

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**“Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral e antiviral frente ao  
Zika vírus de naftoquinonas sintéticas”**

Hélia Maria Marques de Moura

Escola de Farmácia

Ouro Preto - 2017

Hélia Maria Marques de Moura

**“Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral e antiviral frente ao Zika vírus de naftoquinonas sintéticas”**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração de Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

Orientador: Dr. Geraldo Célio Brandão

Co-orientador: Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Escola de Farmácia

Ouro Preto – 2017

M929a Moura, Hélia Maria Marques.  
Avaliação in vitro da atividade antitumoral e antiviral frente ao Zika vírus de naftoquinonas sintéticas. [manuscrito] / Hélia Maria Marques Moura. - 2017.  
60f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão.  
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Bignoniaceae. 2. Naftoquinonas. 3. Atividade antitumoral. 4. Atividade anti-Zika vírus. I. Brandão, Geraldo Célio. II. Souza, Gustavo Henrique Bianco. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.99

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Farmácia



### LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 137ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas a **Hélia Maria Marques de Moura**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação in vitro da atividade antitumoral e antiviral frente ao Zika vírus de naftoquinonas sintéticas”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 07 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. José Carlos de Magalhães  
UFSJ

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos  
UFOP

Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão  
UFOP



## Resumo

As quinonas constituem uma classe de substâncias bastante conhecidas e com grande diversidade estrutural. Essa diversidade estrutural, bem como as várias atividades biológicas já descritas para elas, motiva o interesse de novas pesquisas com esta classe de substâncias. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antitumoral e antiviral frente ao *Zika virus* de naftoquinonas sintéticas em modelos *in vitro*. A atividade antitumoral foi avaliada frente a três linhagens celulares de origem tumoral, TOV-21, HepG-2 e T 24. Já a atividade antiviral foi avaliada *in vitro* contra o ZIKV empregando o método colorimétrico do MTT (n = 3); a citotoxicidade foi determinada *in vitro* em linhagem celular Vero, susceptível ao ZIKV. Adicionalmente, as substâncias que apresentaram maior citotoxicidade foram testadas contra fibroblastos de humanos (MRC-5), linhagem de célula não tumoral, com o objetivo de avaliar a seletividade. Foram avaliadas vinte e três naftoquinonas frente a cinco linhagens de células, onde as concentrações citotóxicas cinquenta por cento CC<sub>50</sub> variaram de 0,0001 a 515,7 µg/mL. Nos ensaios antivirais, as substâncias selecionadas não foram capazes de inibir a replicação do ZIKV, uma vez que nas concentrações não citotóxicas para as células o efeito antiviral não foi significativo em relação ao controle de vírus. Os resultados deste estudo mostraram que as substâncias testadas, em sua maior parte, foram citotóxicas nas concentrações testadas. Além disso, podemos destacar o alto índice de seletividade (300.0) da substância NQ 2 diante da linhagem tumoral Hep-G2, quando comparamos às células da linhagem de fibroblastos de humanos MRC-5.

**Palavras chave:** Bignoniaceae; Naftoquinonas; atividade antitumoral, atividade anti-Zika vírus.

## Sumário

Resumo.....	i
Sumário .....	ii
Índice de figuras .....	iii
Índice de tabelas.....	iv
Lista de abreviaturas e siglas .....	v
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Família Bignoniaceae e as Naftoquinonas .....	3
2.2. Câncer .....	7
2.3. Flavivirus .....	8
2.3.1. Zika .....	9
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>11</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
4.1. Objetivo Geral .....	12
4.2. Objetivos específicos .....	12
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
5.1. Naftoquinonas.....	13
5.2. Avaliação da atividade antitumoral.....	16
5.2.1. Células .....	16
5.1.2. Cultivo celular .....	17
5.1.3. Ensaio de Citotoxicidade .....	17
5.1.4. Análise estatística dos dados.....	18
5.2. Avaliação da atividade antiviral.....	19
5.2.1. Triagem antiviral.....	19
5.2.1.1. Vírus.....	19
5.2.1.2. Preparo das suspensões virais .....	19
5.2.1.3. Determinação do título infeccioso viral por TCID <sub>50</sub> .....	19
5.2.1.4. Triagem da atividade antiviral pela técnica colorimétrica do MTT .....	19
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
6.1. Determinação da concentração citotóxica 50 % (CC <sub>50</sub> ).....	21
6.2. Ensaio Antiviral com os compostos selecionado .....	21
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
7.1. Atividade antitumoral .....	21
7.2. Atividade antiviral .....	21
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>
<b>10. APÊNDICE .....</b>	<b>42</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Padrões estruturais de algumas naftoquinonas de Bignoniaceae.....	4
<b>Figura 2:</b> <i>Tabebuia avellaneda</i> .....	5
<b>Figura 3:</b> Lapachol.....	6
<b>Figura 4:</b> Distribuição dos tipos de câncer de maior incidência em 2016.....	8
<b>Figura 5:</b> Relação de nome, estrutura e código dos compostos .....	15
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática da placa utilizada no método do MTT na avaliação da atividade antiviral das substâncias selecionadas contra <i>Zika vírus</i> .....	21
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática da placa utilizada no método do MTT na avaliação da atividade antiviral das substâncias selecionadas contra <i>Zika vírus</i> e seus respectivos valores.....	25
<b>Figura 8:</b> NQ 8: 2- (1-dodeceno-1-il) 3 – Hidroxi – naftalen – 1,4-diona.....	25
<b>Figura 9:</b> NQ 11: (E) – 2 – (hept-1-eno) 3 – hidroxi – naftalen – 1,4 – diona.....	30
<b>Figura 10:</b> NQ 9: 2 – etil – nafto [2,3-b] furan – 4,9 – diona.....	30
<b>Figura 11:</b> NQ 10: 2 – ((2S,3S) 3 – etil – oxiran – 2 – il) 3 – hidroxi – 5 – metoxi – naftalen – 1,4 – diona.....	31

