20 mL de solução tampão Tris (50 mM, pH= 7,4) e NaCl (100 mM). A solução foi armazenada em frascos, recoberta com papel alumínio e deixada sob agitação durante 24 h. Posteriormente, para garantir uma maior solubilidade e homogeneidade da solução, a mesma foi levada a um banho ultrassom (Quimis modelo Q335D, Brasil), por 20 min, e logo em seguida ao uso guardada sob refrigeração a 4 °C.

Para o preparo da solução estoque de brometo de etídio ( $2,54 \times 10^{-3}$  M) pesou-se 10 mg do Brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio (Brometo de etídio) (Sigma Aldrich) e solubilizou-se em 10,0 mL de água ultrapura. O estoque 1 do 2'-(4-etoxifenil)-6-(4-metil-1-piperazinil)-1 H,3'H -2,5'-bibenzimidazol (Hoechst) (Sigma Aldrich) foi preparado pesando-se 10 mg e solubilizando-se em 10 mL água ultrapura ( $1,78 \times 10^{-3}$  M).

As soluções estoque dos padrões 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BZF-3) (Sigma Aldrich) e isonicotinoila hidrazida (INH) (Sigma Aldrich) foram preparadas utilizando-se 1 mg do composto, em seguida, esse foi solubilizado em DMSO (Sigma Aldrich) e, posteriormente realizando diluições em etanol P.A. (Dinâmica).

Para o preparo da solução do radical DPPH (2,2-difenil-2-picrilidrazila) (Sigma) foi pesado 0,012 g e solubilizado em metanol (Dinâmica). A solução estoque ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) de quercetina (2-(3,4-diidroxifenil)-3,5,7-triidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) (Sigma) foi preparada em meio aquometanólico 30% (v/v), após a dissolução de 5,0 mg do composto para um volume final de 50 mL (OLIVEIRA, 2016). O trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromen-2-carboxílico) (Sigma) ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi preparado após a dissolução de 10 mg do composto em 20 mL de etanol P.A. (Dinâmica).

A solução estoque do radical derivado do ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>)  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 26 mg de ABTS<sup>•+</sup> (Sigma) e 4 mg de persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) (Merck) em 10 mL de água. Após 16 h de incubação ao abrigo da luz, a solução foi diluída para 25 mL com tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  com pH ajustado para  $7,4 \pm 0,1$  (OLIVEIRA, 2016).

## 4.2 Equipamentos utilizados

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo ou de vidro de 1,0 cm de caminho óptico.

Nos estudos de interação empregando as naftoquinonas, as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico e capacidade de 4 mL.

Para as medidas de pH utilizou-se um medidor de pH Marte (Modelo MB10, Brasil) incerteza de  $\pm 0,01$  acoplado a um eletrodo combinado de vidro. As massas dos padrões e reagentes foram medidas em duas balanças analíticas: (i) balança analítica Bel com precisão de 0,1 mg para medidas  $\geq 10 \text{ mg}$  e (ii) balança analítica Mettler Toledo-AG245 com precisão de 0,01 mg (para massas  $< 10 \text{ mg}$ ).

O preparo de soluções e a limpeza de vidrarias foram realizadas com água ultrapura ( $18,2 \mu\text{S. cm}$ ), Mater System MS2000 (Gehaka, São Paulo, Brasil).

### 4.3 Procedimento experimental

#### 4.3.1 Fator de Proteção Solar UVB *in vitro*

Em um tubo eppendorf de 2 mL, pesou-se 1 mg dos derivados naftoquinônicos, e diluiu-se em DMSO. A solução estoque foi diluída em triplicatas nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$ , utilizando-se etanol absoluto como solvente. Posteriormente, as soluções tiveram suas absorvâncias determinadas na faixa de 260 a 400 nm. O FPS-UVB foi então determinado empregando-se a **Equação 1** (ARAÚJO et. al., 2014).

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC. \sum_{290}^{320} EE(\lambda). I(\lambda). Abs(\lambda) \quad \text{Equação (1)}$$

FC = fator de correção (igual a 10); EE ( $\lambda$ ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda  $\lambda$ ; I ( $\lambda$ ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda  $\lambda$ ; Abs ( $\lambda$ ) = medida espectrofotométrica da absorvância da solução da amostra no comprimento de onda ( $\lambda$ ); Os valores de EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ ) são dados na **tabela 2** abaixo.

**Tabela 2.** Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda da região UVB.

$\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ )
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

**Fonte:** Adaptado de Nascimento, et al., 2013.

#### 4.3.2 Sequestro do radical DPPH•

Em um tubo eppendorf de 2 mL foram adicionados 0,10 mL da solução metanólica do radical DPPH• ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de 0,0125 a 1,0 mL da amostra previamente diluída ou da

solução de referência. Em seguida, avolumou-se os tubos com uma solução aquometanólica 30% (v/v), nesta ordem, totalizando um volume final de 2,0 mL (HOSU; CRISTEA; CIMPOIU, 2014). O sinal de referência (branco) foi obtido a partir da medida de uma solução aquometanólica 30% (v/v). Posteriormente, 30 minutos de espera, realizou-se as medidas espectrofotométrica das soluções dos compostos e dos padrões (referência) em 517 nm com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico. As medidas foram realizadas em triplicatas, utilizando o trolox e a quercetina como padrão e os resultados expressos em equivalentes ( $\mu\text{m}/\text{mL}$ ) dos mesmos.

#### **4.3.3. Ensaio do sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>**

Para a realização do ensaio procedeu-se de forma similar ao DPPH<sup>•</sup>. Em um tubo eppendorf de 2 mL adicionou-se 0,088 mL da solução estoque do radical ABTS<sup>•+</sup>; 0,0125 a 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água (GÜLÇİN et al., 2010; OLIVEIRA, 2016). O sinal de referência (branco) foi obtido a partir da medida de uma amostra de água. Aguardou-se 15 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a medida espectrofotométrica das soluções dos compostos e dos padrões (referência) em 734 nm empregando-se cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. A curva analítica para o procedimento empregando ABTS<sup>•+</sup> foi construída empregando-se trolox como padrão de calibração. As medidas foram realizadas em triplicatas, utilizando o trolox e a quercetina como padrão e os resultados expressos em equivalentes ( $\mu\text{m}/\text{mL}$ ) dos mesmos.

#### **4.3.4 Determinação das propriedades ADME *in silico***

Os compostos naftoquinônicos foram submetidos ao preditor online SwissADME (DAIANA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) para determinar algumas propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Algumas regras foram empregadas para a previsão das propriedades ADME das moléculas avaliadas, a saber: as regras de Lipinski et al., (2001) e as regras de Veber et al., (2002). Dessa forma, a lipofilicidade (log P), a permeabilidade na pele (log Kp), a área de superfície polar topológica (TPSA), os números de doadores de ligação de hidrogênio (HBD), o número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) e o número de ligações que podem sofrer rotação foram calculados para todos os derivados naftoquinônicos avaliados.

#### 4.3.5 Determinação da atividade antiproliferativa dos compostos

Para a determinação da atividade antiproliferativa foram selecionadas 9 linhagens de células de carcinoma humano e uma não cancerosa. Os compostos foram avaliados em comparação com o controle positivo doxorrubicina sendo determinada a concentração mínima para que ocorra a inibição de 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ). A atividade citotóxica foi avaliada pelo método colorimétrico proposto por Mosmann (1983), cujo princípio baseia-se na redução do brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em um produto com a coloração azul escuro (MTT-formazan) pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase. A densidade óptica da solução em cada poço foram registradas em 540 nm e o percentual de viabilidade celular foi determinado em relação ao controle: (absorbância de células tratadas/absorbância de células não tratadas) x 100%.

#### 4.3.6 Determinação da concentração do *ctDNA* (*Calf thymus*)

Para determinar a concentração da solução estoque de *ctDNA* utilizou-se como base o coeficiente de extinção de  $6600 \text{ L mol}^{-1}$  a partir do sinal de absorvância em 260 nm após diluição na proporção de 1:100. Posteriormente avaliou-se a presença de proteínas na solução de *ctDNA*, para isso, calculou-se a razão do sinal de absorvância a 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), obtendo-se valores entre 1,8-2,0 (SAVARIZ, et al., 2014).

#### 4.3.7 Avaliação da interação *ctDNA*-ligante por fluorescência molecular e UV-Vis

A avaliação da interação do *ctDNA* com as naftoquinonas foi realizada a partir de titulações espectrofluorimétricas, nas quais se manteve constante a concentração do ligante ( $10 \mu\text{M}$ ) e variou-se progressivamente a quantidade de *ctDNA* ( $1\text{-}250 \mu\text{M}$ ). Nas medidas por UV-Vis, avaliou-se o sinal de absorvância do composto na ausência e na presença do *ctDNA*, bem como a absorvância do *ctDNA* livre. As medidas analíticas foram realizadas a temperatura ambiente e após tempo de incubação de 1 min.

#### 4.3.8 Estudo de competição com Brometo de etídio (BE) e Hoechst (HO)

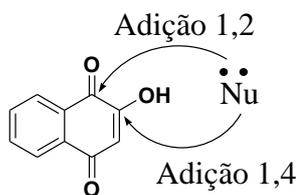
O estudo de competição com as sondas foi realizado com as sondas intercalante (BE) e/ou *groove* (HO) utilizando um espectrofluorímetro. No ensaio de deslocamento BE, manteve-se constante a concentração do *ctDNA* (6  $\mu\text{M}$ ) e BE (1,5  $\mu\text{M}$ ) e variou-se gradativamente a concentração dos compostos entre 1-150  $\mu\text{M}$ . Os espectros de emissão do complexo BE-*ctDNA* foram registrados de 535 a 700 nm na ausência e presença dos compostos avaliados por excitação a 525 nm. O mesmo experimento foi realizado para o deslocamento do HO por ativação do complexo HO-*ctDNA* em 353 nm e registro de espectros de emissão de 363 a 600 nm. A concentração do HO e do *ctDNA* foram de 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  respectivamente, e a dos compostos de 1 a 150  $\mu\text{M}$  (REHMAN, et al. 2015), ambos os experimentos foram realizados em Tris-HCl 50 mM, 0,1 M de NaCl (pH 7,4).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nessa sessão faremos a discussão dos resultados obtidos durante a realização do trabalho. Para tal, apresentaremos as estruturas das naftoquinonas de **1** a **8** as quais foram obtidas por extração ou síntese a partir de procedimentos experimentais descritos na literatura (CARDOSO, et al., 2018) e cedidas pelo Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal (LaSOM) da Universidade Federal de Alagoas-Campus Arapiraca, liderado pela professora Silvia Helena Cardoso.

As naftoquinonas podem sofrer reações de adição do tipo 1,4 (ataque ao carbono  $\beta$  olefínico) ou adição do tipo 1,2 (adição na carbonila) (**Figura 8**) (CARDOSO, et al., 2018; MARTINEZ, 2012). Desta forma, os compostos de **4** a **8** apresentados na **figura 9** foram sintetizados via reações de adição nucleofílica, explorando o comportamento ambidentado das naftoquinonas quando estas reagem com nucleófilos.

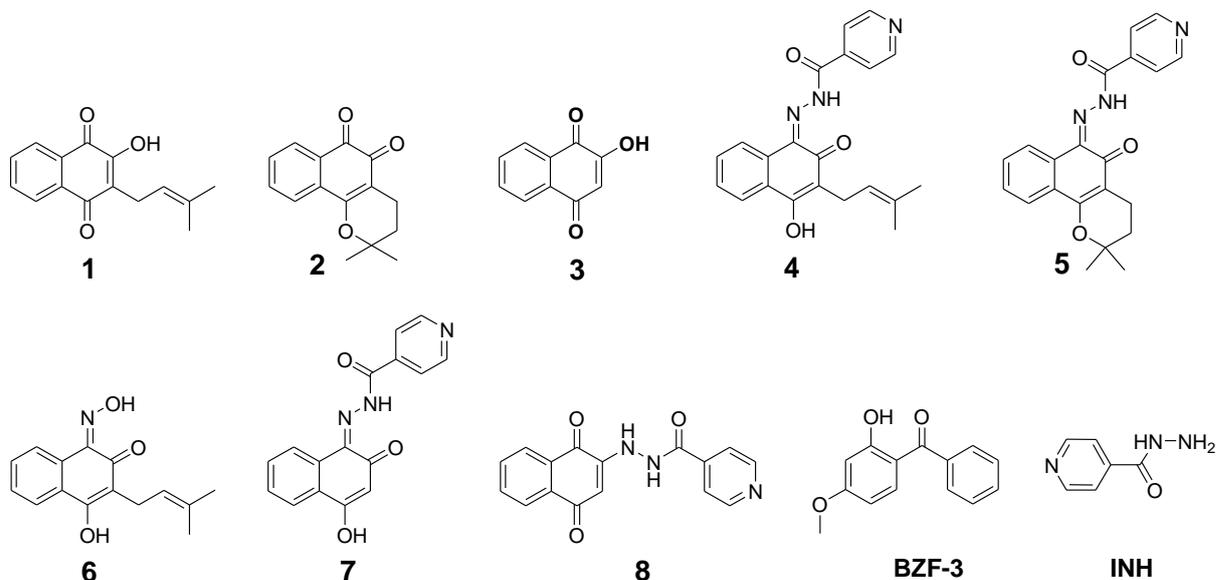
**Figura 8.** Adição nucleofílica as naftoquinonas do tipo 1,2 e 1,4.



Fonte: Adaptado de Carrol; Muller; Merck, 1970.

As estruturas dos derivados naftoquinônicos estudados estão apresentadas na **Figura 9**, nos quais, manteve-se o núcleo básico naftoquinônico e variou-se os substituintes nitrogenados nas posições 1 e 2 da naftoquinona, bem como a presença ou não da cadeia lateral isoprenila e do anel heterocíclico. Dessa forma, obteve-se os compostos de **1** a **8** com diferentes padrões de substituições. Vale ressaltar que os compostos de **1** a **3** são as naftoquinonas básicas sem substituintes nitrogenados, os compostos **4**, **5** e **7** são os derivados *N*-acilidrazona, o **6** uma oxima e o composto **8** uma *N*-acilidrazida naftoquinona (CARDOSO, et al., 2018; CARROLL; MILLER; MECK, 1970).

**Figura 9.** Estruturas dos compostos naftoquinônicos estudados e do padrão BZF-3 e INH.



**Fonte:** Autor, 2019.

Diversos fatores levaram a escolha dessa série de compostos para realizar esses estudos, dentre eles, destacam-se: disponibilidade, versatilidade do ponto de vista químico e baixo custo de síntese, uma vez que, o derivado naftoquinônico **1**, pode ser extraído da serragem da madeira da árvore ipê (gênero *Tabebuia*) e o derivado **3**, das folhas de henna (*lausonia inermis*), podendo, portanto, serem usados na preparação de novos análogos sintéticos. Além disso, um outro fator que chamou atenção desses derivados, foram os trabalhos descritos por Pandika (2018), que ressaltam a importância de compostos *N* iminos naturais, derivados de organismos marinhos, que potencializaram a atividade fotoprotetora, bem como, a vasta gama de atividade biológicas dos derivados naftoquinônicos, incluindo atividades antioxidante (GOUDA, et al., 2013), antitumoral (ESPINOSA-BUSTOS, et al. 2018) e a importância de heterocíclicos em moléculas com aplicações em farmacêuticas, em cosméticos, antioxidantes entre outras aplicações (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2018).

A seguir serão apresentados os estudos da avaliação do Fator de Proteção Solar Ultravioleta B (FPS-UVB) *in vitro*, seguindo pelos resultados da capacidade antioxidante, propriedades ADME *in silico*, atividade antiproliferativa para os compostos de **1** a **8** e, posteriormente os resultados da avaliação de interação *ctDNA*-ligante para os compostos de **4** a **6** selecionados a partir de uma triagem dos dados da atividade antiproliferativa.