## Índice de tabelas

**Tabela 1:** Linhagens celulares utilizadas nos ensaios *in vitro*.....17

**Tabela 2:** Citotoxicidade (BHK-21, HepG-2, TOV-21G e T 24), e respectivos desvios padrão (n=3), das substâncias pelo ensaio colorimétrico do MTT.....22

**Tabela 3:** Valores da  $CC_{50}$  para linhagem celular MRC-5 e para as linhagens celulares de origem tumoral, na qual as substâncias foram mais tóxicas e seus respectivos índices de seletividade.....24

**Tabela 4:** Citotoxicidade (Vero) e atividade antiviral (ZIKV) das substâncias analisadas frente ao ZIKV pela técnica colorimétrica do MTT.....26

## Lista de abreviaturas e siglas

AMV – Mieloblastose Aviária vírus (*Avian Myeloblastosis virus*)  
BHK-21 – Linhagem de células derivadas de rim de hamster  
CC<sub>50</sub> – Concentração Citotóxica 50%  
DENV – *Dengue virus*  
DMEM – Meio básico modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
FDA – Food and Drug Administration (Administração de Comidas e Remédios)  
HepG2 - Linhagem de células do Hepato carcinoma humano  
JEV - vírus da encefalite japonesa  
MOI – Multiplicidade de infecção viral  
MTT – Brometo de 3 - (4',5'- dimetiltiazol-2'-ila)-2,5-difeniltetrazol  
NA – Não ativo  
NQ – Naftoquinona  
NS – Proteínas não estruturais  
NT – Não Tratado  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
RLV – Vírus da Leucemia Murina de Rauscher (*Murine leukemia virus*)  
SFB – Soro Fetal Bovino  
TOV-21G – Linhagem de células derivada de câncer ovariano  
T 24 – Linhagem de células derivada de câncer de bexiga  
UFP – Unidades formadoras de placas  
µg - Micrograma  
YFV – Vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*)  
WNV - virus do Nilo Ocidental  
ZIKV – *Zika virus*

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são os meios mais antigos empregados no tratamento de enfermidades (FUCK et al., 2005), devido à facilidade do acesso aos mesmos, e principalmente, devido ao conhecimento popular sobre a eficácia terapêutica de algumas plantas de uso medicinal. Os produtos naturais e as estruturas derivadas ou relacionadas continuam a desempenhar importante papel na descoberta de agentes terapêuticos (NEWMAN & CRAGG, 2016).

O desenvolvimento dessas pesquisas deve-se ao fato de já se conhecer várias substâncias bioativas isoladas (FOGLIO et al., 2006). Como exemplo, os derivados da Beta-lapachona, que foram substâncias sintetizadas usando uma metodologia direta e avaliadas contra várias linhagens celulares de câncer (leucemia, carcinoma do cólon humano, próstata, humano próstata metastática, ovário, sistema nervoso central e mama), mostrando, em alguns casos, valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 1 mM de (CUNHA, M. S. S. et al., 2005).

Há um forte impacto do uso de plantas para o desenvolvimento de drogas, e isso pode ser notado nas principais áreas terapêuticas. Ressalta-se que entre 1981 e 2002, dos 90 antibacterianos e entidades químicas aprovadas pela FDA, 10% foram produtos naturais enquanto outros 68% foram derivados de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2003). Além disso, plantas e outros produtos naturais têm inspirado o desenvolvimento da química orgânica, levando ao avanço de metodologias sintéticas e a possibilidade de fazer análogos do composto original com melhora das propriedades farmacológicas, farmacêuticas e também diminuição da toxicidade. (WILSON & DANISHEFSKY, 2006; NEWMAN, 2008; SUNAZUKA et al., 2008).

Dentro do potencial antineoplásico de substâncias isoladas de espécies da família Bignoniaceae destaca-se o lapachol uma naftoquinona isolada de caules de várias espécies da tribo Tecomeae (Bignoniaceae). Conhecido por suas propriedades anticancerígenas, antiinflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária, antitripanossoma e antiulcerogênica (MORRISON et al., 1970).

No final da década de 60, iniciaram-se pesquisas sistemáticas na triagem de diferentes espécies vegetais para a descoberta de agentes antineoplásicos (CRAGG & NEWMAN, 2005). Diversos compostos de origem natural com potencial anticâncer foram submetidos a ensaios clínicos e encerrados devido à falta de eficácia e/ou

toxicidade inespecífica, como exemplo o lapachol, camptotecina e podofilotoxina. Porém, eles podem ser e têm sido utilizados como compostos modelos para o desenvolvimento de novos potenciais derivados, através de técnicas como sínteses orientadas e síntese química combinatória (BALUNAS & KINGHORN, 2005; CRAGG & NEWMAN, 2005; IMBERT, 1998; NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2003).

Diante desse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar as atividades antiproliferativas em linhagens de células tumorais, além de realizar testes de atividade antiviral de vinte e três substâncias obtidas por síntese cujo modelo foi naftoquinonas isoladas de espécies da família Bignoniaceae, uma vez que esses metabólitos secundários vem mostrando na literatura o seu potencial efeito frente às células tumorais e diversos vírus.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Família Bignoniaceae e as Naftoquinonas

O reino vegetal tem contribuído de forma significativa com substâncias bioativas para o tratamento de doenças. A variedade e a complexidade de metabólitos especiais biosintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação. Dessa forma, as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Com cerca de 110 gêneros e aproximadamente 800 espécies distribuídas predominantemente em regiões tropicais (SOUZA & LORENZI, 2012) a família Bignoniaceae, pertencente à ordem Lamiales, possui grande relevância por apresentar diversas substâncias bioativas e atividades farmacológicas importantes (RAHMATULLAH et al., 2010). O Brasil possui várias espécies endêmicas, que são encontradas em diversos tipos de ambientes (GENTRY, 1980).

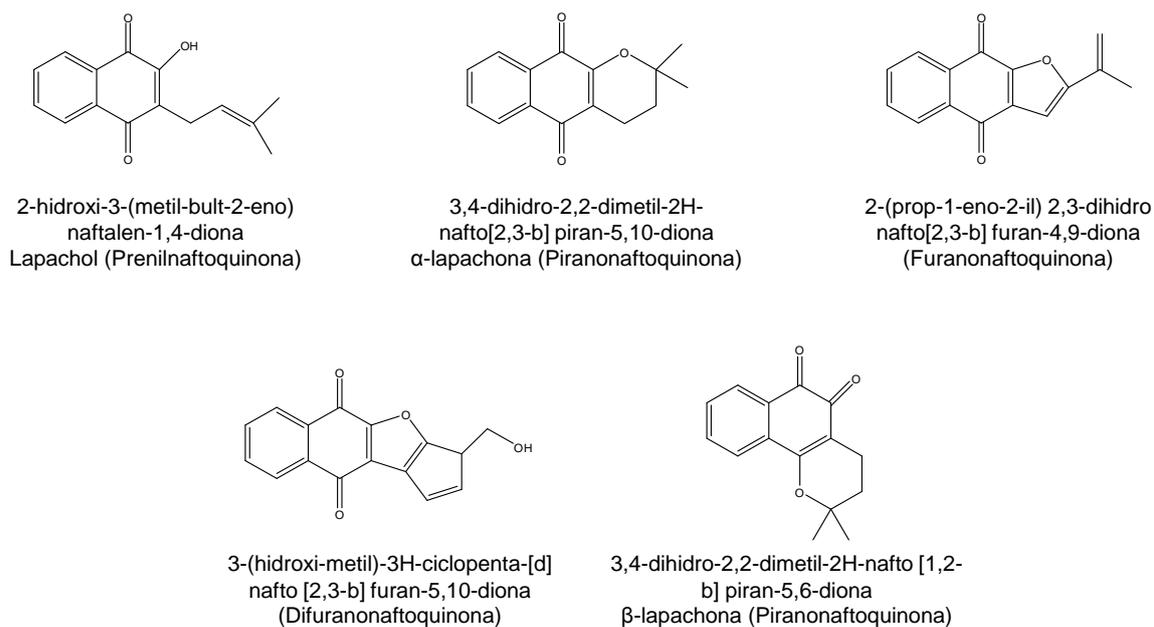
Do ponto de vista químico, a família caracteriza-se pela presença de terpenóides, quinonas, alcaloides monoterpênicos, flavonoides e derivados não nitrogenados de cadeia longa da via do acetato. As duas primeiras classes mencionadas merecem destaque por apresentarem-se com grande ocorrência na família, o que as classificam como marcadores químicos do taxon (CIPRIANE, 2006).

Nos últimos anos, muitas espécies da família Bignoniaceae têm sido estudadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico e dentre, as atividades biológicas de Bignoniaceae brasileiras, já foram relatadas o efeito antimalárico, antitumoral, antiviral, contra infecções e cicatrizante de feridas, os quais têm sido atribuídos à presença dos seguintes metabólitos secundários: naftoquinonas, xantonas e a vários flavonoides (ALCANTARA et al., 2010).

Naftoquinonas são metabólitos secundários produzidos por algas, fungos, plantas e animais (THOMSON, 1991). Em Angiospermae, essas substâncias são encontradas em diversas famílias, com destaque para Bignoniaceae, Ebenaceae, Plumbaginaceae, Verbenaceae, dentre outras.

As naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae expressam várias atividades biológicas descritas, sendo uma das classes químicas mais investigadas do ponto de vista farmacológico nas últimas décadas (OLIVEIRA et al., 1990; CASTRO & PINTO, 2009; FERREIRA et al., 2010).

Em relação às estruturas químicas apresentadas pelas naftoquinonas, é importante destacar a cadeia carbônica similar ao naftaleno que são caracterizadas por apresentar dois grupos carbonila na posição 1 e 4, por isso a denominação de 1,4-naftoquinonas. Os grupos carbonila também podem estar presente na posição 1 e 2, porém, com menor incidência (LÓPEZ, 2014). Dentro do grupo existe uma significativa variação estrutural e podem ser classificadas como prenilnaftoquinonas, furanonaftoquinonas, difuranonaftoquinonas e piranonaftoquinonas (Figura 1):



**Figura 1:** Padrões estruturais das principais naftoquinonas de Bignoniaceae.

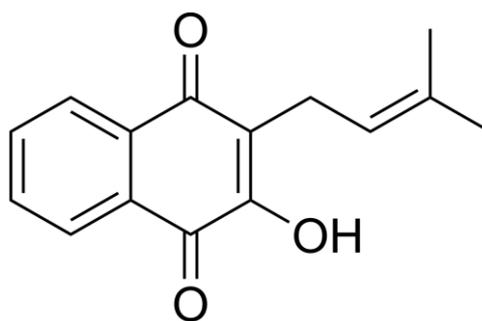


**Figura 2:** *Tabebuia avellanedae* (HUSSAIN, 2007).

O lapachol é uma naftoquinona prenilada, que foi isolado pela primeira vez por E. Paterno de *Tabebuia avellanedae* (Figura 2), uma Bignoniaceae, em 1882 (PATERNO, 1882). Um amplo espectro de atividades terapêuticas tem sido atribuído ao lapachol e seus derivados, entre elas: antiúlcera, leishmanicida, anti-inflamatória, antimalárica, antisséptica, antitumoral, antiviral, bactericida, fungicida, pesticida e outras. Originalmente isolado a partir de espécies da família Bignoniaceae, o lapachol também pode ser encontrado em outras famílias botânicas como Verbenaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Scrophulariaceae e Malvaceae.

A atividade antiviral do lapachol e seus derivados foram descritos pela primeira vez por Lagrota e colaboradores em 1983.