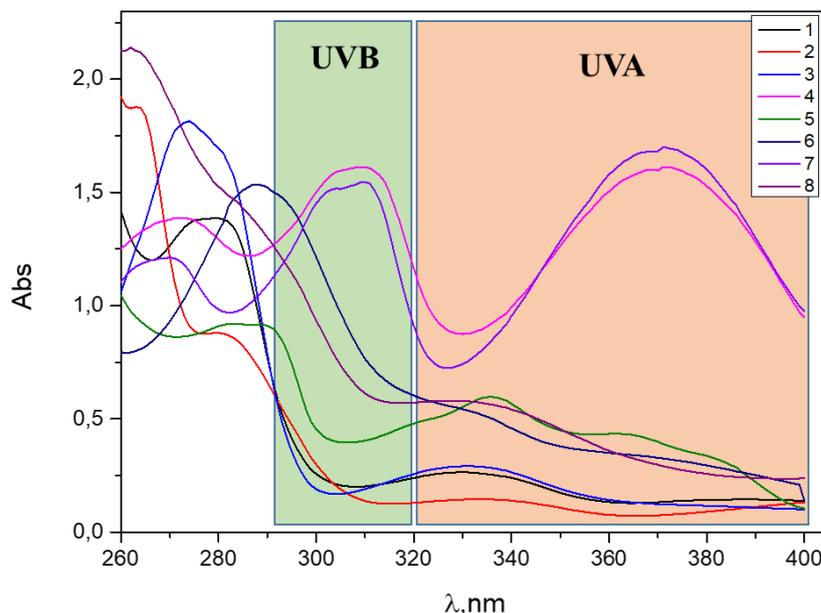
## 5.1 Avaliação do FPS-UVB

Para determinar o Fator de Proteção Solar (FPS), foram realizados testes preliminares, neste caso uma curva analítica, para determinar a faixa de linearidade a serem empregadas nas medidas. Desta forma, realizou-se varreduras espectrofotométricas dos compostos em concentrações que variaram de 5 a 500  $\mu\text{M}$ . A partir das medidas, foi possível observar que todos os compostos demonstraram ter uma faixa linear entre 5 e 250  $\mu\text{M}$  (**Figura 26**, na página 88 em anexo). Assim, optou-se por realizar as medidas de UV-Vis para o posterior cálculo do FPS-UVB somente com as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$ , uma vez que entre essas concentrações situa-se a faixa ótima de análise.

Os compostos de **1-8** tiveram seus comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e faixa de absorção de radiação UV (260-400 nm) determinados. Nestas medidas foi observado que todos os compostos apresentaram absorção nas regiões UVA e UVB (**Figura 10**), sendo que, os compostos de **4 a 7** apresentaram  $\lambda_{\text{máx}}$  na região de UVB (**Tabela 3** e em anexo **7**, na página 89). Além disso, para conhecer o potencial de absorção, foram calculadas as absorvidades molares ( $\epsilon$ ) dos mesmos. A absorvidade molar é um parâmetro de extrema importância para determinar a ocorrência de transições eletrônicas em moléculas, podendo esse variar de 0 a  $10^6$  e quanto maior o valor de  $\epsilon$ , maior a absorvância (PAVIA, 2013). Sendo que, fotoprotetores orgânicos UV, devem possuir um  $\epsilon$  acima de  $10^3$ , para se ter o máximo de proteção com o mínimo emprego de filtro UV (NASCIMENTO, et al., 2013).

As moléculas que possuem as propriedades supracitadas, absorvem a radiação UV (altas energias) e posteriormente, transforma-as em ondas eletromagnéticas de baixa energia. As transições eletrônicas são o princípio do mecanismo de ação desses compostos. Ao absorver a radiação UV, os elétrons situados no orbital molecular não ligante n ou no orbital ligante  $\pi$ , ou seja, no orbital molecular preenchido de mais alta energia (HOMO), são excitados para orbital  $\pi^*$ , orbital molecular vazio de mais baixa energia (LUMO) e, ao regressarem para o estado inicial, ocorre a liberação de energia na forma de ondas eletromagnéticas acima de 400 nm, particularmente menos danosas a pele humana (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; NASCIMENTO, et al., 2013).

**Figura 10.** Espectro de absorção dos compostos de **1-8** demonstrando regiões de máxima absorção (UVA e UVB).



**Fonte:** Autor, 2019.

Os compostos **1**, **2**, **3** e **8** apresentaram uma  $\lambda_{\text{máx}}$  na região UVA (320-400 nm), exibindo baixos valores de  $\epsilon$  (2,568, 1,457, 2,911 e 5,796 L.mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> respectivamente), o que indica que esses compostos têm baixa capacidade de absorver radiação ultravioleta nessa região do espectro (PAVIA, 2013), bem como na região de interesse, UVB (290-320 nm). O composto **5**, apesar de apresentar  $\lambda_{\text{máx}}$  nas regiões UVA e UVB, exibiu baixos valores de  $\epsilon$ , 9,116 e 5,971 L. mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Por outro lado, os compostos **4**, **6** e **7** apresentaram resultados de  $\epsilon$  superiores a 10<sup>4</sup>, sendo esses respectivamente, 16,111, 15,348 e 15,473 L.mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, o que é um indício que esses compostos possuem uma alta capacidade de absorver radiação na região do UVB, faixa de radiação mais danosa para humanos (ARAÚJO, et al. 2014; PAVIA, 2013). Além disso, como pode ser visto na **tabela 3** abaixo, os compostos **4** e **7** também apresentaram absorção tanto em UVA quanto em UVB.

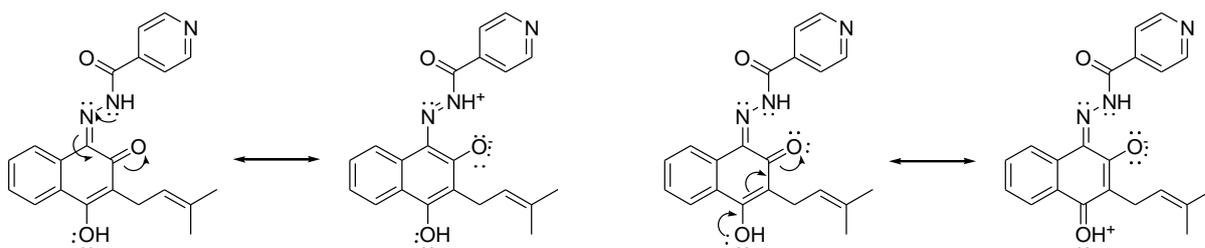
**Tabela 3.** Comprimentos de onda de absorção máxima e absorvidade molar dos compostos de **1** a **8** aferidos na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

COMPOSTO	1	2	3	4	5	6	7	8
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	330	334	330	310/372	290/336	288	310/371	330
UVA/UVB	UVA	UVA	UVA	UVB/UVA	UVB/UVA	UVB	UVB/UVA	UVA
$\epsilon$ ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ )	2,568	1,457	2,911	16,111/ 16,125	9,116/ 5,971	15,348	15,473/ 17,002	5,796

**Fonte:** Autor, 2019.

Os maiores valores de  $\epsilon$  nos compostos **4**, **6** e **7** estão associados ao sistema conjugado nas estruturas de tais derivados, o que lhe confere maiores transições eletrônicas quando comparados aos demais compostos e conseqüentemente, maiores  $\epsilon$  (**Figura 11**), vale ressaltar que devido à similaridade estrutural, o composto **4** foi utilizado como modelo para demonstrar tal característica.

**Figura 11.** Transições eletrônicas nos compostos **4**, **6** e **7**.



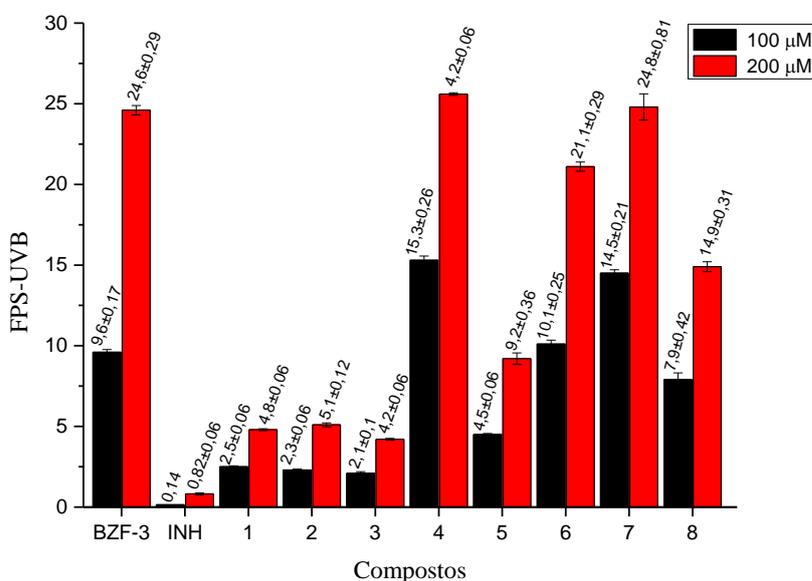
**Fonte:** Autor, 2019.

Por conseguinte, empregando a fórmula de Mansur et al (1986) **eq. 1**, os respectivos FPS-UVB foram determinados nas concentrações testadas (**Figura 12**). Desta forma, os compostos de **1** a **3** apresentaram valores de FPS abaixo de 6 na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , enquanto todos os derivados naftoquinônicos nitrogenados (**4** a **8**) apresentaram para a mesma concentração, valores de FPS acima de 7, uma atividade fotoprotetora relevante, estando

dentro dos limites mínimos de exigência do Fator de Proteção Solar da ANVISA (2012), FPS = 6.

Visando fazer uma breve comparação entre moléculas utilizadas em fotoprotetores e os compostos aqui avaliados, empregou-se a 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BZF-3) que é um fotoprotetor presente em formulações comerciais (NASCIMENTO et al., 2014; ARAÚJO, et al., 2014) como padrão. Ao comparar a atividade da BZF-3, nas mesmas condições dos compostos em estudo, pôde-se notar que os resultados obtidos para os compostos sem substituintes nitrogenados, lapachol (**1**), seu isômero cíclico,  $\beta$ -lapachona (**2**) e a lausona (**3**) se apresentaram-se de 4 a 5 vezes menores que o padrão em ambas as concentrações estudadas, como pode ser visto no gráfico da **Figura 12**. Entretanto, os resultados referentes aos derivados nitrogenados de **4 a 8**, demonstraram-se superiores ou aproximados ao padrão BZF-3. Os compostos **4**, **6** e **7** apresentaram os melhores resultados desta série e o derivado **5** o menor. Adotando especificações da FDA (2017), que estabelece os FPS-UVB igual ou superior a 15, estima-se que os compostos **4**, **6**, **7** e **8** são os mais promissores para a continuidade desses estudos visando um produto com atividade fotoprotetora.

**Figura 12.** FPS-UVB dos compostos de **1 a 8**, do **INH** e do **BZF-3** nas concentrações de 100 e 200  $\mu$ M.



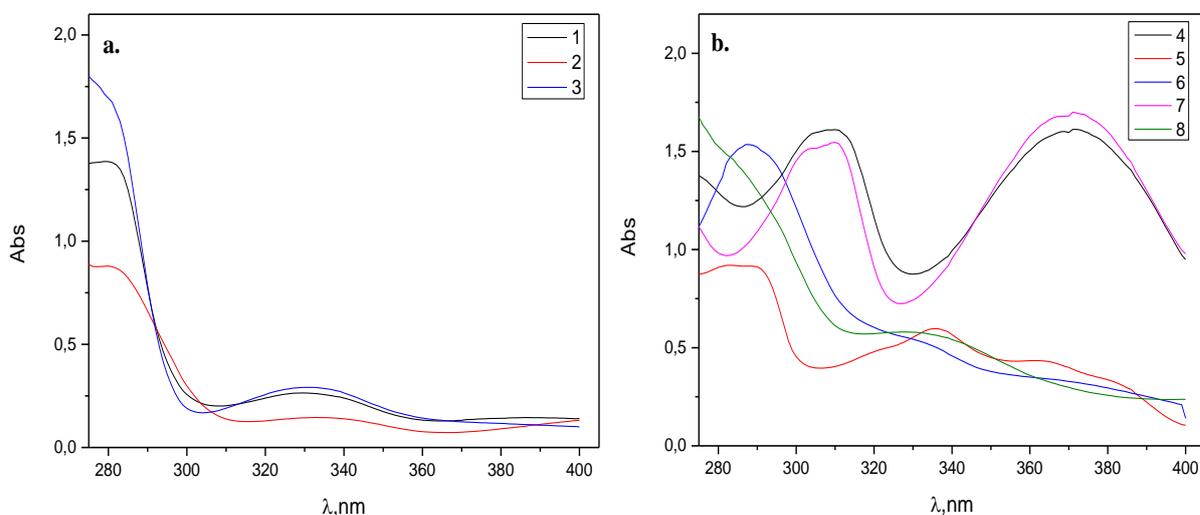
**Fonte:** Autor, 2019.

Um outro fator avaliado nas medidas espectrofotométricas e posteriores cálculos FPS, foi a possível interação sinérgica ou aditiva entre o isonicotinoila hidrazida (**INH**) e os compostos de **1 a 3**, uma vez que esses são os precursores para os derivados de **4 a 8**. Sendo

assim, como pode ser observado no gráfico descrito a **Figura 12**, o **INH** apresentou baixos valores de FPS e a soma de tais valores, com o dos compostos de **1 a 3**, são bem menores de o FPS-UVB dos derivados de **4 a 8**, o que inviabiliza o pressuposto de sinergismo.

Quando se compara os compostos **1, 2 e 3** com os derivados oxima, *N*-acilidrazona ou *N*-acilidrazida **4 a 8**, pode-se notar que a mudança de uma carbonila ou uma hidroxila do núcleo básico da naftoquinona por um grupo nitrogenado, seja ele uma oxima (**6**), uma *N*-acilidrazona (**4, 5 e 7**) ou uma *N*-acilidrazida (**8**) aumentou de 3 a 4 vezes o FPS-UVB, fato decorrente de um efeito hipercrômico na região UV entre 290-320 nm (ARAÚJO, et al. 2014) quando comparados as naftoquinonas sem os substituintes nitrogenados (**Figura 13a e b**). Além disso, para avaliar outros possíveis fatores que influenciaram no FPS-UVB desses compostos, fez-se uma relação estrutura-atividade, iniciando por seus espectros de absorção na região de interesse (290-320 nm) descritos na **Figura 13**.

**Figura 13.** Espectros de absorção dos compostos naftoquinônicos de **1 a 3** (a) e dos derivados nitrogenados de **4 a 8** (b) na concentração de 100  $\mu$ M na região do UVB e UVA.



**Fonte:** Autor, 2019.

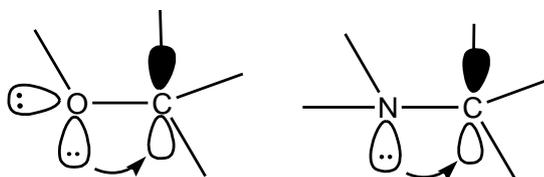
Como pode ser observado nos espectros de UV-Vis acima, não há muita semelhança entre os espectros de absorção dos compostos de **1 a 3** com os derivados de **4 a 8**, o que já era esperado, uma vez que a adição de um grupo mudará o sistema eletrônico (PAVIA, 2013) do produto formado. Mas, pode-se notar que os compostos de **1 a 3** possuem espectros bastantes semelhantes, mudando apenas as intensidades das bandas de absorção. De acordo com Araújo et al. (2014), isso pode estar associado as transições eletrônicas do tipo  $n-\pi^*$  advindas do

grupo benzoquinona presente em tais estruturas, os quais são responsáveis pelo FPS-UVB de **1** a **8**. Vale ressaltar que nos compostos de **4** a **8**, esse mesmo tipo de transição eletrônica ocorre também no átomo de N do grupo isonicotinoila da hidrazida/hidrazona (RANI, et al., 2015). Além disso, as bandas de absorções em aproximadamente 280 nm são provenientes de transições eletrônicas do tipo  $\pi$ - $\pi^*$  (RANI, et al. 2015).

A presença da cadeia lateral isoprenila (3-metil-2-butenil) nos compostos **1** e **4** em relação aos compostos **3** e **7**, pode ter contribuído com uma discreta contribuição para aumentar o FPS dos primeiros em relação aos últimos, fato decorrente do efeito hipercrômico provocado pela cadeia lateral. Além disso, quando se compara os compostos **4** e **7** com e sem a cadeia lateral, pode-se notar que o grupo *N*-acilidrazona é um dos cromóforos responsáveis pelo padrão de absorção nesses compostos, o provoca o aumento do FPS. Além disso, existe uma discreta contribuição da cadeia lateral isoprenila, que deve ser a responsável por uma parcela da absorvância da molécula em comprimentos de ondas menores devido às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ , o que explica a baixa na absorvância e conseqüentemente uma diminuição no valor FPS-UVB do composto **7** em relação ao **4** na região UVB, vale ressaltar que esses dois derivados apresentaram os melhores resultados da série avaliada.

Neste contexto, considerando os altos FPS-UVB dos derivados nitrogenados em relação aos compostos sem substituintes nitrogenados, os derivados naftoquinônicos de **4** a **8** foram projetados com uma combinação de grupos eletrodadores e eletroretiradores, formando um sistema puxa-empurra (HARISHKUMAR, et al., 2012), isso lhes confere uma maior transição eletrônica e conseqüentemente um maior fator de proteção. Ademais, os heteroátomos dos substituintes oxima, *N*-acilidrazona e *N*-acilidrazida possuem pares de elétrons não ligantes que podem interagir com os orbitais  $\sigma^*$  de ligantes adjacentes (**Esquema 1**), e assim tais interações mudam substancialmente as propriedades espectroscópicas do grupo nitrogenado a partir de um efeito conhecido como componente estereoeletrônico em hiperconjugação (CAREY, SUNDBERG, 2000) o que pode estar associado a tais FPS-UVB dos compostos de **4** a **8**.

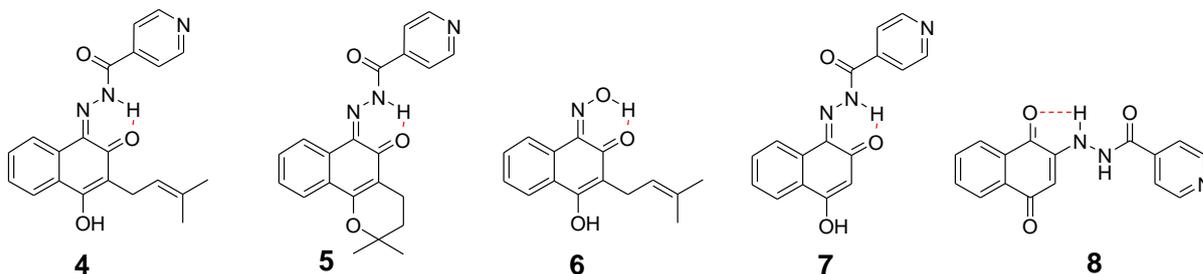
**Esquema 1.** Interação de elétrons não compartilhados com orbitais  $\sigma^*$  de ligantes adjacentes em compostos que possuem heteroátomos.



**Fonte:** Adaptado de Carey; Sundberg, 2000.

Além disso, os compostos **4**, **5**, **6**, **7** e **8** possuem uma ligação de hidrogênio intramolecular (**Figura 14**) formando um novo anel heterocíclico (CARDOSO, et al., 2018), que pode aumentar as transições eletrônicas, levando a um aumento da intensidade das bandas de absorção (deslocamento hiperacrômico), bem como, um deslocamento para comprimentos de onda de maior valor (deslocamento batocrômico) (PAVIA, 2013) em relação aos compostos sem substituintes e como consequência um aumento do FPS-UVB. Vale ressaltar que os compostos **1** e **3** possuem átomos propícios a formarem ligações de hidrogênio intramolecular, levando a formação de um novo anel heterocíclico, entretanto, não foram identificadas nenhuma evidência de tal premissa nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  desses derivados (CARDOSO, et al., 2018).

**Figura 14.** Ligação de hidrogênio intramolecular existente entre os derivados naftoquinônicos nitrogenados de **4** a **8**.



**Fonte:** Adaptado de Cardoso, et al., (2018).

Um outro fator a ser considerado como contribuinte no FPS-UVB dos compostos aqui avaliados é a conservação da hidroxila enólica nos derivados do lapachol (**1**) e da lausona (**3**), a qual participa da ressonância no sistema conjugado (Araújo, et al. 2014) e pode estar associado aos valores superiores de FPS-UVB desses compostos (**4**, **6**, **7** e **8**).

Assim, de um modo geral observou-se que o FPS-UVB dos compostos de **1** a **8** na concentração de 200  $\mu$ M seguiu a seguinte ordem:  $4 > 7 > 6 > 8 > 5 > 2 > 1 > 3$ . Destaca-se que tais valores de FPS-UVB corroboram com trabalhos descritos na literatura, como Araújo, et al. (2014) o qual também realizou estudos com derivados naftoquinônicos e encontrou resultados semelhantes aos descritos acima.

Dessa forma, é possível afirmar que os compostos de **4** a **8** apresentam uma boa atividade fotoprotetora (ANVISA, 2012; FDA, 2017). No entanto, como a exposição excessiva aos raios UV causam a formação de espécies reativas que podem causar dentre várias desvantagens, o envelhecimento precoce da pele, bem como neoplasias graves como o câncer de pele (COSTA, et al. 2015), sendo assim, decidiu-se avaliar também a capacidade antioxidante dos compostos de **1** a **8**, uma vez que a aplicação tópica de antioxidantes reduz os danos oxidativos induzidos pela radiação UV (SCOTT, et al., 2007).

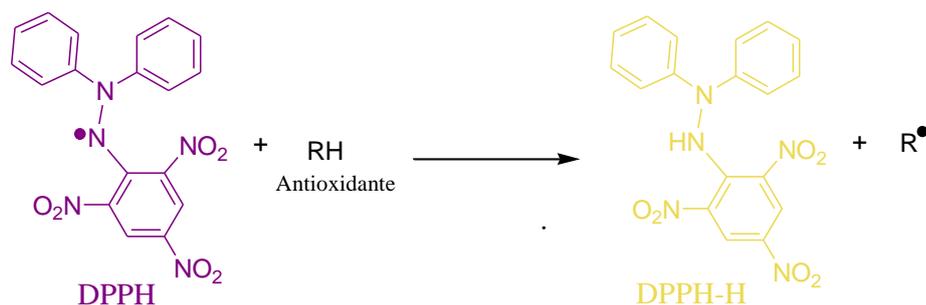
## 5.2 Atividade antioxidante

### 5.2.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila (DPPH<sup>•</sup>)

Os ensaios da capacidade antioxidante das naftoquinonas de **1** a **8** foram realizados utilizando-se os métodos de sequestro dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, os quais foram avaliados a partir de curvas analíticas resultantes da variação do percentual de inibição em função da concentração dos padrões antioxidantes e das naftoquinonas ( $\%I = aC_{AO} + b$ ). Assim como para os ensaios seguintes, o trolox e a quercetina foram utilizados como padrões.

O 2,2-difenil-2-picrilidrazila (DPPH<sup>•</sup>) é um radical nitrogenado orgânico estável, de cor violeta utilizado para determinar a capacidade antioxidante de outros compostos (JABBARIA, GHARIB, 2012; SHARMA, BHAT, 2009) existindo uma maior tendência por moléculas mais hidrofóbicas do que hidrofílicas (OLIVEIRA, 2016). Esse radical simula espécies reativas (RS) que, ao receber um elétron ou hidrogênio radical (ser reduzido) do agente antioxidante, tem seu elétron emparelhado e sua coloração modificada para amarela, correspondendo ao DPPH<sup>•</sup> reduzido, isto é, o 2,2-difenil-1-picrilidrazina (DPPH-H) (ZAMANI, DELFANI, JABBARI, 2018; IONITA, 2003; MARTEAU, et al. 2014) demonstrado no **esquema 2**.

**Esquema 2.** Esquema reacional entre o radical DPPH• e um composto antioxidante.



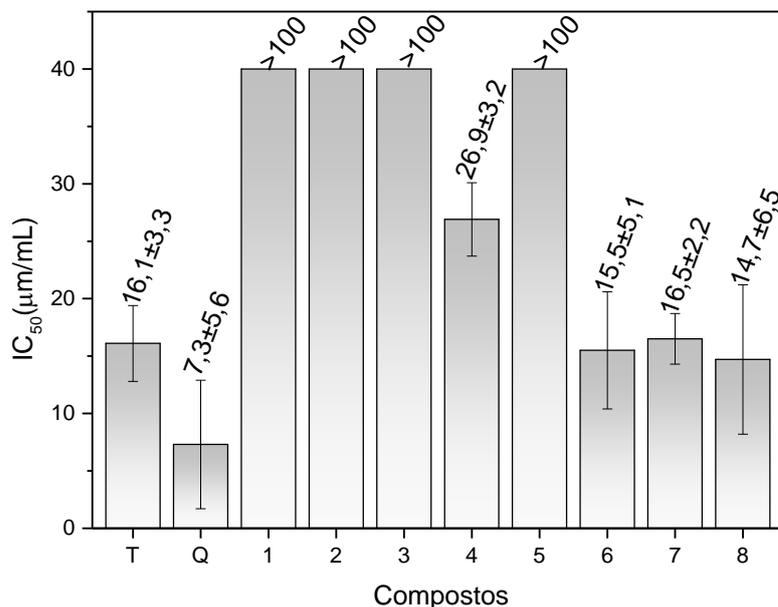
**Fonte:** Adaptado de Zamani, Delfani, Jabbari, 2018.

O DPPH• tem uma absorção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) entre 515-517 nm, sendo assim, a atividade antioxidante pode ser mensurada pelo método de espectrofotometria, monitorando o comprimento de onda  $\lambda_{\text{máx}}$ . Nesta análise a medida que o antioxidante vai inativando os radicais por meio da doação de elétron ocorre a diminuição da intensidade da coloração violeta (LEE, et al. 2007), ou seja, a redução da absorvância é proporcional a concentração e a atividade antioxidante da amostra (RIBEIRO, 2011). Sendo assim, as medidas do sequestro de radical DPPH foram realizadas em 517 nm.

Os resultados do ensaio com DPPH• foram expressos em IC<sub>50</sub>, tendo como unidade  $\mu\text{m}/\text{mL}$ . O IC<sub>50</sub> representa a concentração mínima necessária dos derivados naftoquinônicos de **1** a **8** para produzir uma redução de 50% dos radicais DPPH• presentes na matriz analisada. Quanto menor o valor de IC<sub>50</sub>, maior a capacidade sequestradora em baixas concentrações em condições semelhantes.

Os resultados da atividade antioxidante dos compostos naftoquinônicos não nitrogenados **1**, **2** e **3** e dos derivados *N*-acilidrazona (**4**, **5** e **7**), oxima (**6**) e *N*-acilidrazina (**8**) frente ao método DPPH• estão dispostos na **Figura 15**.

**Figura 15.** Atividade antioxidante dos derivados naftoquinônicos de **1** a **8** e dos padrões trolox e quercetina pelo método de sequestro do radical DPPH•.



**Fonte:** Autor, 2019.

Os valores de IC<sub>50</sub> indicam que entre os compostos naftoquinônicos avaliados, os derivados **6**, **7** e **8** apresentaram os menores valores, 15,5, 16,5 e 14,7 µm/mL respectivamente. Neste estudo, o composto **8** teve o melhor resultado da série de compostos avaliados, entretanto, inferior ao padrão quercetina (**Q**) (7,3 µm/mL), porém superior ao padrão trolox (**T**) (16,1 µm/mL). Além disso, pode-se notar também, que o composto **4** apresentou-se ativo como sequestrador do radical DPPH•, tendo esse um IC<sub>50</sub> de 26,9 µm/mL. Os demais compostos também foram ativos como sequestradores de DPPH•, porém, em menor extensão, sendo necessário uma alta concentração dos mesmos (>100 µm/mL), para promover 50% de inibição do radical.

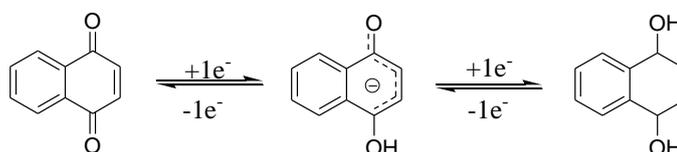
Uma característica estrutural de extrema importância na atividade antioxidante de alguns desses compostos é a presença da hidroxila enólica. A presença do grupo hidroxila nos anéis contendo heteroátomos nitrogenados tiveram a atividade antioxidante potencializada por efeito de ressonância entre o par de elétrons do tipo *p* do heteroátomo e o radical enóxi formado, fato esse que também observado em derivados flavonoides (SCOTT, et al., 2007). Outro fator que auxilia na atividade antioxidante, principalmente dos derivados nitrogenados de **4** a **8** é a presença da ligação de hidrogênio descrita na **Figura 14** da página 49, de acordo com Scott, et al., (2007), as ligações de hidrogênio nos compostos na forma neutra não

aumentam a atividade antioxidante, mas após a abstração do hidrogênio enólico, estabilizam o radical, favorecendo a atividade.

Neste sentido, foi possível observar que os derivados naftoquinônicos nitrogenados apresentaram uma capacidade antioxidante relevante, dos quais, exceto o derivado **5**, exibiram um IC<sub>50</sub> abaixo de 27 µm/mL. De acordo com a literatura, antioxidantes volumosos reagem lentamente, ou sequer reagem com o radical, devido ao impedimento estérico da molécula do radical. Essa condição compromete os resultados do ensaio para a determinação da capacidade antioxidante de amostras mais complexas (KARADAG et al., 2009; PRIOR et al., 2005), fato perceptível no composto **5**, o qual possui em sua estrutura um anel heterocíclico não comum nos demais compostos o que pode explicar seu IC<sub>50</sub> elevado em relação aos demais. Ademais, diferente dos outros compostos, o **5** não possui nenhuma hidroxila enólica, o que pode justificar a maior efetividade dos demais em relação a este.

Os valores de IC<sub>50</sub> dos derivados naftoquinônicos **4** e de **6** a **8** indicam que esses compostos possuem uma capacidade de eliminar radicais livres. Rani et al. (2015) realizando estudos da capacidade antioxidante do composto **8** a partir do método de DPPH•, associou a formação do radical DPPH-H por doação de hidrogênio do derivado naftoquinônico *N*-acilidrazina **8**. Vale ressaltar, que o núcleo básico naftoquinônico pode formar duas espécies em reações redox: i) a semiquinona e a ii) hidroquinona (**Esquema 3**). A primeira redução refere-se à formação do ânion semiquinona e a segunda, a formação de um diânion radical que conseguem reduzir espécies reativas (LITIVACK JÚNIOR, 2009; PEREYRA, et al., 2019), o processo desta conversão contribui para o potencial antioxidante dos compostos de **1** a **8** como sequestradores de radical DPPH•.

**Esquema 3.** Propriedades redox das naftoquinonas. Redução de um elétron do núcleo da naftoquinona, para a formação do radical semiquinona e depois para a hidroquinona.



**Fonte:** Adaptado de Pereyra, et al., 2019; Ramor-Peralta, et al., 2015.

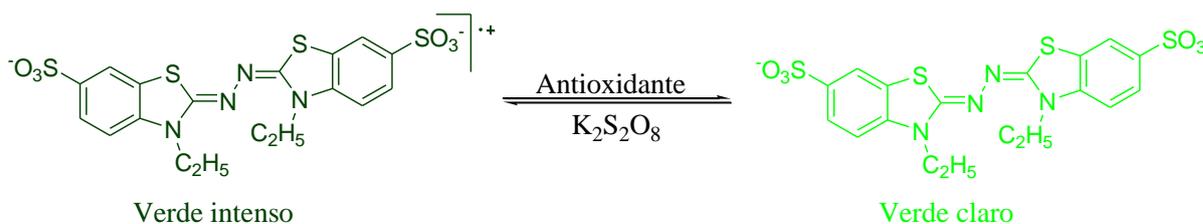
Por fim, com base nos resultados de IC<sub>50</sub> da atividade antioxidante, pôde ser observado que, em geral, os compostos naftoquinônicos de **1** a **3**, sem os substituintes nitrogenados, assim como o derivado *N*-acilidrazona **5**, não foram tão eficiente frente ao

método de sequestro de radical DPPH•, os quais apresentaram um IC<sub>50</sub> >100 µm/mL. Já os derivados nitrogenados **4**, **6**, **7** e **8** apresentaram uma capacidade antioxidante expressiva, tendo esses, valores de IC<sub>50</sub> < 27 µm/mL. Os valores de IC<sub>50</sub> dos compostos menos eficientes, podem estar associados a baixa solubilidade em água (BARBOZA; NETO, 2013).

### 5.2.2 Sequestro do Radical 2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS•<sup>+</sup>)

O sequestro do radical ABTS•<sup>+</sup> é um método muito utilizado para a avaliação do potencial antioxidante de compostos de diversas naturezas, sejam esses hidrossolúveis ou lipossolúveis (HUANG; OU; PRIOR, 2005; OLIVEIRA, 2016). Comumente, o mecanismo referente a esse método é atribuído à transferência de elétrons, no entanto, estudos têm indicado que o ensaio também pode ocorrer com a transferência de átomos de hidrogênio a depender da estrutura do antioxidante e das condições reacionais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Geralmente, o radical ABTS•<sup>+</sup> (**Esquema 4**) apresenta uma coloração verde intensa, cuja a absorvância pode ser mensurada no  $\lambda_{\text{máx}}$ , 734 nm (HUANG; OU; PRIOR, 2005; MAGALHÃES, et al., 2008).

**Esquema 4.** Esquema representacional da formação genérica do radical ABTS•<sup>+</sup>.



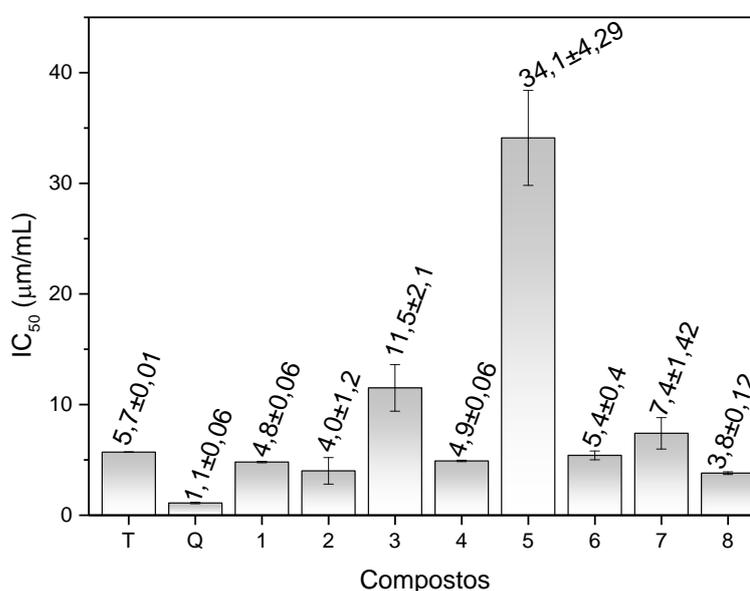
**Fonte:** Adaptado de Huang, Ou, Prior, 2005.