Em avaliação da atividade antiviral do Lapachol *in vitro* verificou-se que esta substância é ativa contra vírus RNA atuando tanto sobre vírus envelopados quanto sobre partículas sem esta estrutura, em concentrações de 5 a 10 µg/mL, e ainda apresentou uma pequena atividade sobre HSV (Herpes simplex I) e Ad5 (Adeno tipo 5), mas nenhuma atividade sobre CoxB4 (Coxsackie B4). Em trabalho posterior, demonstrou-se que nem o Lapachol nem diversos dos seus derivados apresentaram atividade antiviral *in vitro* sobre Poliovirus tipo 1, Ecovirus 19 e Coxsackie B tipo 4. Apenas os derivados 1,2-naftoquinônicos e um intermediário da síntese Hoocker foram ativos contra o Echovirus 19 (FONSECA, 2003).



**Figura 3:** Lapachol

É ainda reduzido o número de publicações sobre atividade antinflavivírus de produtos naturais e seus derivados. Entre os produtos naturais citam-se flavanonas simples isoladas de plantas mexicanas, *Tephrosia madrensis*, *Tephrosia viridiflora* e *Tephrosia crassifolia* (SÁNCHEZ et al., 2000), galactomananas de *Mimosa scabrella* e *Leucaena leucocephala* (ONO et al., 2003) e ciclo-hexenilchalconas de *Boesenbergia rotunda* (Zingiberaceae) (KIAT et al., 2006, CHEE et al., 2010).

Publicações recentes de uma triagem de 84 extratos obtidos a partir de 47 espécies vegetais pertencentes às famílias Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Bignoniaceae, Polygonaceae e Vitaceae. Trinta e quatro (40%) dos 84 extratos testados apresentaram atividade contra o vírus da dengue sorotipo 2 (DENV-2), com valores de  $CC_{50}$  na faixa de  $3,8 \pm 0,6$  a  $24,4 \pm 5,3$   $\mu\text{g/ml}$  e IS (Índice de Seletividade) variando de 2,7 a 80,8. Este estudo revelou algumas espécies vegetais com potencial fonte de substâncias ativas contra o DEN-2, como *Arrabidaea formosa*, *Arrabidaea samyroides*, *Arrabidaea pulchra*, *Anemopaegma setilobum*, *Distictella elongata*, *Xylophragma myrianthum* e *Stizophyllum perforatum*. (BRANDÃO, 2010; BRANDÃO et al., 2010a; BRANDÃO et al., 2010b; BRANDÃO et al., 2010c; BRANDÃO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; SIMÕES et al., 2011; BRANDÃO et al., 2017).

A  $\beta$ -lapachona é uma substância natural facilmente obtida a partir do lapachol. Esta naftoquinona é o grande destaque desta classe de substâncias porque se encontra em testes clínicos de fase II para o tratamento do câncer de pâncreas (FERREIRA, 2010). O mecanismo de ação da  $\beta$ -lapachona diferencia-se de outros antineoplásicos por atuar na topoisomerase I promovendo a recuperação da capacidade de apoptose celular. Alguns estudos reportam sua ação sinérgica de potenciação com o Taxol<sup>®</sup> promovendo a inibição em diferentes pontos de replicação celular, além de sua combinação com outros tratamentos, como a aplicação de radiação ionizante (CUNHA, 2005).

Estes resultados evidenciam o elevado potencial de produtos naturais com atividade antiviral e antitumoral, o que justifica pesquisas com estas substâncias, sendo que a utilização de testes *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância. Para ser considerado não citotóxico no teste de citotoxicidade *in vitro*, um produto não deve ocasionar a morte das células nem afetar suas funções celulares. O ensaio colorimétrico do MTT é um dos indicadores de viabilidade celular mais utilizados, sendo capaz de avaliar a função celular mitocondrial de acordo com a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (ARAÚJO et al., 2008). Supõe-se que o mecanismo responsável pela citotoxicidade apresentada pelas quinonas esteja relacionado com o estresse oxidativo causado por esses compostos, porém, a capacidade de alquilação de nucleófilos celulares também representa correlação com tais efeitos biológicos (GOULART, 2004).

## 2.2. Câncer, a “epidemia” mundial

Denomina-se câncer um conjunto de mais de cem doenças não transmissíveis e que têm em comum o crescimento disseminado e a falta de controle nos processos de divisão celular normais, podendo afetar tecidos e órgãos de qualquer parte do corpo (INCA, 2016; WHO, 2016). É considerado uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo e acomete tanto países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento (WHO, 2015). No Brasil, por se tratar de um problema de saúde pública inquestionável, é considerada a segunda principal causa de mortes (INCA, 2015).

Os países desenvolvidos, atualmente, possuem maiores índices de prevalência e mortalidade por câncer, e essa taxa continua aumentando. Estimativas demonstram a ocorrência de uma transição epidemiológica nos países em desenvolvimento, uma vez que se nota um progressivo aumento da incidência e mortalidade por doenças crônico-degenerativas, dentre as quais estão incluídos os variados tipos de câncer (INCA, 2014). Com base no documento *World cancer report 2014* da International Agency for Research on Cancer (Iarc), da Organização Mundial de Saúde (OMS), é esperado que nas próximas décadas, o impacto do câncer na população dos países em desenvolvimento corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025.

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer (Figura 4). Excetuando-se o câncer de pele não

melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. Os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (INCA, 2015).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	<b>Homens</b> 	<b>Mulheres</b> 	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2015

**Figura 4:** Distribuição dos tipos de câncer de maior incidência estimados para 2016.

Diante do atual cenário, é indispensável admitir a importância da busca por novos e eficazes agentes antineoplásicos, sendo o câncer no Brasil um problema de saúde pública inquestionável.

### 2.3. A importância dos Flavivírus no contexto da saúde pública

O gênero Flavivirus é composto por mais de 70 vírus, muitos dos quais causam doenças humanas severas com alto impacto global. Os surtos significativos de ZIKV, um flavivírus remanescente transmitido por mosquitos, ocorreram em todo o mundo desde 2013 (CALVET et al., 2016). A família *Flaviviridae*, que inclui vários agentes de significado clínico, muitos das quais são importantes patógenos humanos, tais como o *Dengue virus* (DENV), *Yellow fever virus* (YFV - vírus da febre amarela – protótipo deste gênero), *Japanese encephalitis virus* (JEV - vírus da encefalite japonesa), *West Nile virus* (WNV - vírus do Nilo Ocidental), *Zika virus* (ZV), entre outros (VILLORDO, 2016).