Assim como no método anterior, os resultados do ensaio com ABTS•<sup>+</sup> foram expressos em IC<sub>50</sub>, tendo como unidade µm/mL. Os resultados para esse ensaio estão descritos na **Figura 16** abaixo. Diferentemente dos resultados apresentados anteriormente pelo método de sequestro do radical DPPH•, todos os derivados avaliados apresentaram efeito antioxidante para o radical ABTS•<sup>+</sup>.

Dentre os compostos avaliados, os derivados **1**, **2**, **4**, **6** e **8** apresentaram relevante atividade antioxidante, sendo esses, até 2 vezes mais ativos quando comparados com o **T**.

Destaca-se novamente o composto **8**, sendo o mais ativo desta série, seguido dos derivados **2**, **1** e **4**. Quando comparamos os derivados naftoquinônicos nitrogenados, observa-se que a atividade antioxidante para esses compostos segue a seguinte tendência: **8** > **4** > **6** > **7**. Por fim, os compostos **5** e **3** foram os menos ativos, da série respectivamente. Em comparação ao padrão **Q** observou-se que o composto mais ativo desta série é cerca de aproximadamente 3 vezes menos ativo que esse padrão (**Figura 16**).

**Figura 16.** Atividade antioxidante dos derivados naftoquinônicos de **1** a **8** e dos padrões trolox e quercetina pelo método de ABTS<sup>•+</sup>.



**Fonte:** Autor, 2019.

Os valores de IC<sub>50</sub> indicam que entre os compostos naftoquinônicos avaliados, assim como no método anterior, o composto **8**, apresentou o melhor resultado da série da avaliada, 3,8 µm/mL, tendo essa molécula, uma atividade antioxidante até superior ao padrão **T**. Estruturalmente falando, o composto **8**, distingue-se dos demais derivados tanto em grupo funcional, quanto em posição quanto em substituinte, sendo esse composto um *N*-acilidrazina, com o derivado amino na posição 2, com isso, as carbonilas estão mais livres para serem reduzidos e conseqüentemente potencializa a atividade antioxidante desse composto em relação aos demais derivados da série compostos avaliados. Além disso, pode-se notar também, que os compostos **1**, **2** e **3** que necessitaram de concentrações superiores a 100 µm/mL para levar a 50% de inibição do radical DPPH<sup>•</sup>, foram bastante ativos frente ao método ABTS<sup>•+</sup>, com um IC<sub>50</sub> de 4,8, 4,0 e 11,5 µm/mL, tendo os dois primeiros, resultados

melhores que o padrão **T**. Os demais compostos **4**, **5** e **7** apresentaram respectivamente, 4,9, 5,4 e 7,4  $\mu\text{m/mL}$  de  $\text{IC}_{50}$ .

O composto **5**, apesar de exibir uma maior capacidade antioxidante frente ao método  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  em relação ao  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , assim como no ensaio anterior, da série de compostos nitrogenados avaliados, foi o derivado que apresentou a menor capacidade antioxidante. Essa menor capacidade antioxidante em relação aos demais compostos, pode estar associada a diversos fatores, dentre os quais, pode-se citar a ausência da hidroxila enólica comum em alguns dos compostos, bem como, a ausência do núcleo básico naftoquinônico que contribui com a atividade antioxidante dos compostos dessa classe quando são reduzidos a semiquinona (**Esquema 3**).

Os resultados obtidos para o ensaio de capacidade de sequestro do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  mostraram que os valores de  $\text{IC}_{50}$  da capacidade antioxidante dos compostos avaliados seguiu uma tendência semelhante a apresentada para o ensaio  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , sendo essas respectivamente,  $\text{Q} < \mathbf{8} < \mathbf{2} < \mathbf{1} < \mathbf{4} < \mathbf{6} < \mathbf{T} < \mathbf{7} < \mathbf{3} < \mathbf{5}$  e  $\text{Q} < \mathbf{8} < \mathbf{6} < \mathbf{T} < \mathbf{7} < \mathbf{4} < \mathbf{1}$  a **3** e **5**, vale ressaltar que quanto menor o  $\text{IC}_{50}$ , maior a atividade antioxidante.

Sendo assim, como a capacidade antioxidante dos compostos de **1** a **8** foram de quatro a cinco vezes maior para o método do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  em relação ao  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , pode-se sugerir que os compostos avaliados são em sua maioria antioxidantes de natureza preferencialmente hidrofílica (MAGALHÃES et al.,2008). Um outro fato a ser destacado, é que o mecanismo de ação de ambos os métodos estão baseados tanto em transferência de prótons, quanto de elétrons, sendo assim, a capacidade antioxidante da classe avaliada, tanto pode estar associada aos grupos hidroxilados, quanto ao núcleo básico naftoquinônico, porém estudos posteriores, como medidas eletroquímicas, devem ser realizados para avaliar tais pressupostos.

Com isso, pôde-se notar que os compostos avaliados apresentaram uma boa capacidade antioxidante, que podem vir a contribuir para a prevenção de radicais livres caso tais moléculas sejam utilizadas em formulações de fotoprotetores.

### **5.3 Propriedades ADME *in silico***

Para auxiliar no processo de correlação com o FPS-UVB *in vitro*, bem como, as atividades biológicas apresentadas posteriormente, foram realizados estudos ADME (absorção, distribuição, metabolismo, excreção) *in silico*. A utilização de cálculos teóricos é uma maneira de prever o comportamento das moléculas no meio biológico de forma barata e as vezes rápida. Neste contexto, o conhecimento das propriedades ADME com finalidades

medicinais e o uso de ferramentas computacionais com essa finalidade são de grande valia. Sendo assim, os derivados naftoquinônicos de **1** a **8** passaram por uma seleção ADME *in silico*, usando o software on-line SwissADME para calcular suas propriedades físico-químicas, bem como seu escore total de bioatividade. As propriedades ADME *in silico* dos compostos de **1** a **8** estão sumarizadas na **Tabela 4** abaixo.

**Tabela 4.** Propriedades ADME *in silico* dos compostos de **1** a **8** e do padrão para FPS, BZF-3.

Composto	Parâmetros físico-químicos						Log K <sub>p</sub> (cm/s)	Score de bioatividade
	Log P	TPSA (Å <sup>2</sup> )	Log S / Solubilidade (mg/mL)	HDB	HBA	Nº de ligações rotativas		
<b>1</b>	2,61	54,37	-3,25/ 1,38x10 <sup>-1</sup>	3	1	2	-5,76	0,56
<b>2</b>	2,42	43,37	-2,97/ 2,57x10 <sup>-1</sup>	3	0	0	-6,22	0,56
<b>3</b>	1,21	54,37	-2,13/1,29x10	3	1	0	-6,38	0,56
<b>4</b>	2,98	91,62	- 4,42/1,36x10 <sup>-2</sup>	5	2	5	-5,86	0,56
<b>5</b>	2,74	80,65	- 4,18/2,40x10 <sup>-2</sup>	5	1	3	-6,29	0,56
<b>6</b>	2,61	69,89	- 3,80/4,03x10 <sup>-2</sup>	4	2	2	-5,31	0,56
<b>7</b>	1,49	91,65	-2,99/ 3,03x10 <sup>-1</sup>	5	2	3	-6,83	0,56
<b>8</b>	1,19	91,32	-2,99/ 3,03x10 <sup>-1</sup>	5	3	4	-6,77	0,55
<b>BZF-3</b>	2,75	46,53	-2,97/ 2,46x10 <sup>-1</sup>	3	1	3	-5,00	0,55

Log P= Coeficiente de partição (octanol/água); TPSA= área de superfície polar topológica; Log S= solubilidade em água; HDB= Nº de ligações de H aceitadoras; HBA= Nº de ligações de H doadoras; Log K<sub>p</sub>= permeação na pele.

**Fonte:** Autor, 2019.

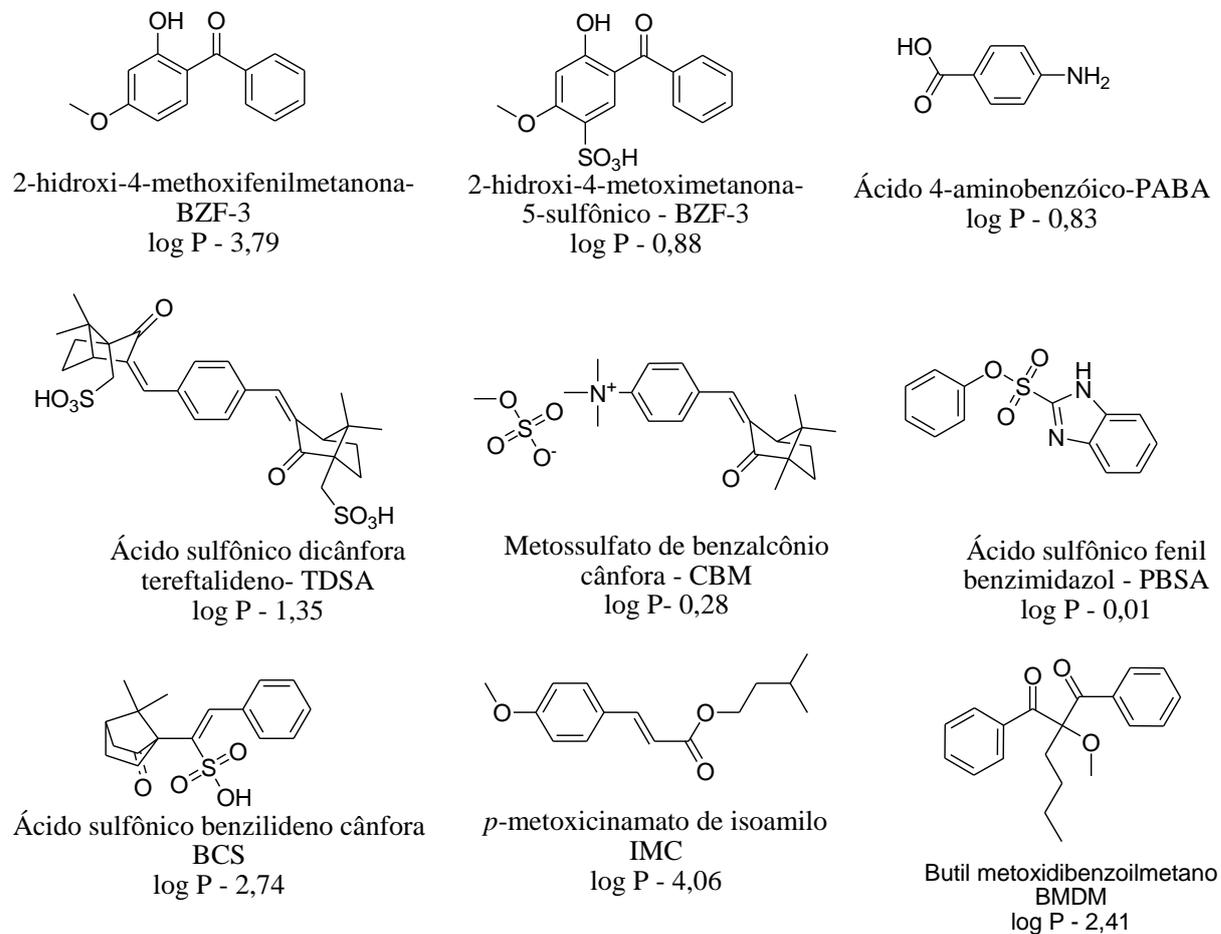
Geralmente, para garantir uma maior eficácia de novos candidatos a fármacos, alguns parâmetros são tidos como referência, é o caso da “regra dos cinco” de Lipinski, que estabelece parâmetros favoráveis à absorção e permeabilidade de compostos, que são eles: ≤ 5 doadores de ligação de hidrogênio; ≤ 10 aceptores de ligação de hidrogênio; massa molecular ≤ 500 Da; e log P ≤ 5 (LIPINSKI et al., 2001). Além disso, Veber et al., (2002) incluíram que o número de ligações rotacionáveis deveria ser ≤ 10 e que a área de superfície polar ≤ 140 Å (2002).

A capacidade de um composto penetrar membranas é caracterizada como permeabilidade. A permeabilidade de uma molécula na pele é determinada por propriedades físico-químicas dos compostos e pelas propriedades físico-químicas e biológicas da membrana (XIA, 2011; MEDEIROS, 20). Comumente, a permeabilidade cutânea chega a ser um problema em filtros solares, sendo uma característica passível de atenção (NASCIMENTO, et al. 2013). Dentre as

técnicas a serem utilizadas para avaliar a permeabilidade cutânea, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais utilizadas. Contudo, o valor aproximado desta propriedade pode ser previsto a partir de estudos *in silico*, os quais são expressos como log P.

O log P é um limite importante usado no desenho racional de fármacos para avaliar a hidrofobicidade molecular que afeta a absorção do fármaco, a biodisponibilidade, as interações fármaco-receptor, o metabolismo das moléculas assim como a sua toxicidade. Pode-se notar que todos os compostos avaliados neste estudo possuem um log de  $P < 5$ , o que implica que tais compostos devem ter uma boa habilidade de permeabilidade através das membranas celulares (FATHIMA; PAULPANDIYAN; NAGARAJAN, 2019). No entanto, para filtros solares é recomendado um log P maior que 5, ou seja, deve ter lipofilia específica para uma boa adesão na pele e evitar a permeabilidade cutânea, uma vez que não é desejado que o produto penetre na pele e seja assimilado pelo organismo. Contudo, mesmo não cumprindo exatamente esse parâmetro, muitas substâncias orgânicas são empregadas comercialmente como agentes de fotoproteção UV (SANTOS; MIRANDA; SILVA, 2012; NASCIMENTO, 2013) é o caso dos fotoprotetores descritos na **Figura 17**.

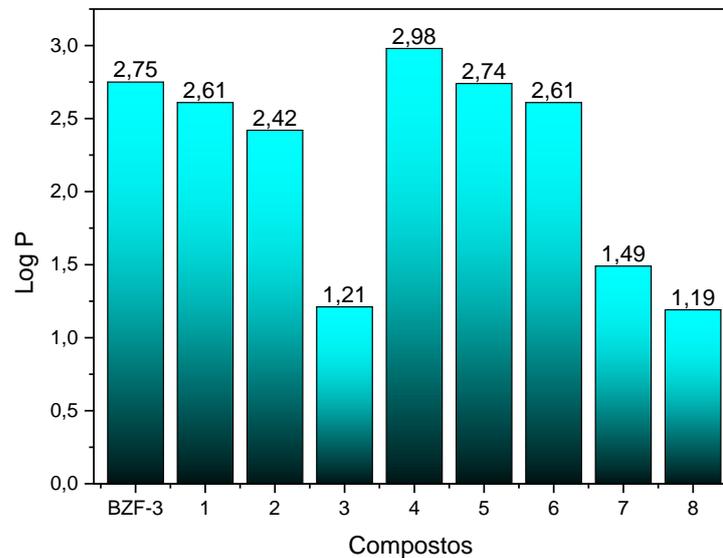
**Figura 17.** Fotoprotetores regulamentados e aprovados mundialmente, que possuem baixo log P.



**Fonte:** Adaptado de Santos; Miranda; Silva, 2012.

A partir dos valores de log P (**Figura 18**) nota-se que os compostos **3**, **7** e **8** apresentam a menor lipofilia (1,21; 1,49 e 1,19), assim como os compostos **1**, **2**, **4**, **5** e **6** apresentaram a maior lipoficidade, 2,62, 2,42, 2,98, 2,74, 2,61, tendo esses, valores de log P próximos ao do padrão BZF-3, 2,75.

**Figura 18.** Coeficiente de partição octanol/água (log P) dos compostos de 1 a 8 e do padrão BZF-3.

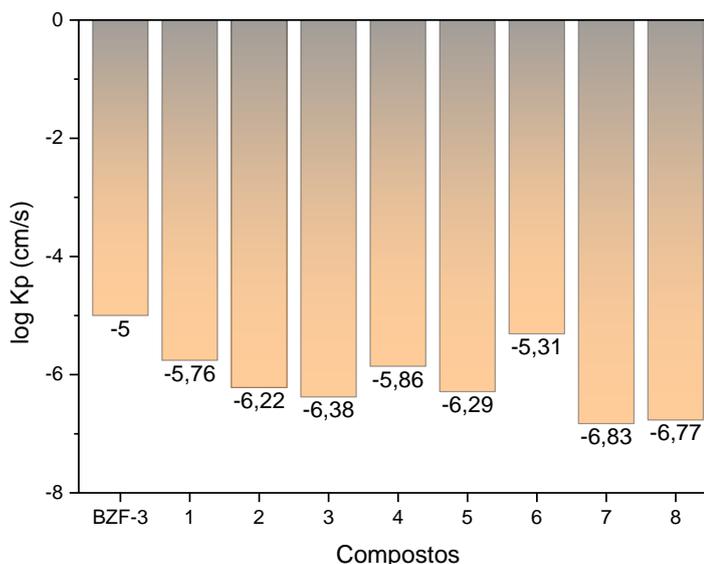


**Fonte:** Autor, 2019.

Os valores de log P também podem ser correlacionados com a capacidade antioxidantes. Quanto menor log P, mais hidrofílico será o composto. Por outro lado, quanto maior log P, mais hidrofóbico será o composto (BARREIRO; FRAGA, 2014). Neste sentido, como as moléculas apresentaram todos um log P abaixo de 2,98, é um indicio que tais compostos tem uma maior afinidade pela fase aquosa, principalmente os compostos **3**, **7** e **8** que apresentaram os menores valores de log P, corroborando com maior caráter hidrofílico apresentado nos ensaios antioxidantes.

Em consonância, foram calculados os valores de log K<sub>p</sub> dos compostos avaliados. O log de K<sub>p</sub> é o coeficiente de permeabilidade na pele, um modelo linear que correlaciona a massa molecular e a lipofilicidade dos compostos, sendo que, quanto mais negativo o log K<sub>p</sub>, menos permeante na pele será a molécula (DAIANA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; POTTS; GUY, 1992.). Neste sentido, como pode ser visto na **Figura 19**, todos os compostos avaliados apresentaram uma baixa permeabilidade na pele, tendo os compostos de **1** a **8** variado sua permeabilidade entre -5,31 a -6,83 cm.s<sup>-1</sup>, todos inferiores ao do padrão BZF-3, -5,0 cm.s<sup>-1</sup>.

**Figura 19.** Permeabilidade cutânea (log Kp) dos compostos de **1** a **8** e do padrão **BZF-3**.



**Fonte:** Autor, 2019.

A área de superfície polar topológica (TPSA) é o parâmetro associado à superfície dos átomos polares, e pode ser calculado com base na soma das contribuições de fragmentos polares centrados em átomos de O e N (FATHIMA, et al., 2019). O TPSA é um bom preditor de propriedades de transporte de fármacos, tais como absorção intestinal, biodisponibilidade, penetração da barreira hematoencefálica. Neste trabalho, todos os compostos avaliados apresentaram valores de TPSA de 43,37 Å a 91,65 Å, estando esses de acordo com os regulamentos impostos por Lipinski, et al., (2001) e Vaber, et al., (2002).

Quanto ao número de grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio presentes nos compostos de **1** a **8**, como pode ser visto na **Tabela 4** na página 57, os compostos possuem até 5 grupos doadores de ligações de hidrogênio e até 3 grupos de aceptores de ligação de hidrogênio. O número de ligações rotativas variou entre 2 e 5, sendo que apenas os compostos **2** e **3** não apresentam tal característica. De acordo com Vaber, et al., (2002), quando o número de ligações rotativas for  $\leq 10$ , o composto se torna mais adaptável para interação eficiente com o alvo de ligação. Sendo assim, estes valores indicam que os compostos de **1** a **8** podem se encaixar mais facilmente ao sítio receptor.

O score de bioatividade é um parâmetro que explicita os efeitos positivos de drogas em componentes vivos. Presume-se, que os alvos biológicos sejam as proteínas mais comuns, como enzimas, canais iônicos e receptores. Todos os compostos avaliados apresentaram um score de bioatividade 0,56, exceto o composto **8** que apresentou um valor de 0,55. De acordo com Vaber, et al., (2002), quanto maior o escore de bioatividade, maior a probabilidade de um

composto ser investigado em ensaios clínicos. Sendo assim, quanto mais diferente de zero o score de bioatividade maior a atividade biológica de uma molécula. Portanto, os compostos de **1 a 8** possuem uma alta atividade biológica.

#### 5.4 Toxicidade dos compostos avaliados

O *screening* de derivados sintéticas como candidatos a fotoprotetores orgânicos, requer uma série de experimentos, que apresentem informações amplas e seguras acerca dos compostos. Dentre os ensaios a serem realizados, pode-se citar: i) pureza; ii) FPS UVA e UVB *in vitro*; iii) fotoestabilidade; iv) hidrólise; v) ensaios fotobiológicos; vi) Sinergia em formulações; vii) permeabilidade cutânea; viii) imunossupressão; ix) resistência à água e, x) FPS UVA e UVB *in vivo* (NASCIMENTO, et al., 2014).

Em meio aos ensaios realizados para a série de compostos avaliada, cabe ressaltar que os derivados **1, 2, 3, 4 e 8** foram submetidos a testes *in vitro* de viabilidade celular frente a fibroblastos (3T3) em estudos anteriores (CARDOSO, et al., 2018). Os compostos foram avaliados em quatro concentrações distintas, 1, 5, 10 e 50  $\mu\text{M}$ . Dos derivados estudados, apenas a molécula **2** demonstrou-se tóxico na solução mais concentrada, levando a reduções de viabilidade celular. Corroborando esses estudos, com os ensaios de FPS-UVB *in vitro*, atividade antioxidantes e propriedades ADME *in silico* citados anteriormente, que visam o desenvolvimento da classe avaliada como fotoprotetores orgânicos.

#### 5.5 Atividade Antiproliferativa

Os compostos de **1 a 8 (Figura 9)** foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa a partir de ensaios MTT frente a nove linhagens de células tumorais humanas, a saber: glioma (U251), mama (MCF-7), ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03) cólon (HT-29) e leucemia (K562); além das células não cancerosas queratinócito (HaCaT) os quais seus respectivos  $\text{GI}_{50}$  estão descritos na **Tabela 5**. Vale ressaltar que esse estudo foi realizado em colaboração com a professora Dr<sup>a</sup> Mary Ann Folglio (FCM-UNICAMP).

**Tabela 5.** Concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular (GI<sub>50</sub>) em µg/mL dos compostos de **1** a **8** frente a nove linhagens de células tumorais humanas.

	U251	MCF-7	NCI-ADR/R ES	786-O	NCI-H460	PC-3	OVCA R-03	HT-29	K562	HaCaT
<b>Doxo</b>	0,54	0,21	1,31	0,18	0,17	0,91	1,69	2,95	1,70	0,51
<b>1</b>	1,48	2,84	1,50	0,43	0,37	4,06	2,48	1,91	1,70	0,53
<b>2</b>	0,19	0,33	0,17	0,34	0,26	0,36	0,21	0,50	0,80	0,21
<b>3</b>	10,59	2,21	41,41	6,05	0,70	62,29	16,79	2,63	25,60	1,76
<b>4</b>	5,73	5,05	2,88	2,66	2,71	10,60	2,48	3,20	1,40	2,30
<b>5</b>	34,96	20,51	9,18	11,26	13,13	145,90	37,03	9,17	41,31	4,85
<b>6</b>	2,64	2,50	0,97	0,86	0,64	2,36	0,93	0,94	1,56	0,65
<b>7</b>	50,66	27,23	42,57	29,92	28,97	53,78	28,08	25,85	16,84	10,19
<b>8</b>	8,72	2,59	5,04	8,78	1,71	20,19	3,23	4,44	5,74	0,93

Doxo: Doxorubicina (quimioterápico de referência). GI<sub>50</sub>: *Growth Inhibition 50* – concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular.

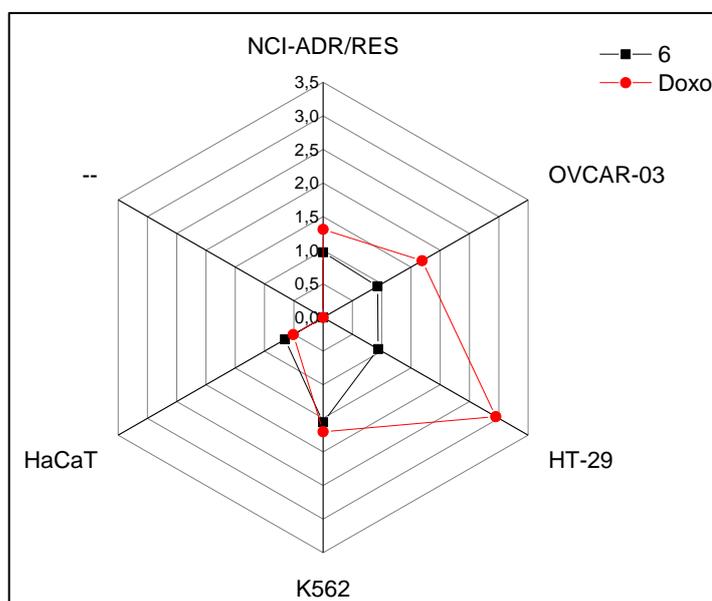
**Fonte:** Autor, 2019.

Como pode ser observado na tabela acima e demonstrado pelas propriedades ADME *in silico* anteriormente, mais especificamente pelo score de bioatividade, todos derivados naftoquinônicos apresentaram atividade antiproliferativa, demonstrando-se eficazes frente a todas as linhagens celulares tumorais testadas. Entretanto, os compostos de **1** a **8** não apresentaram seletividade, ou seja, os compostos matam tanto as linhagens tumorais, quanto as células saudáveis (HaCaT). Isso pode estar associado ao núcleo básico da naftoquinona, uma vez que tal grupo é particularmente eficaz na indução da apoptose. Esse grupo está frequentemente envolvido na ativação biorredutiva e indução do estresse oxidativo genérico tanto nas linhagens celulares de câncer quanto nas células saudáveis (BAO, et al. 2018). Além disso, ressalta-se que nem mesmo alterações estruturais realizadas nesse estudo e sugeridas pela literatura (ANTONINI, et al., 1995; SUÁREZ-ROZAS, et al. 2019), neste caso, a adição de grupos nitrogenados, foram capazes de resolver os problemas de citotoxicidade e seletividade das naftoquinonas aqui avaliadas.

Conforme descrito na **Tabela 5**, o derivado naftoquinônico **6** que possui o substituinte hidroxilamino na posição 1, exibiu o maior potencial antiproliferativo em todas as células tumorais testadas ( U251: 2,64; MCF-7: 2,50; NCI-ADR/RES: 0,97; 786-O: 0,86; NCI-H460: 0,64; PC-3: 2,36; OVCAR-03: 0,93; HT-29: 0,94; K562: 1,56 µg/mL), assim como uma menor toxicidade (0,65 µg/mL) quando se compara com a sua 1,4-naftoquinona equivalente, sem o substituinte nitrogenado (**1**) (0,53 µg/mL) e ao fármaco padrão (0,51 µg/mL). Além

disso, a eficiência citotóxica do derivado **6**, é comparável, algumas vezes até superior a do fármaco padrão doxorubicina como é o caso das linhagens tumorais, NCI-ADR/RES: 1,31 e 0,97; OVCAR-03: 1,69 e 0,93; HT-29: 2,95 e 0,94; K562: 1,70 e 1,56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a doxorubicina e o composto **6**, respectivamente (**Figura 20**).

**Figura 20.** Atividade antiproliferativa do composto **6** e do padrão doxorubicina frente a ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K562).



**Fonte:** Autor, 2019.

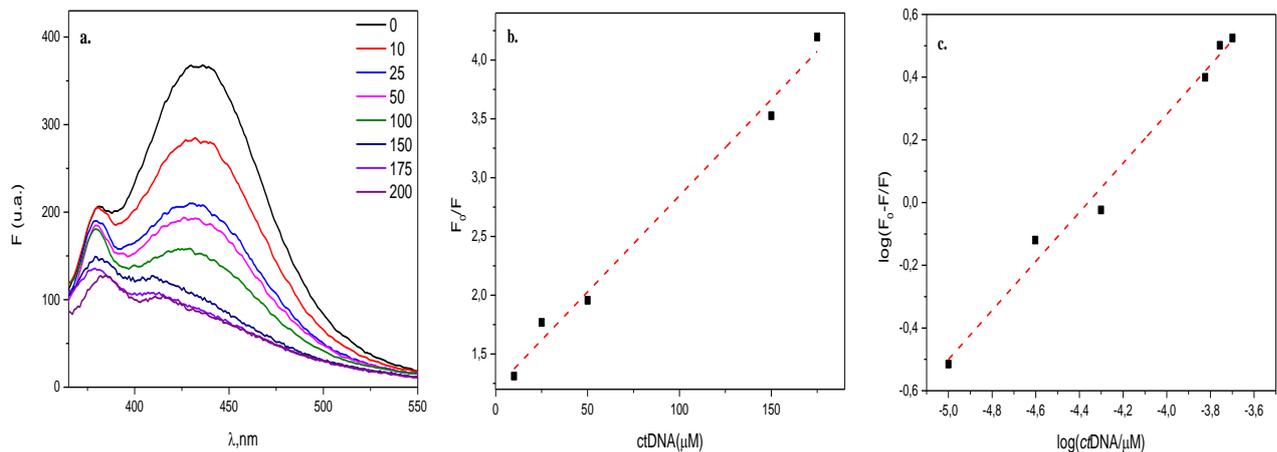
Múltiplos mecanismos de ação são reportados na literatura para agentes antitumorais derivados de quinonas, as antraciclina por exemplo, grupo ao qual a doxorubicina (**Figura 4**, página 22), faz parte, apresentam mecanismos envolvendo a interferência na síntese de DNA, que pode ser uma indicação de eventos iniciais envolvendo intercalação, inibição enzimática da topoisomerase II e estresse oxidativo (WELLINGTON, 2015). A mitoxantrona (**Figura 4**, página 22), uma antracenodiona usada para tratar o câncer de mama metastático, leucemia mielóide aguda e linfoma não-Hodgkin age a partir da inibição da topoisomerase II, intercalação no DNA e instiga a reticulação do DNA e a quebra do mesmo, e também interfere com o ácido ribonucleico (RNA) (CRESPI, et al., 1983). Neste contexto, torna-se evidente, que o mecanismo de ação das naftoquinonas aqui exploradas, também podem ocorrer de diversas formas, e o estudo de interação com *ct*DNA torna-se uma forma de averiguar alguns desses mecanismos (ALI; BHATTACHARYA, 2014).

Como pôde ser observado nos resultados descritos acima, todos os compostos apresentaram atividade antiproliferativa, alguns com  $IG_{50}$  próximos ao da doxorrubicina, sendo ativos frente a todas as linhagens de células tumorais testadas, porém, em decorrência do fator seletividade, decidiu-se realizar a avaliação da interação *ctDNA*-ligante apenas para 3 compostos. Como critério de seleção, utilizou-se o método de escolha de derivados do lapachol (**1**) e seu isômero cíclico  $\beta$ -lapachona (**2**) por serem advindos de extração de fonte natural, para isso, selecionou-se o mais ativo (composto **6**), intermediário (composto **4**) e menos ativo (composto **5**), para assim determinar os possíveis fatores que venham a influenciar em tais propriedades.

### 5.6.1 Avaliação da interação *ctDNA*-naftoquinonas por fluorescência molecular

Nos estudos utilizando fluorescência molecular foi observado que todos os compostos avaliados apresentaram emissão de fluorescência, estando essa entre 420-475 nm quando excitados entre 336-360 nm. Entretanto, somente o composto **5** apresentou uma intensidade de fluorescência plausível de ser expressa a partir destes estudos, bem como uma tendência ao ser adicionado quantidades crescentes de *ctDNA*. Sendo assim, em virtude desta característica espectroscópica, apenas o derivado **5** foi titulado com *ctDNA* (**Figura 21**) e esse servirá como modelo para avaliar os parâmetros de ligação com *ctDNA* e assim comparar com os outros dois compostos, uma vez que tais moléculas possuem estruturas químicas semelhantes.

**Figura 21.** Avaliação da interação *ctDNA*-ligante por fluorescência molecular. **a)** Espectro do composto **5** (10  $\mu\text{M}$ ) com adições crescentes de *ctDNA*; **b)** Curva para cálculo da constante Stern-Volmer,  $K_{SV}$ , (processo de *quenching*); **c)** Curva logarítmica para cálculo da constante de ligação ( $K_b$ ) e  $n$  do complexo *ctDNA*-composto. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.