A maioria dos membros desse gênero são arbovirus (arthropod borne virus), ou seja, são essencialmente transmitidos por Artrópodes (MACKENZIE, 2004), onde, 27 são transmitidos por mosquitos, 12 por carrapatos e 14 não possuem vetor conhecido. Os vírus transmitidos pela fêmea do gênero *Aedes*, incluem DENV e YFV, são viscerotrópicos e possuem primatas não humanos como reservatório natural (GAUNT, 2001).

Dentre as doenças virais mais importantes que são transmitidas por insetos, a dengue é responsável por cerca de 390 milhões de infecções por ano. O YFV, por sua vez, causador da febre amarela é endêmico em vários países do continente Africano e da América do Sul, resultando em 200.000 casos e 30.000 mortes na África, mesmo com vacinas eficazes disponíveis. Outras doenças causadas por flavivírus incluem a encefalite do Nilo Ocidental (*West Nile virus*) e febre Zika (*Zika virus*), que são consideradas doenças emergentes com surtos importantes em todo o mundo (VILLORDO, 2002).

### **2.3.1. Zika vírus: o desafio da saúde pública brasileira**

A infecção pelo ZIKV, recentemente emergiu como um problema de saúde mundial, sendo relatado em mais de 60 países de todo o mundo (OMS, 2016). ZIKV é um vírus de artrópodes (arbovirus), da família Flaviviridae, gênero Flavivirus, que é transmitido por mosquitos de Gênero *Aedes*. O vírus foi isolado pela primeira vez em 1947, em Uganda, e, até 2007, muito poucos casos humanos foram descritos, sendo que todos estavam associados com sintomas clínicos leves (DICK et al., 1952)

O ZIKV levou a uma crise global devido a suas ligações inesperadas com o dano dos testículos (GOVERO J. & ESAKKY P., 2016; MA W., LI S., et al., 2016), danos oculares (MINER et al., 2016), síndrome de Guillain-Barre, microcefalia fetal (CALVET et al., 2016) e potencialmente para outras complicações neurais. Esse patógeno emergente é um vírus de RNA. Embora o ZIKV seja um vírus transmitido por artrópodes (arbovírus) (MUSSO et al., 2016), a transmissão através do contato sexual também tem sido relatada (MUSSO et al., 2015).

A percepção de que o ZIKV provoca uma infecção leve e auto-limitada (CERBINO-NETO et al., 2016) foi posta em dúvida nos últimos anos, com focos nas ilhas do Pacífico e nas Américas (MUSSO et al., 2016; FARIA et al., 2016). Por exemplo, o ZIKV espalhou de forma explosiva em todo o território brasileiro e países vizinhos em 2015, infectando mais de 4 milhões de pessoas (SOLOMON et al., 2016).

No Brasil foi confirmada a transmissão autóctone de febre pelo vírus Zika a partir de abril de 2015. Além disso, também foram confirmados laboratorialmente três óbitos por vírus Zika no país: em São Luís/MA, Benevides/PA e Serrinha/RN (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Resultados publicados tem mostrado que quatro diferentes plataformas estão sendo usadas para desenvolver vacinas visando ao combate ao ZIKV (ABBINK et al., 2016; LAROCCA et al., 2016; PARDI & WEISSMAN, 2017). Embora existam fortes candidatas a vacinas contra o ZIKV, as quais protegeram ratos e macacos *Rhesus* frente a mudanças letais provocadas pelo ZIKV (ABBINK et al., 2016; LAROCCA et al., 2016; PARDI & WEISSMAN, 2017), as questões associadas à sua segurança e custo ainda precisam ser abordadas antes de se tornarem vacinas licenciáveis com impacto significativo na saúde global.

Os tratamentos antivirais contra a ZIKV são, portanto, necessários não apenas para mitigar as morbidades associadas à ZIKV, mas também para interromper a cadeia de transmissão. Alguns antivirais de amplo espectro, tais como interferons (IFNs), ribavirina e favipiravir, não são adequados para utilização contra ZIKV, pois podem ser prejudiciais para mulheres grávidas (CHUTAPUTTI, 2000).

Entre o período de 08/11/2015 a 20/05/2017, o Ministério da Saúde foi notificado sobre 13.835 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, dos quais 3.211 (23,2%) permaneciam em investigação. Do total de casos, 5.892 (42,6%) foram descartados, 2.753 (19,9%) foram confirmados e 141 (1,0%) foram classificados como prováveis para relação com infecção congênita durante a gestação.

Além disso, 1.838 (13,3%) casos foram excluídos após criteriosa investigação, por não atenderem às definições de caso vigentes. Entre os casos confirmados, 1.433 (52,1%) estavam recebendo cuidados em puericultura, 1.110 (40,3%) em estimulação precoce e 1.524 (55,4%) no serviço de atenção especializada. A maioria dos casos em monitoramento concentra-se na região Nordeste do país (47,3%), seguindo-se as regiões Sudeste (34,1%) e Norte (9,0%). Os cinco estados com maior número de casos em monitoramento são Bahia (17,7%), São Paulo (11,8%), Rio de Janeiro (11,1%), Pernambuco (9,5%) e Minas Gerais (8,6%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

### 3. JUSTIFICATIVA

É indispensável admitir a importância da busca por novos e eficazes agentes antineoplásicos e antivirais, sendo o câncer no Brasil um problema de saúde pública inquestionável, e a epidemia viral, causada pela infecção do ZIKV, uma arbovirose que está atingindo milhares de pessoas no país. Apesar desta ameaça global para a saúde, nenhuma vacina licenciada ou tratamento terapêutico está atualmente disponível para uso humano, portanto, existe uma necessidade urgente de desenvolver vacinas e/ou tratamentos terapêuticos eficazes, seguros e acessíveis contra o ZIKV.