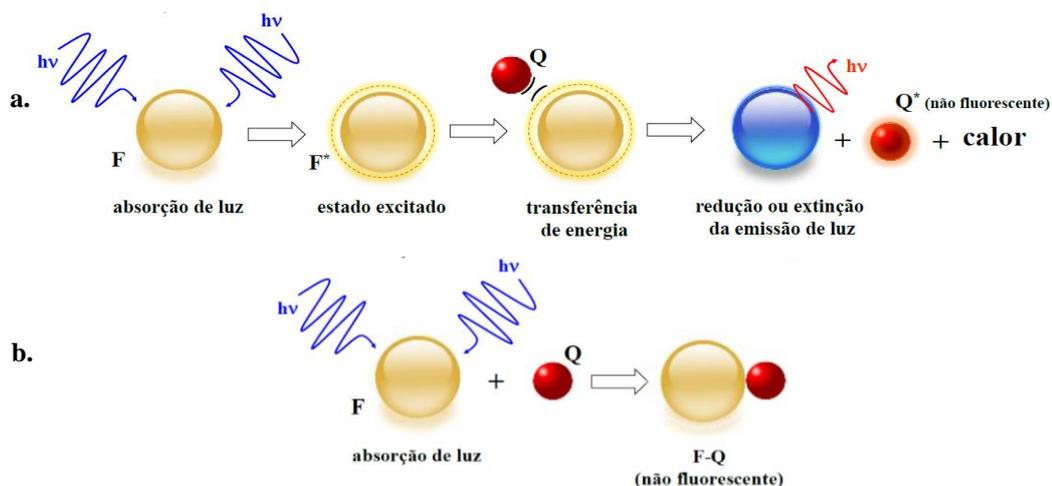


**Fonte:** Autor, 2019.

Como pode ser observado na **Figura 21a** acima, ao se adicionar uma quantidade crescente de *ctDNA* ao sistema, ocorreu redução gradual da intensidade de fluorescência intrínseca do composto **5**, o que caracteriza o mecanismo de *quenching*, que é o processo pelo qual uma espécie, neste caso o *ctDNA*, fornece uma via alternativa para o fluoróforo (composto **5**), retornar do estado excitado ao estado fundamental, ou seja, ocorre a supressão do sinal de fluorescência de um fluoróforo por uma molécula desativadora (*quencher*) (AFRIN et al., 2017). O processo de supressão de fluorescência pode ocorrer por dois processos distintos, o dinâmico ou o estático (GUAN, et al., 2006; QAIS, et al., 2017).

No processo de *quenching* dinâmico o fluoróforo no estado excitado entra em contato com a espécie *quencher*, neste caso o DNA, durante a existência do estado excitado, ocorrendo choque entre ambos, resultando na desativação radioativa do fluoróforo. Após a colisão, ocorre transferência de energia do fluoróforo no estado excitado para a espécie *quencher*, levando assim a uma diminuição do sinal de fluorescência (SILVA, 2016). Por outro lado, no *quenching* estático, o fluoróforo no estado excitado entra em contato com o *quencher*, induzindo à formação de um complexo não-fluorescente (F-Q) no estado fundamental, ocasionando na desativação radioativa do fluoróforo, liberação de calor e consequentemente redução no sinal analítico (MOLINA-BOLÍVAR, et al., 2014) (**Figura 22**).

**Figura 22.** Representação do processo de *quenching* a) dinâmico b) estático.



**Fonte:** SILVA, 2016.

A partir da titulação espectrofotométrica (**Figura 21a**), pôde-se notar que o mecanismo de *quenching* ocorreu em função da diminuição da concentração livre do composto **5**, indicando qualitativamente que o composto apresenta interação com a macromolécula por meio da formação do complexo supramolecular não fluorescente naftoquinona-*ctDNA* (SHI, et al., 2015).

A fim de expressar as interações entre o composto **5** e o *ctDNA* quantitativamente, o processo de supressão da intensidade de fluorescência (*quenching*) foi quantificado a partir da equação de Stern-Volmer (**Equação 2**), a qual indica a sensibilidade dos ligantes frente a sua interação com o DNA, em função do sinal analítico diminuir na presença de um agente supressor (QAIS, et al., 2017). Sendo assim, o pico de emissão máxima de fluorescência do derivado **5**, na ausência e presença de *ctDNA* ( $F_0/F$ ) vs concentração de *ctDNA* [Q] foi plotado usando a **equação 2**, o qual está apresentado na **Figura 21b**.

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_q[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{Equação (2)}$$

Onde,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do *ctDNA*, respectivamente. [Q] é a concentração de *ctDNA* (que atua como quencher) e  $K_{sv}$  como citado anteriormente é a constante de Stern-Volmer.

O  $K_{sv}$  foi obtido a partir do coeficiente angular do gráfico da **Figura 21b** citado anteriormente, o qual obteve-se um valor de  $1,64 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . O gráfico de Stern-Volmer apenas confirma o processo de *quenching*, mas não o seu tipo, ou seja, se ocorre o *quenching* estático ou dinâmico (KALAIIVANI, et al. 2013). Neste sentido, para confirmar o processo de

*quenching*, a constante da taxa de extinção biomolecular ( $K_q$ ) foi calculada usando a **equação 3** abaixo:

$$K_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad \text{Equação (3)}$$

Na qual,  $K_{SV}$  e  $\tau_0$  são a constante de Stern-Volmer e o tempo de vida média ( $10^{-8}$  s) do fluoróforo (composto **5**) na ausência do extintor de fluorescência, respectivamente (DIMIZA et al., 2011; QAIS, et al., 2017; ALI; AL-LOHEDAN, 2018). A constante da taxa de difusão limitante de biomoléculas é definida por ter o valor de  $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . O valor da constante da taxa de extinção biomolecular para o composto **5** ( $1,64 \times 10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) foi superior a constante de difusão limitante ( $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), o que é um indício que o *quenching* dominante no sistema supramolecular formado é estático (**Figura 22b**), enquanto que valores inferiores ao da constante se configuraria em um *quenching* dinâmico (THOMAS; SUKUMARAN; SUDARSANAKUMAR, 2019; REHMAN et al., 2017).

Uma outra forma de avaliar o mecanismo de *quenching* poderia ser por meio de titulações espectrofluorimétricas em diferentes temperaturas, onde mantém-se constante a concentração da molécula *quencher* (DNA) e varia a do ligante. Caso ocorra o *quenching* dinâmico, o valor de  $K_{SV}$ , será diretamente proporcional à temperatura (T), uma vez que o número de colisões aumenta quando há o aumento da temperatura. Por outro lado, no *quenching* estático, o aumento da temperatura ocasionaria a redução do valor de  $K_{SV}$ , ou seja, essas variáveis serão inversamente proporcionais, pois com o aumento da temperatura o complexo formado tende a desestabilizar, reduzindo assim o valor da constante (MOLINA-BOLÍVAR et al., 2014; PEREIRA, 2018). Vale ressaltar que esse estudo não foi realizado neste trabalho, uma vez que, apenas o composto **5** apresentou intensidade de fluorescência passível de ser analisada por esse estudo, como descrito anteriormente. Deste modo, a avaliação do *quenching* de modo quantitativo a partir de  $K_q$ , bem como, a partir de estudos de UV-Vis, que serão apresentados subsequente são o suficiente para confirmar tal mecanismo de supressão de fluorescência.

Além disso, a partir da espectroscopia de fluorescência molecular também foi possível calcular a magnitude de interação e a estequiometria do complexo supramolecular formado ( $n$ ) para o composto **5**, os quais foram calculados a partir da linearização da **equação 4**, sendo esta expressa pela curva  $\log[(F_0 - F)/F]$  vs  $\log[ctDNA]$  (**Figura 21c**).

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação (4)}$$

onde  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do *quencher*,  $n$  é o número de sítios,  $K_b$  a constante de ligação e  $[Q]$  é a concentração do *quencher*. Os valores de  $n$  e  $K_b$  foram obtidos a partir do coeficiente angular e linear, respectivamente, do gráfico de  $\log(\Delta F/F)$  versus  $\log [Q]$  (QAIS, et al. 2017; KALAIVANI, et al. 2013).

Sendo assim, pôde-se notar um valor de  $K_b$  ( $1,38 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ) moderado. Adicionalmente, pôde-se notar que para o composto avaliado o número de sítios ( $n$ ) ficou em aproximadamente 1 (0,78), indicando a razão estequiométrica 1:1 ligante-*ctDNA*.

A partir desses resultados pode-se inferir a formação do complexo macromolécula-ligante entre os compostos **4** e **6** também, uma vez que, como dito anteriormente ambos os compostos possuem estrutura molecular bem semelhantes. Além disso, a partir dos dados do composto **5** e dos resultados de  $GI_{50}$  da atividade antiproliferativa desse composto (**Tabela 5**), foi possível realizar algumas inferências.

Como pode ser notado na **Tabela 5**, o composto **5** apresentou os resultados de atividade antiproliferativa frente as linhagens celulares tumorais menos satisfatórias, quando se compara aos derivados **4** e **6**. Levando em consideração que o  $K_b$  do composto **5** é  $1,38 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ , pode-se notar uma ligação moderada ao *ctDNA*, uma vez que esse parâmetro ficou na faixa de  $10^3$  a  $10^6$  descrita na literatura como a representação de uma interação forte entre composto e DNA (WU, et al., 2007).

Sendo assim, em virtude de apenas o composto **5** apresentar emissão de fluorescência, avaliou-se de forma direta o modo de ligação dos compostos com *ctDNA* a partir de sondas, uma vez que, ensaios deste tipo são necessários para expressar com confiabilidade o modo de ligação DNA-Composto.

Sondas são compostos que possuem o modo de ligação com DNA bem estabelecido e são utilizadas para determinar o modo de ligação de outras moléculas (REHMAN et al., 2015). Como exemplo do mecanismo que ocorre no estudo de competição a partir de sondas, podemos citar o corante brometo de etídio (BE) um intercalante clássico (WILSON, et al. 1993), o qual possui estrutura planar e quando se liga ao DNA ocasiona um elevado sinal de fluorescência. Se, portanto, for adicionado ao sistema um composto, cujo modo de ligação é também intercalação, ele competirá com o BE o que ocasionará no deslocamento do mesmo e, conseqüentemente causará redução considerável do sinal analítico. Do contrário, nenhuma mudança será observada (TU et al., 2005; REHMAN et al., 2015). O grau da extinção de fluorescência do sistema BE-DNA pode ser utilizado para determinar a extensão da intercalação entre a molécula e a macromolécula (REHMAN et al., 2015). De forma

semelhante, outras sondas são usadas para avaliar os demais modos de ligação. A exemplo a Hoechst 33258 e DAPI, as quais ligam-se via *groove* ao DNA (WILSON, et al. 1993).

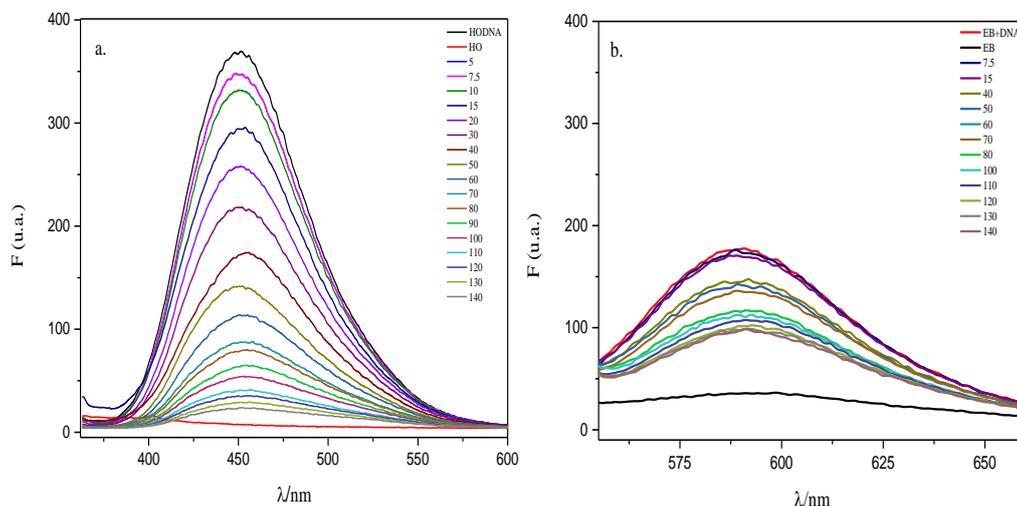
### 5.6.2 Modo de ligação *ctDNA*-ligante

O modo de ligação *ctDNA*-ligante foi avaliado a partir de duas sondas com modo de ligação prontamente estabelecidos na literatura, o hoechst (HO) e o brometo de etídio (BE), um *groove* e um intercalante, respectivamente (HUSAIN, et al. 2017; HUAN, et al. 2015; PRIETO, et al. 2014; GUAN, et al. 2006). O BE é um fluoróforo comum que apresenta baixa intensidade de fluorescência em soluções aquosas, mas a intercalação do seu anel fenetiridínico planar entre os pares de bases adjacentes da dupla hélice do DNA faz com que esse exiba uma intensa emissão de fluorescência (HUAN, et al. 2015). Já o HO, não tão diferente do BE, em sua forma livre apresenta baixa intensidade de fluorescência, mas ao se ligar aos pares de base AT do sulco menor do B-DNA tem sua intensidade de fluorescência maximizada (MIRZAEI-KALAR, 2018; GUAN, et al. 2006).

Neste sentido, a avaliação do modo de ligação foi realizada adicionando concentrações crescente dos derivados naftoquinônicos de **4** a **6** ao sistema contendo *ctDNA*-sonda em concentrações fixas (**Figura 23**). O intuito foi averiguar se os ligantes em estudo seriam capazes de deslocar a sonda do *ctDNA*, comprovando assim ser um agente *groove* ou intercalante. Para este fim, o monitoramento da emissão de fluorescência foi no comprimento de onda do sinal do complexo *ctDNA*-sonda, sendo esses respectivamente: HO-*ctDNA* ( $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$  e  $\lambda_{exc} = 353 \text{ nm}$ ) e BE-*ctDNA* ( $\lambda_{em} = 596 \text{ nm}$  e  $\lambda_{exc} = 525$ ), diferente do estudo anterior, o qual o monitoramento foi realizado no sinal do composto.

Nas figuras abaixo estão descritos o estudo de competição a partir de sondas para o composto **4**, vale ressaltar o **5** e o **6** apresentaram comportamentos semelhantes ao observado nos espectros.

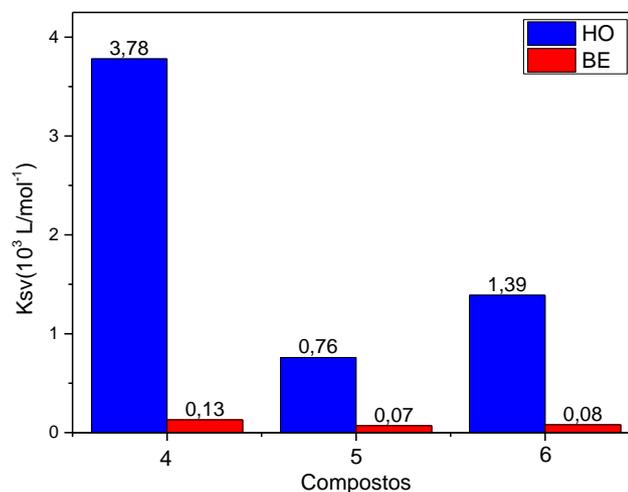
**Figura 23.** Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema HO-*ctDNA* (a) e BE-*ctDNA*. a 30 °C (b) por competição com o composto 4. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



**Fonte:** Autor, 2019.

A partir dos ensaios de competição com sondas, pôde-se notar que a medida que se mantinha fixa a concentração do *ctDNA*, da sonda e adicionava-se quantidades crescentes dos compostos, houve o decréscimo do sinal de intensidade de fluorescência em ambos os ensaios (HO e BE), o que é um indício que essas moléculas conseguem interagir com o DNA via os dois mecanismos de ligação (MIRZAEI-KALAR, 2018; WILSON, et al. 1993). Sendo assim, para determinar o mecanismo de ligação preferencial calculou-se a constante de Stern-Volmer (K<sub>sv</sub>). A partir do cálculo de K<sub>sv</sub> pôde-se notar que o mecanismo preferencial de ligação dos derivados naftoquinônicos em questão se dá via *groove*. A **Figura 24** abaixo apresenta o K<sub>sv</sub> normalizado das moléculas para os dois mecanismos de ligação, o qual fica evidente que o modo de ligação preferencial, de fato ocorre via *groove*, uma vez que a constante de Stern-Volmer foi bem maior no ensaio com o HO. Vale ressaltar que o K<sub>sv</sub> e os parâmetros de ligação (**Tabela 9 e 10 em anexo**, na página 90) aqui calculados são de forma indireta, sendo assim não seria interessante realizar comparação desses últimos com a atividade antiproliferativa, uma vez que estaríamos levando em consideração também os parâmetros de um sistema híbrido com a sonda.

**Figura 24.** Constante de Stern-Volmer normalizada a  $10^4$  para os dois sistemas sonda-*ct*DNA (HO e BE) para os compostos de **4** a **6**. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



**Fonte:** Autor, 2019.

Geralmente, moléculas pequenas, como fármacos e corantes orgânicos, ligam-se ao DNA em modo de ligação envolvendo o sulco menor devido ao seu pequeno tamanho, enquanto as macromoléculas, como proteínas, ligam-se ao DNA no modo de ligação ao sulco maior. Moléculas que se ligam ao sulco menor com *ct*DNA adotam uma forma curva característica *isohelical* com o sulco alvo e se ligam na região rica em pares de bases A-T onde é mais estreita que a região rica em pares de bases C-G. Isso ocorre porque há contatos hidrofóbicos favoráveis entre os átomos de hidrogênio do DNA e o anel aromático das moléculas (SHAHABAD, MAGHSUDI, 2013; MIRZAEI-KALAR, 2018), fato esse que ocorre com os derivados naftoquinônicos de **4** a **6**. Deste modo, os resultados obtidos corroboram com os dados descritos na literatura com o *ct*DNA através da ligação ao sulco menor após a substituição do Hoechst. Além disso, como pode ser notado na **Figura 9** os compostos de **4** a **6** possuem em suas estruturas um grupo planar ligado por um grupo espaçador munido de grupos capazes de formar ligação de hidrogênio, o que é descrito um dos pontos chave em moléculas que se ligam nas ranhuras do DNA via ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas (MIRZAEI-KALAR, 2018).

Quanto a comparação do modo de ligação desses compostos, com naftoquinonas de modo de ligação com DNA já estabelecidos e descritas na literatura, não foi possível encontrar nenhum trabalho que faça tal relato, porém, quando se compara com outros compostos da classe das quinonas, a doxorubicina e a mitoxatrone, por exemplo, uma antraciclina e uma antracenodiona, pode se notar uma discordância. Os dois derivados

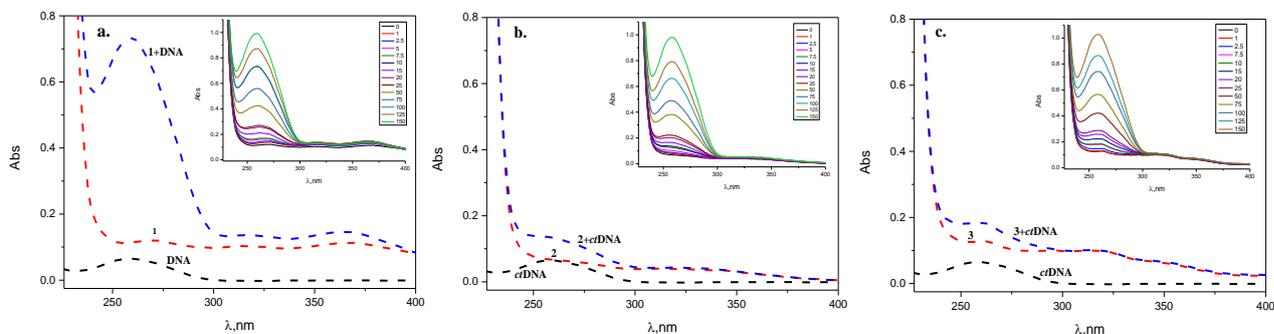
quinônicos citados, são reportadas por serem intercalantes (WELLINGTON, 2015; CRESPI, et al., 1986), enquanto os compostos de **4** a **6** demonstraram interagir nos sulcos do DNA, ou seja, via *groove*, mas como explanado anteriormente, os compostos aqui avaliados possuem um substituinte com átomos capazes de formar ligações de hidrogênio e um grupo espaçador, ideais em interações via *groove*, enquanto as quinonas, as quais são intercalantes, são formadas por grupos altamente rígidos, o que favorece a intercalação entre os pares de base do DNA (WILSON,1993). Porém, estudos posteriores como medidas de  $T_m$ , medidas de viscosidades, entre outras avaliações devem ser realizados para confirmar ainda mais tais premissas.

### 5.6.3 Estudos por UV-Vis (Mecanismo de *Quenching*)

A técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis pode ser utilizada para explorar alterações na estrutura do DNA, detectar a formação de complexos *ctDNA*-ligante, bem como o mecanismo de *quenching* (HUSAIN, et al. 2017; TABASSUM, et al. 2012). Neste sentido, realizou-se estudos espectrométricos de UV-Vis para observar a formação dos complexos *ctDNA*-naftoquinonas, bem como a formação do mecanismo de *quenching*.

A avaliação do tipo de *quenching* foi realizada através dos espectros de absorção do *ctDNA*, do composto livre e do complexo formado. Pôde-se notar que a medida que se adicionou quantidades crescentes de *ctDNA* à solução dos compostos naftoquinônicos, ocorreu um aumento na absorvância, isto é, um efeito hipercrômico (**Figura 25**), o que indicou a interação da molécula com o *ctDNA*, formando assim o complexo e corroborando com os resultados de fluorescência molecular.

**Figura 25.** Espectro de absorção UV do *ctDNA* e dos compostos **4** (a), **5** (b) e **6** (c) (10  $\mu\text{M}$ ) na ausência e na presença de *ctDNA* (10  $\mu\text{M}$ ). Inserção: Os gráficos denotam o efeito hipercrômico causado com o aumento gradual da concentração de *ctDNA* (1-150  $\mu\text{M}$ ) aos compostos de **4** a **6**.



**Fonte:** Autor, 2019

Normalmente, a formação do complexo DNA com pequenas moléculas altera a magnitude da posição do pico de absorvância, o que está correlacionada com a força da interação (AFRIN, et al. 2017; THOMAS, SUKUMARAN, SUDARSANAKUMAR, 2019), fato perceptível nos espectros acima, nos quais com o aumento gradual da concentração de *ctDNA*, este teve sua intensidade acrescida. O efeito hipercrômico é uma característica espectral que indica variações estruturais na dupla hélice do *ctDNA* quando complexadas aos compostos de **4** a **6** (HUSAIN, et al. 2017; SIRAJUDDIN, ALI, BADSHAH, 2013) e, ao envolvimento das interações não covalentes entre os derivados de **4** a **6** e o *ctDNA* (REHMAN, et al 2015b).

As alterações espectrais podem ser observadas nos valores de absorvância da mistura naftoquinona-*ctDNA* ( $A_{\text{complexo}}$ ), e a soma dos valores das absorvâncias da naftoquinona e *ctDNA* ( $A_{4-6} + A_{ctDNA} = \text{diferente de } 0$ ) na **Tabela 6** abaixo. Estes resultados são um indicativo de que o mecanismo de *quenching* dominante no sistema foi estático, pois  $\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{composto}} + A_{ctDNA})$  foi diferente de zero o que indica que ocorreu alteração no estado fundamental em função da formação do complexo naftoquinona-*ctDNA*. Caso o mecanismo de *quenching* fosse dinâmico, não seriam esperadas variações no espectro de UV-Vis do complexo ( $A_{\text{complexo}} = A_{\text{composto}} + A_{ctDNA}$ ), visto que o *quenching* dinâmico afeta somente o estado excitado, e não o estado fundamental (WU, et al., 2011; SAHOO, GHOSH, DASGUPTA, 2009).

**Tabela 6.** Absorvância dos derivados naftoquinônicos nitrogenados avaliados de **4** a **6** (10  $\mu\text{M}$ ), *ctDNA* (10  $\mu\text{M}$ ) e composto-*ctDNA* (10  $\mu\text{M}$ ) no comprimento de onda de máxima absorção dos compostos. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.

COMPOSTO	$\lambda$ , nm	$A_{\text{Composto}}$	$A_{ctDNA}$	$A_{\text{Complexo}}$	$\Delta A$
<b>4</b>	362	0,11678	- 0,00104	0,72508	0,60934
<b>5</b>	322	0,039331	- 0,00177	0,04231	0,00477
<b>6</b>	312	0,10095	- 0,00141	0,10113	0,00159

**Fonte:** Autor, 2019.

Além disso, não houve desvio espectral significativo nos  $\lambda_{\text{máx}}$  dos compostos de **4** a **6** com a adição gradual de *ctDNA*, indicando uma variação estrutural desprezível do ligante após sua complexação com o *ctDNA*, apontando para a possibilidade de ligação ao sulco do DNA, ou seja, uma ligação do tipo *groove* (HARIS, et al., 2015; THOMAS; SUKUMARAN; SUDARSANAKUMAR, 2019), o que corrobora com os estudos competição com as sondas.

Assim, acredita-se que a citotoxicidade dos derivados *N*-acilidrazona, oxima e *N*-acilidrazina naftoquinônicos aqui avaliados esteja associada a capacidade de se ligar ao DNA, resultando no comprometimento de sua função, que é seguida pela inibição dos processos de replicação e transcrição e, eventualmente, morte celular.

## 6. CONCLUSÃO

Em suma, o presente trabalho possibilitou avaliar o FPS-UVB, a capacidade antioxidante, as propriedades ADME *in silico*, a atividade antiproliferativa, bem como o processo de interação com o *ctDNA* dos derivados naftoquinônicos de **1** a **8**. Durante os estudos, as técnicas espectroscópicas UV-Vis e fluorescência molecular, bem como o método *in silico*, demonstraram-se eficientes, uma vez que, foi possível determinar todos os parâmetros necessários para avaliar cada atividade de forma eficiente.

Os derivados naftoquinônicos de **1** a **8** mostraram um FPS-UVB acentuado, nos quais os compostos de **4** a **8** apresentaram os melhores resultados nas duas concentrações avaliadas, tendo valores  $\geq 15$  na maior concentração. Em todos os compostos, esse FPS está associado às transições eletrônicas  $n-\pi^*$  e  $\pi-\pi^*$  presentes nos mesmos.

Nos estudos da capacidade antioxidante, pôde-se notar que os compostos avaliados apresentaram atividade antioxidante frente aos dois métodos avaliados (DPPH $\cdot$  e ABTS $\cdot^+$ ), sendo de quatro a cinco vezes mais ativos frente ao sequestro do radical ABTS $\cdot^+$ , o que indica que tais compostos possuem um maior caráter hidrofílico.

As propriedades ADME *in silico* dos compostos de **1** a **8** demonstram-se adequadas em relação às regras escolhidas para as análises das mesmas, tendo os compostos avaliados uma alta atividade biológica.

Os compostos de **1** a **8**, demonstraram-se ativos como agentes anticancerígenos frente a 9 linhagens celulares tumorais humanas avaliadas, com GI<sub>50</sub> inferior a 200  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto os compostos não apresentaram seletividade, a partir dessa inferência escolheu-se apenas 3 compostos para realizar o estudo de interação *ctDNA*-ligante. Os estudos de interação *ctDNA*-naftoquinona, demonstraram que os compostos avaliados apresentaram interação significativa com o modelo de DNA empregado, formando um complexo supramolecular não fluorescente, o que caracteriza o mecanismo de *quenching* estático. Além disso, a partir do ensaio de competição com hoechst e brometo de etídio, foi possível inferir que os compostos avaliados interagem com o *ctDNA* preferencialmente via *groove*.

Por fim, a partir dos resultados obtidos é possível inferir que os derivados naftoquinônicos avaliados possuem promissoras atividades biológicas propícias a serem exploradas em possíveis cosméticos, fármacos, entre outros. Além disso, os resultados possibilitam estratégias para o desenvolvimento de novos projetos de metodologia sintética e de química medicinal.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar estudos eletroquímicos para determinar qual o mecanismo de ação antioxidante, bem como, o grupo que mais contribui com tal atividade;
- Determinar o modo de ligação com *ct*DNA dos compostos avaliados via ensaios de T<sub>m</sub> e viscosidade;
- Sintetizar moléculas incorporando heterocíclicos afim de potencializar a seletividade;
- Avaliar a interação/inibição dos compostos com maior FPS-UVB com tirosinase, uma vez que essa enzima está associada aos processos de câncer de pele e sua inibição é reportada como um fator direto de um bom protetor solar;
- Realizar estudos de *docking* molecular dos compostos selecionados na perspectiva anterior com a tirosinase, com o propósito de confirmar os resultados experimentais;
- Avaliar a fotoestabilidade dos compostos avaliados nesse trabalho;
- Avaliar a toxicidade dos compostos frente a uma linhagem celular mais específica para fotoprotetores;
- Avaliar os compostos em humanos (*in vivo*);
- Desenvolvimento de uma possível formulação cosmética/dermatológica.

## 8. REFERÊNCIAS

AFRIN, S. et al. Molecular spectroscopic and thermodynamic studies on the interaction of anti-platelet drug ticlopidine with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 186. 66–75. 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Disponível em < <https://cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/bef6e-RDC-30.pdf> > acesso em 19 de dezembro de 2018.

ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 22. 16. 4506-4521. 2014.

ALI, M. S.; AL-LOHEDAN, H. A. Spectroscopic and computational evaluation on the binding of safranal with human serum albumin: Role of inner filter effect in fluorescence spectral correction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 203. 434–442. 2018.

ALMEIDA, V. L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. 28. 118-129. 2005.

ARAÚJO, C. R. M.; et al. Síntese e determinação in vitro do FPS-UVB de oximas derivadas do lapachol. **Rev. Virtual de Química**. 6. 6. 1702-1712. 2014.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 12. 1. 57-59. 2002.

ANTONINI, I. et al. Synthesis of (Dialkylamino)alkyl-Disubstituted Pyrimido[5,6,1-de]acridines, a Novel Group of Anticancer Agents Active on a Multidrug Resistant Cell Line. **J. Med. Chem.** 38. 17 3282-3286. 1995.

AUSUBEL, F.M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons Inc. New York. 2002.

BARBOSA, T. P.; NETO, H. D. Preparação de derivados do Lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de química orgânica experimental. **Química Nova**. 36. 2. 331-334. 2013.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercaladores. **Revista Virtual Química**.7. 1998-2016. 2015.

BARREIRO, L. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BARONE, G. et al. DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships. **Coordination Chemistry Reviews**. 257. 2848–2862. 2013.

BAO, N. et al. Highly Efficient Synthesis and Structure–Activity Relationship of a Small Library of Substituted 1,4-Naphthoquinones. **Eur. J. Org. Chem**. 2254–2258. 2018.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. 3ª ed. **Artmed**. 2014

BAS, H. et al. Synthesis, DNA interaction, topoisomerase I, II inhibitory and cytotoxic effects of water-soluble silicon (IV) phthalocyanine and naphthalocyanines bearing 1-acetylpiperazine units. **Dyes and Pigments**. 160. 136-144. 2019.

CARDOSO, S. H. et al. Synthesis of newly functionalized 1,4-naphthoquinone derivatives and their effects on wound healing in alloxan-induced diabetic mice. **Chemico-biological Interactions**. 291. 55-64. 2018.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R.J. **Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms**. University of Virginia. Charlottesville, Virginia. 15 ed. 2000 (CONFIRMAR DATA).

CARROLL, B. F. I; MILLER, W. H; MECK, R. Thiosemicarbazone and amidinohydrazone derivatives of some 1, 4-naphthoquinones. **Organic Chemistry**, U.S.A, 1970.

CHEN, Yi-yong; XUE, Yi-ting. Optimization of microwave assisted extraction, chemical characterization and antitumor activities of polysaccharides from porphyra haitanensis. **Carbohydrate Polymers**. 206. 179–186. 2019.

COSTA, S. C.C. et al. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 25. 413–418. 2015.

CRESPI, M. D. et al. Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 136. 2. 29. 521-528. 1986.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**. 7, 42717. 2017.

DENOVIX, Inc. DS-11. **Five Ways to Improve the Accuracy of 1  $\mu$ L UV-Vis Spectrophotometer**. Wilmington, USA. 2018.

DING, X. et al. Study of the interaction of broad-spectrum antimicrobial drug sitafloxacin with human serum albumin using spectroscopic methods, molecular docking, and molecular dynamics simulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 160. 397–403. 2018.

DUVAL, P. A., et al. Caquexia em Pacientes Oncológicos Internados em um Programa de Internação Domiciliar Interdisciplinar. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 56. 207-212. 2010.

ESPINOSA-BUSTOS, C. et al. Unveiling interactions between DNA and cytotoxic 2-arylpiperidinyl-1,4-naphthoquinone derivatives: A combined electrochemical and computational study. **Arabian Journal of Chemistry**. 2018.

FAN, et al. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. **Carbohydrate Polymers**. 88. 1313–1318. 2012.

FDA. Sunscreen: How to Help Protect Your Skin from the Sun. **Food and drug** (2017). Disponível em < <https://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/UnderstandingOver-the-CounterMedicines/ucm239463.htm> > Acessado em 19 de dezembro de 2018.

FERREIRA, V. F. Aprendendo sobre os conceitos de ácido e base. **Qnesc**. 4. 35. 1996.

FLOR, F.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M.A. Protetores Solares. **Química Nova**. 1. 30. 153-158. 2007.

GACH, K. et al. Anticancer properties of new synthetic hybrid molecules combining naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione or benzo[f]indole-4,9-dione motif with phosphonate subunit. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 120. 51-63. 2016.

GARCÍA, B. et al. Change of the Binding Mode of the DNA/Proflavine System Induced by Ethanol. **J. Phys. Chem. B.** 114. 25. 8555–8564. 2010.

GARCÍA, B. et al. Solvent Effects on the Thermodynamics and Kinetics of Coralyne Self-Aggregation. **J. Phys. Chem. B.** 113. 188–196. 2009.