Nesse contexto, torna-se fundamental a busca por novas moléculas antineoplásicas e antivirais, com potencial desenvolvimento de novas formulações. A obtenção de substâncias derivadas de produtos naturais com supostas propriedades terapêuticas tem levado à obtenção de numerosos compostos com ação farmacológica bem definida, e esse tipo de pesquisa tem aumentado significativamente nestes últimos anos. Os produtos naturais são os meios mais antigos empregados no tratamento de enfermidades (FUCK et al., 2005), sendo que o Brasil ocupa um lugar de destaque para a realização desse tipo de estudo, pois possui uma grande biodiversidade vegetal (CALIXTO, 2003).

As naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae expressam várias atividades biológicas descritas, sendo uma das classes químicas mais investigadas do ponto de vista farmacológico nas últimas décadas (OLIVEIRA et al., 1990; CASTRO & PINTO, 2009; FERREIRA et al., 2010).

Como as naftoquinonas já demonstraram, na literatura, possuir um potencial efeito terapêutico contra alguns vírus e diversas linhagens celulares tumorais, é possível que estes compostos possam apresentar atividade antiviral contra o ZIKV, além da atividade citotóxica para células tumorais. Portanto, este trabalho visou, através do ensaio colorimétrico do MTT e titulações virais em placa, avaliar a potencial atividade citotóxica e antiviral de vinte e três naftoquinonas sintéticas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral e antiviral (*Zika virus*) *in vitro* de naftoquinonas sintéticas.

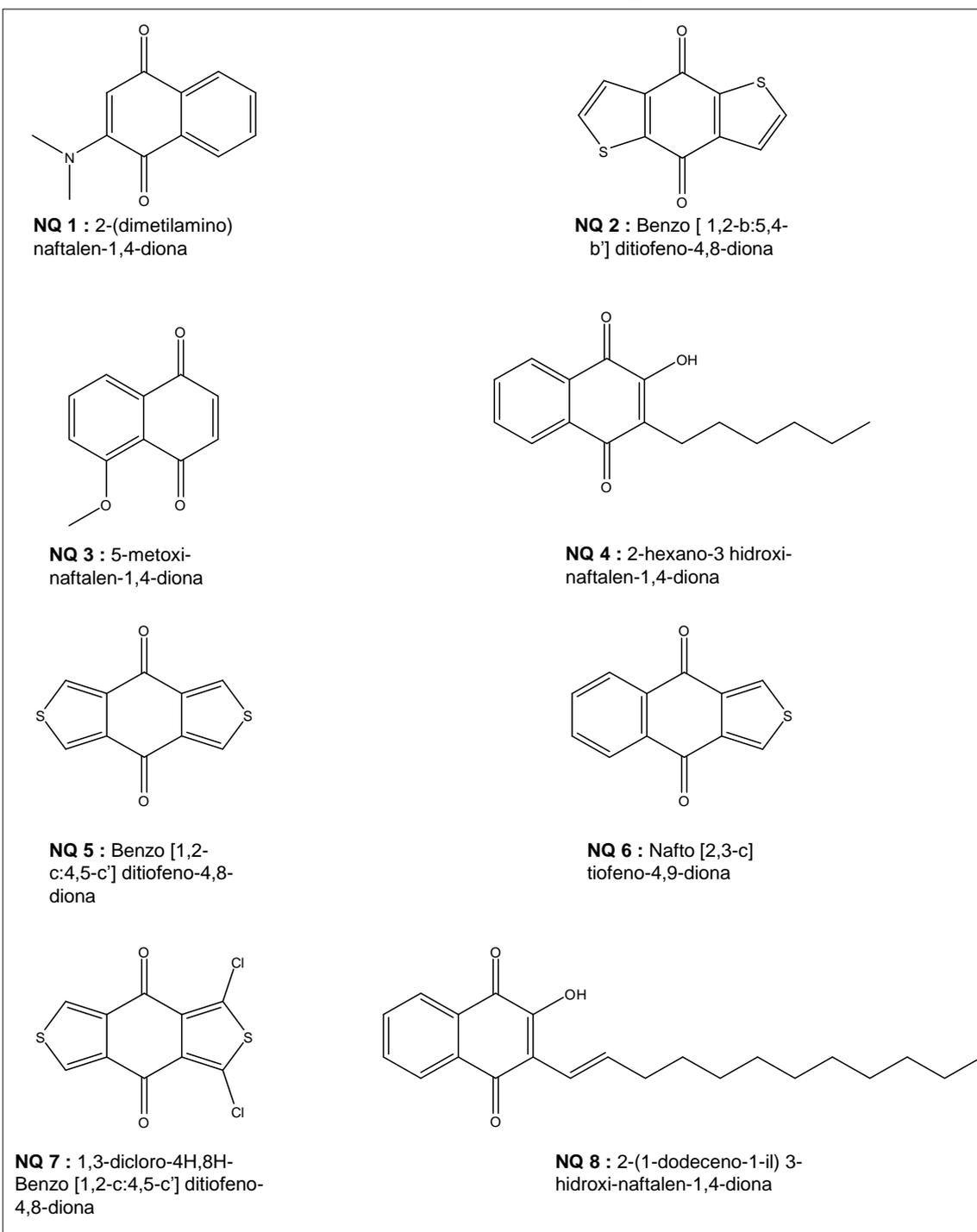
### 4.2. Objetivos específicos

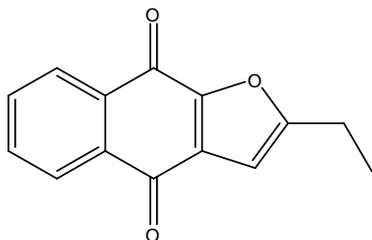
- I. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das naftoquinonas em diferentes linhagens celulares por meio do método colorimétrico do MTT;
- II. Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das naftoquinonas frente o *Zika virus* por meio do método colorimétrico do MTT.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

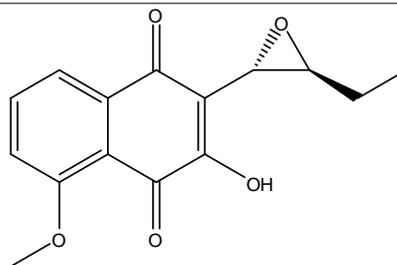
### 5.1. Naftoquinonas

As naftoquinonas foram obtidas por síntese no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG em colaboração com o grupo da Professora Alaíde Braga de Oliveira. As estruturas das substâncias testadas estão representadas abaixo na Figura 5.

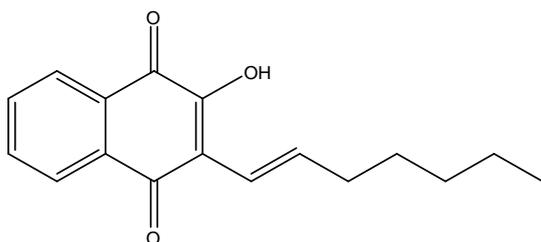




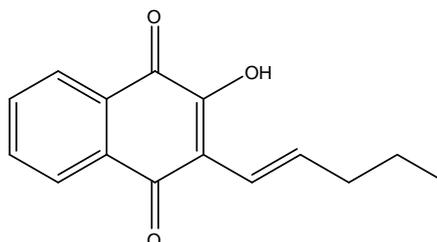
**NQ 9** : 2-etil-nafto [2,3-b] furan-4,9-diona



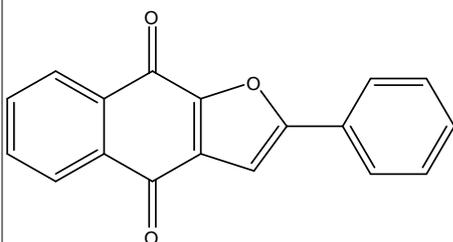
**NQ 10** : 2-((2S,3S) 3-etil-oxiran-2-il) 3-hidroxi-5-metoxi-naftalen-1,4-diona



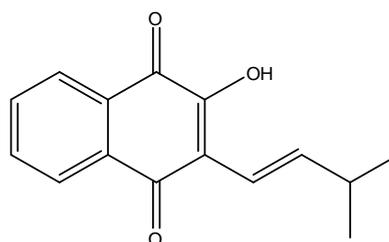
**NQ 11** : (E)-2 (hept-1-eno) 3-hidroxi-naftalen-1,4-diona



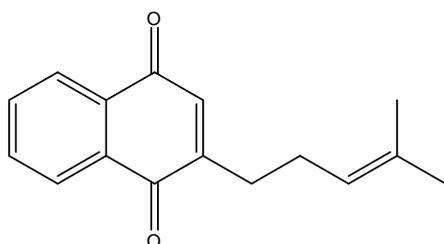
**NQ 12** : (E)-2-hidroxi-3-(pent-1-eno) naftalen-1,4-diona



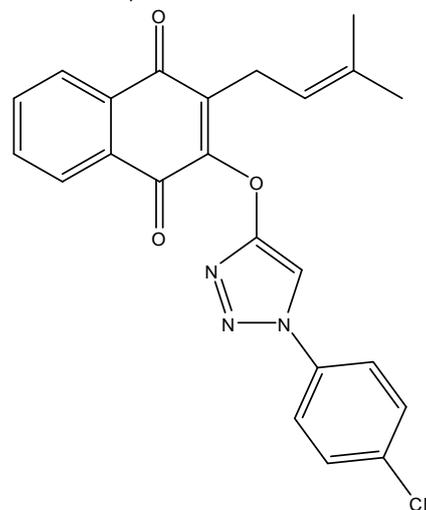
**NQ 13** : 2-fenil-nafto [2,3-b] furan-4,9-diona



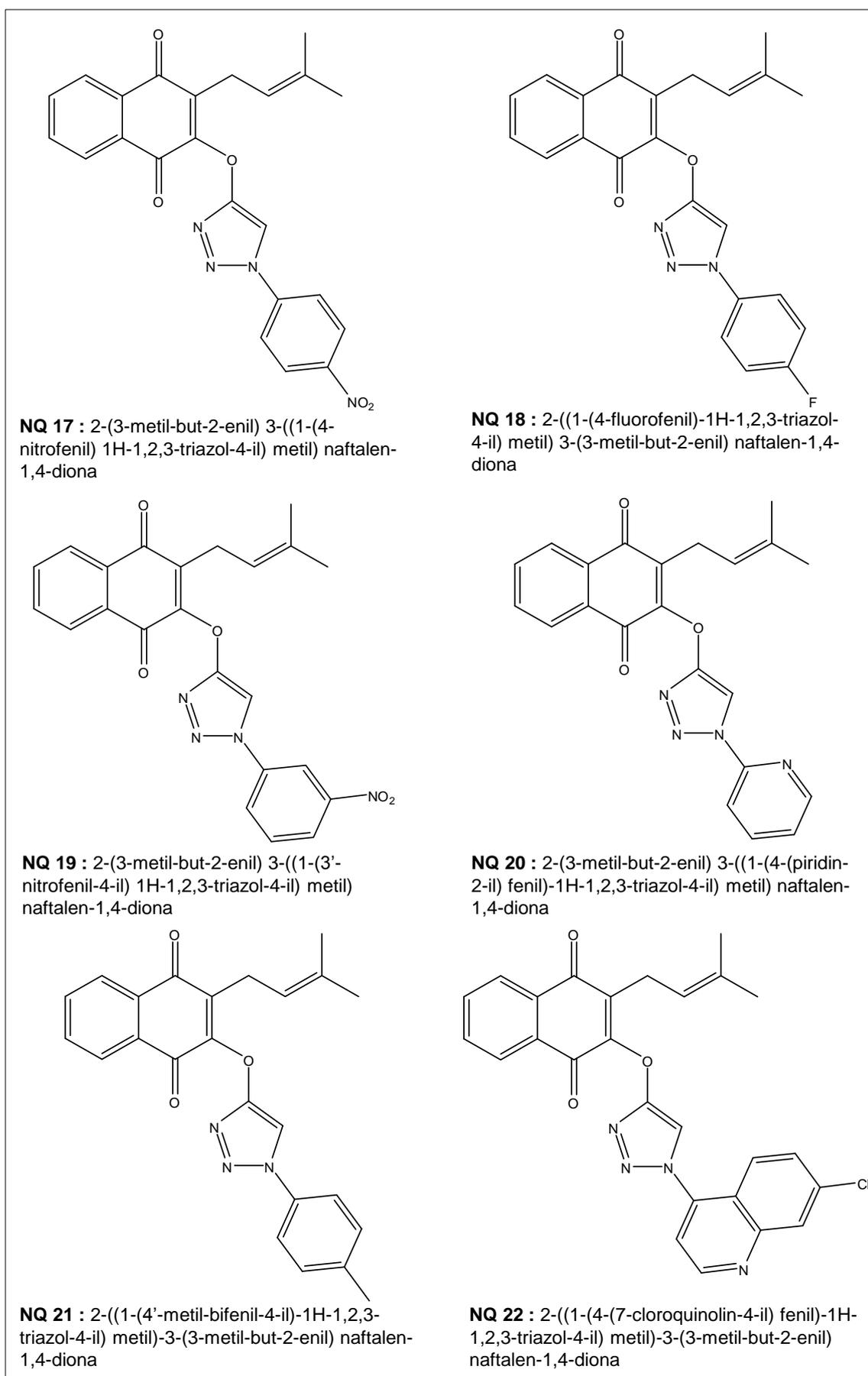
**NQ 14** : (E)-2-hidroxi-3-(3-metil-but-1-eno) naftalen-1,4-diona