GARCÍA-RAMOS, et al. Metal-Based drug-DNA interactions. **J. Mex. Chem. Soc.** 57. 3. 245-259. 2013.

GOUDA, M. A, et al. Synthesis and Antioxidant Activity of Novel Series of Naphthoquinone Derivatives Attached to Benzothiophene Moiety. **Med Chem.** 3. 2. 2013.

GUAN, Y. et al. Determination of nucleic acids based on the fluorescence quenching of Hoechst 33258 at pH 4.5. **Analytica Chimica Acta.** 570. 21–28. 2006.

GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Quim. Nova.** 32. 3. 717-721. 2009.

HARIS, P. et al., Energetics, Thermodynamics, and Molecular Recognition of Piperine with DNA. **J. Chem. Inf. Modelo.** 55. 12. 2644-2656. 2015.

HARISHKUMAR, H. N. et al. Synthesis and fluorescence study of phenylcoumarin/cyano-phenylbenzocoumarin-3-carboxylates. **Org. Commun.** 5.4.196-208. 2012.

HONG, Y. et al. Identification of Novel ROS Inducers: Quinone Derivatives Tethered to Long Hydrocarbon Chains. **J. Med. Chem.** 58. 9. 3739–3750. 2015.

HOSU, A.; CRISTEA, V.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry.** 150. 113-118. 2014.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, S., et al. Thermodynamic investigation of the interaction between the [( $\eta$  6-p-cymene) Ru (benzaldehyde-N 4-phenylthiosemicarbazone) Cl] Cl anticancer drug and ct-DNA: multispectroscopic and electrochemical studies. **RSC Adv.**, 5. 42889-42902. 2015.

HUSAIN, M. et al. Interaction of indomethacin with calf thymus DNA: a multi-spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling approach. **Med. Chem. Commun.** 8. 1283-1296. 2017.

IONITA, P. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species? **Chem. Pap.** 59. 1. 11-16. 2005.

IVRY, G. B. et al. Role of Sun Exposure in Melanoma. **Dermatologic Surgery.** 32, 481. 2006.

JAGER, E.; JAGER, D.; KNUTH, A. Clinical cancer vaccine trials. **Current Opinion in Immunology.** 14. 2. 178-182. 2002.

JABBARIA, M.; GHARIB, F. Solvent dependence on antioxidant activity of some water-insoluble flavonoids and their cerium(IV) complexes. **Journal of Molecular Liquids.** 168. 36-41. 2012.

JORDÃO, A. K. et al. Lawsone in organic synthesis **RSC Advances.** 83. 5. 67909-67943. 2015.

KALAIVANI, P. et al. Synthesis, spectral, X-ray crystallography, electrochemistry, DNA/protein binding and radical scavenging activity of new palladium(II) complexes containing triphenylarsine. **Inorganica Chimica Acta.** 405. 415-426. 2013.

KARADAG, A., OZEELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods,** 2. 41-60. 2009.

KAMO, S.; KURAMOCHI, K.; TSUBAKI, K. Recent topics in total syntheses of natural dimeric naphthoquinone derivatives. **Tetrahedron Letters.** 59. 224-230. 2018.

KHAN, G. S., et al. Chemistry of DNA minor groove binding agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.** 115. 105-118. 2012.

KHAJEH, M. A. et al. 2018. Spectroscopic profiling and computational study of the binding of tschimGINE: A natural monoterpene derivative, with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** 192. 384-392. 2018.

KOMEDA, S. et al. A Third Mode of DNA Binding: Phosphate Clamps by a Polynuclear Platinum Complex. **J. Am. Chem. Soc.** 128. 50. 16092-16103. 2006.

LEE, J. M. et al. Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). **Food Chemistry**. 103. 662–669. 2007.

LERMAN, L. S. Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines. **J. Mol Biol**. 3. 18-30. 1961.

LITIVACK JÚNIOR, J. T. Síntese de novos adutos de lapachol com aminas alifáticas. Dissertação de mestrado. UFRPE. 2009.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 46. 3–26. 2001.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**. 613. 1-19. 2008.

MARKY, L. A. et al. Thermodynamics of Drug-DNA Interactions. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**. 1. 0739-1102. 1983.

MALLAVADHAN, U. V. et al. Synthesis and anticancer activity of some novel 5,6-fused hybrids of juglone based 1,4-naphthoquinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 83. 84-91. 2014.

MARTEAU, C. et al. Dramatic solvent effect on the synergy between  $\alpha$ -tocopherol and BHT. **Food chemistry**. 160. 190-195. 2014.

MARTINEZ, Sabrina T.; SILVA, Bárbara V.; PINTO, Angelo C.. Adição de Anilinas à naftoquinona em água e em Fase sólida. **Química Nova**, v. 35, n.4, p. 858-860, 2012.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et. al. Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on Trypanosoma Cruzi: identification of target organelles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 56. 1034-1041. 2005.

Ministério da Saúde, BRASIL. **Formulário Terapêutico Nacional 2010: Rename 2010**. 2. Brasília. 2010. Disponível em: <[http://www.uberlandia.mg.gov.br/uploads/cms\\_b\\_arquivos /14514.pdf](http://www.uberlandia.mg.gov.br/uploads/cms_b_arquivos /14514.pdf)>, acesso em 22 de janeiro de 2019.

MIRZAEI-KALAR, Z. In vitro binding interaction of atorvastatin with calf thymus DNA: multispectroscopic, gel electrophoresis and molecular docking studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 161. 101–109. 2018.

MOLINA-BOLIVAR, J. A., et al. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. **Journal of Luminescence**, 156. 141–149. 2014.

MOSMANN, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Immunol Methods**. 65. 55-63. 1983.

NAKAMOTO, K.; TSUBOI, M.; STRAHAN, G. D. **Drug–DNA Interactions: Structures and Spectra**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

NASCIMENTO, L. F.; SANTOS, E. P.; AGUIAR, A. P. Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, inovação e a importância da síntese orgânica. **Rev. Virtual de Química**. 6. 2. 190-223. 2013.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NI, Y.; WANG, Y.; KOKOT, S. Study of the interaction between 10-hydroxycamptothecine and DNA with the use of ethidium bromide dye as a fluorescence probe. **Sensors and Actuators B** .156. 290–297. 2011.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química nova**. 6. 25. 976-984. 2002.

OLIVEIRA, W. S. Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para avaliação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas e própolis vermelha de alagoas. **Dissertação de mestrado**. Maceió. 2016.

Organização Mundial de Saúde, cancer. 2018. Disponível em < <http://www.who.int/cancer/en/>> acessado em 8 de janeiro de 2019.

PANDIKA, M. Looking to nature for new sunscreens. **ACS Central Science**. 4. 788–790. 2018

PAVIA, D. L. et al. **Intrdução à Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2013.

PENSATO, et al.  $\gamma$ -Hydroxymethyl PNAs: Synthesis, interaction with DNA and inhibition of protein/DNA interactions. **Bioorganic Chemistry**. 38. 196–201. 2010.

PEREIRA, K. T. O. **Alcalóides  $\beta$ -carbolínicos: interação com DNA (calf thymus), proteína de soro bovino (BSA) e correlação com atividade biológica.** 2018. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2018.

PEREYRA, C. E. et al. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell International**. 19. 207. 2019.

POTTS, R. O; GUY, R. H. Predicting skin permeability. **Pharmaceutical Research**. 09. 5. 663–669. 1992.

PRAY, L. A. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. **Nature Education**. 1. 1. 2008. Disponível em:< <http://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397>> Acessado em: 07 de janeiro de 2018.

PRIETO, D., et al. A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green Histochem. **Cell Biol**. 3. 142. 335-345. 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53. 4290–4302. 2005.

QAIS, F.A. et al. Interaction of capsaicin with calf thymus DNA: a multi-spectroscopic and molecular modelling study. **Int. J. Biol. Macromol**. 97. 392-402. 2017.

RAMOS-PERALTA, L. et al. Naphthoquinone: Bioactivity and Green Synthesis. **Formatex Research Center**. 542-550. 2015.

RANI, K. P.R. et al. Synthesis, spectral characterization, molecular structure and pharmacological studies of N'-(1, 4-naphtho-quinone-2yl)isonicotinohydrazide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 135. 1156–1161. 2015.

REHMAN, S. U., et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia. 576. 49-60. 2015.

REHMAN, S. U. et al. Deciphering the interactions between chlorambucil and calf thymus DNA: a multi-spectroscopic and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 566. 7–14. 2015b.

RYVOLOVA, M. et al. Study of DNA–ellipticine interaction by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Electrophoresis**. 33. 1545–1549. 2012.

SACAU, E. P. et al. Inhibitory Effects of Lapachol Derivatives on Epstein-Barr Virus Activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 11. 4. 483-488. 2003.

SAHOO, B.K.; GHOSH, K.S.; DASGUPTA, S. Molecular interactions of isoxazolcurcumin with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies. **Biopolymers**. 91. 2. 108-119. 2009.

SANTOS, A. J. M.; MIRANDA, M. S.; SILVA, J. C. G. E. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. **water research**. 46. 3167-3176. 2012.

SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**. 41. 1. 110-115. 2018.

SCOTT, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 43. 2. 2007.

SAVARIZ, F.C., et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl)  $\beta$ -carboline and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil. 22. 6867–6875. 2014.

SAWADA, N. O., et al. Quality of life evaluation in cancer patients to submitted to chemotherapy. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. 43. 578-584. 2009.

SHAHABADI, N., MAGHSUDI, M. Gel electrophoresis and DNA interaction studies of the food colorant quinoline yellow. **Dyes and Pigments**. 96. 377-382. 2013.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry** 113. 1202–1205. 2009.

SHAMSI, M.; YADAV, S.; ARJMAND, F. Synthesis and characterization of new transition metal {Cu(II), Ni(II) and Co(II)} L-phenylalanine–DACH conjugate complexes: In vitro DNA binding, cleavage and molecular docking studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 136. 1–11. 2014.

SHI, J. H., et al. Binding interaction between sorafenib and calf thymus DNA: Spectroscopic methodology, viscosity measurement and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 36. 443–450. 2015.

SILVA, Marina de Magalhães. **Interação entre compostos bioativos e ctDNA (Calf Thymus): uma abordagem espectroscópica**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2016.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**. 26. 3. 407-416. 2003.

SILVESTRI, C.; BRODBELT, J. S. Tandem Mass Spectrometry for Characterization of Covalent Adducts of DNA with Anticancer Therapeutics. **Mass Spectrometry Reviews**. 32. 247-266. 2012.

SIRAJUDDIN, M., ALI, S., BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 124. 1–19. 2013.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. **Mol Biotechnol**. 37. 1. 26-30. 2007.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report**: 2014. Lyon: IARC, 2014.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. **Mutation Research**. 623. 3–13. 2007.

SUÁREZ-ROZAS, C. et al. Antiproliferative and proapoptotic activities of aza-annulated naphthoquinone analogs. **Toxicology in Vitro**. 54. 375–390. 2019.

TABASSUM, S., et al. Molecular drug design, synthesis and structure elucidation of a new specific target peptide based metallo drug for cancer chemotherapy as topoisomerase I inhibitor, **Dalton Trans**. 41. 4955–4964. 2012.

TANDON, V. K. et al. Naphtho[2,3-b][1,4]-thiazine-5,10-diones and 3-substituted-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl-thioalkanoate derivatives: Synthesis and biological evaluation as potential antibacterial and antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** .16. 5883–5887. 2006.

THOMAS, R. K.; SUKUMARAN, S.; SUDARSANAKUMAR, C. Photobehaviour and in vitro binding strategy of natural drug, chlorogenic acid with DNA: A case of groove binding. **Journal of Molecular Structure** .1178. 62-72. 2019.

THOMSON, R.H. Naturally occurring quinones IV. **Chapman and Hall**. London. 1997.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, 45. 12. 2615–23. 2002.

WANG, Z. et al. Purification of a polysaccharide from *Boschniakia rossica* and its synergistic antitumor effect combined with 5-Fluorouracil. **Carbohydrate Polymers** 89. 31–35. 2012.

WELLINGTON, Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones - a review. **RSC ADVANCES**. 2015.

WILSON, W. D., et al. The search for structure-specific nucleic acid-interactive drugs: Effects of compound structure on RNA vs DNA interaction strength. **Biochemistry**. 32, 4098-4104. 1993.

WU, J. et al. Novel N-(3-carboxyl-9-benzylcarboline-1-yl)ethylamino acids: synthesis, anti-proliferation activity and two-step-course of intercalation with calf thymus DNA. **Molecular BioSystems**. 3. 855–861. 2007.

YOU, H. et al. Role of Surfactants in the Interaction of Dye Molecules in Natural DNA Polymers. **Langmuir**. 25. 19. 11698–11702. 2009.

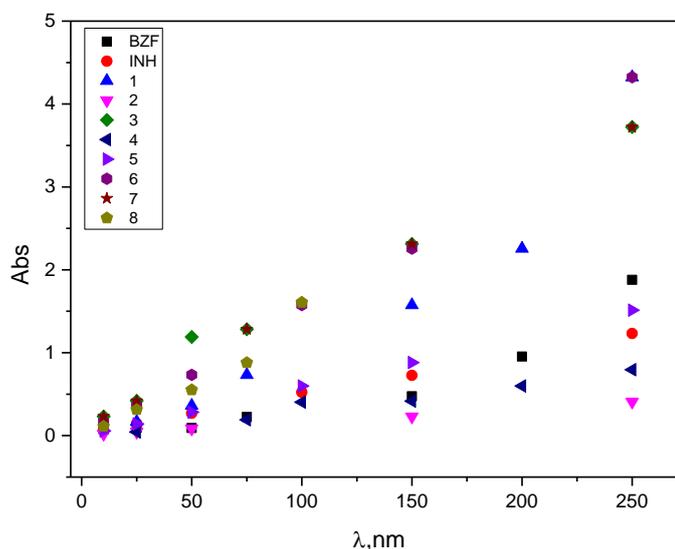
ZHAO, T., et al. In vitro studies on the behavior of salmeterol xinafoate and its interaction with calf thymus DNA by multi-spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 132. 198–204. 2014.

ZAMANI, M., DELFANI, A. M., JABBARI, M. Scavenging performance and antioxidant activity of  $\gamma$ -alumina nanoparticles towards DPPH free radical: Spectroscopic and DFT-D studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 201. 288–299. 2018.

ZERAAT, M. et al. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. **Nature Chemistry**. 10. 631–637. 2018

## 9. ANEXOS

**Figura 26.** Curva analítica para determinação da faixa ótima de análise dos compostos de **1-8** e da BZF-3.



**Fonte:** Autor, 2019.

**Tabela 7.** Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) dos compostos de **1 a 8**, da BZF-3 e da INH aferidos a partir da curva analítica.

Curva analítica										
Composto	BZF	INH	1	2	3	4	5	6	7	8
$R^2$	0,97	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99

**Fonte:** Autor, 2019.

**Tabela 8.** Comprimentos de onda de absorção máxima e absortividade molar dos compostos de **1-8** aferidos na concentração de 200  $\mu\text{M}$ .

COMPOSTO	1	2	3	4	5	6	7	8
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	330	334	330	310/372	290/336	288	310/371	330
UVA/UVB	UVA	UVA	UVA	UVB/UVA	UVB/UVA	UVB	UVB/UVA	UVA
$\epsilon$ ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ )	2,434	1,555	3,075	13,008/ 13,959	9,163/ 5,774	15,040	12,856/ 13,896	4,745

**Fonte:** Autor, 2019.

**Tabela 9.** Parâmetros de interação dos derivados de naftoquinônicos com o *ct*DNA calculados a partir do ensaio HO.

Composto	Constante de Stern-Volmer		Parâmetros de Ligação		
	$K_{SV}$ ( $10^4 \text{ L mol}^{-1}$ )	R	$K_b$ ( $10^7 \text{ L mol}^{-1}$ )	$n$	r
4	$3,78 \pm 0,22$	0,9879	$9,83 \pm 1,47$	$1,79 \pm 0,04$	0,99677
5	$0,76 \pm 0,31$	0,99053	$3,23 \pm 5,39$	$2,76 \pm 0,18$	0,96993
6	$1,39 \pm 0,04$	0,98773	$0,0021 \pm 1,47$	$1,04 \pm 0,04$	0,98162

Fonte: Autor, 2019.

**Tabela 10.** Parâmetros de interação dos derivados de naftoquinônicos com o *ct*DNA calculados a partir do ensaio com BE.

Composto	Constante de Stern-Volmer		Parâmetros de Ligação		
	$K_{SV}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	R	$K_b$ ( $10^2 \text{ L mol}^{-1}$ )	$n$	r
4	$1,26 \pm 0,22$	0,99123	$2040 \pm 0,15$	$1,39 \pm 0,04$	0,99694
5	$0,67 \pm 3,60$	0,99133	$0,11 \pm 0,13$	$0,35 \pm 0,01$	0,99558
6	$0,831 \pm 2,78$	0,9939	$4,07 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,03$	0,99182

Fonte: Autor, 2019.