**NQ 15** : 2-(4-metil-pent-3-enil) naftalen-1,4-diona



**NQ 16** : 4-(4-((3-metil-but-2-enil) 1,4-dioxo-1,4-diidronaftalen-2-il) metil) 1H-1,2,3-triazol-1-il) benzonitrila



**Figura 5:** Relação de nome, estrutura e código dos compostos utilizados.

## 5.2. Avaliação da atividade antitumoral

### 5.2.1. Células

A linha parental de BHK-21 (C-13) são fibroblastos de linhagem contínua derivados de rim de hamster (*Mesocricetus auratus*), não sexados, de 1 dia de idade em Março de 1961, por IA Macpherson e Pop Stoker. Foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% SFB contendo, penicilina/estreptomicina (100 UI/ml) e anfotericina B (5 µg/ml), em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Essas células foram utilizadas nos experimentos de citotoxicidade.

A linhagem celular Vero foi iniciada a partir de rins de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), adulto, normal em 27 de março de 1962, por Y. Yasumura e Y. Kawakita na Universidade Chiba em Chiba, Japão. Foram cultivadas em meio DMEM-HIGH GLUCOSE suplementado com 5% SFB contendo, penicilina/estreptomicina (100 UI/ml) e anfotericina B (5 µg/ml), em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Estas células foram utilizadas nos experimentos de citotoxicidade e atividade antiviral (*Zika vírus*).

As células C6/36 são derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus*, cultivadas em meio L-15 suplementado com 5% SFB contendo gentamicina (50 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B a (5 µg/mL), em estufa a 28 °C. Estas células foram utilizadas na produção do estoque viral de *Zika virus*.

A linhagem celular MRC-5 foi derivada do tecido pulmonar normal de um feto masculino de 14 semanas por JP Jacobs em setembro de 1966.

As células de linhagens tumorais, incluíram a Hep-G2, TOV-21G, T24. A linhagem Hep-G2 é derivada de um carcinoma hepatocelular do fígado de um homem caucasiano (*Homo sapiens*) de 15 anos de idade. A linhagem TOV-21G: foi inicialmente obtida em outubro de 1991 de um paciente de ascendência canadense sem história familiar de câncer de ovário. A linhagem celular T 24 é originada do tecido de bexiga urinária em um carcinoma de células de transição de humano (*Homo sapiens*) de 81 anos de idade.

As células derivadas de linhagens tumorais descritas acima, foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% SFB contendo, penicilina/estreptomicina (100 UI/ml) e anfotericina B (5 µg/ml), em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Estas células foram utilizadas nos experimentos de citotoxicidade.

As informações das linhagens celulares utilizadas no presente trabalho estão sumarizadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Linhagens celulares utilizadas nos ensaios *in vitro*.

LINHAGEM	TIPO HISTOLÓGICO DA LINHAGEM CELULAR	ATCC®	CONCENTRAÇÃO DE PLAQUEAMENTO
<b>BHK-21</b>	Rins de hamster	CCL-10™	2 x 10 <sup>4</sup>
<b>VERO</b>	Rins de macaco verde africano	CCL-81™	2 x 10 <sup>4</sup>
<b>HEP-G2</b>	Carcinoma hepatocelular	HB-8065™	2 x 10 <sup>4</sup>
<b>TOV-21G</b>	Adenocarcinoma ovariano	CRL-11730™	5 x 10 <sup>4</sup>
<b>T 24</b>	Bexiga urinária	HTB-4™	2 x 10 <sup>4</sup>
<b>MRC-5</b>	<i>Homo sapiens</i>	CCL-171™	2 x 10 <sup>4</sup>

### 5.1.2. Cultivo celular

As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio DMEM - alta glucose, acrescido de soro fetal bovino 5% (v/v) e Penicilina/Streptomocina e Anfotericina B. As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°. Os repiques foram realizados utilizando-se de solução de tripsina-EDTA para soltar as células em intervalos de 48h na proporção de 1:3. Para armazenamento das linhagens, as células (10<sup>6</sup> células/mL) foram suspensas em meio de cultura e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -70°C e mantidas durante 48 horas, e a seguir estocadas em nitrogênio líquido (-196°C). Para uso as células foram descongeladas a 37°C e adicionadas em garrafas pequenas (50 mL) contendo meio adequado como já descrito. Após adesão das células à superfície da garrafa (~2 horas), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

### 5.1.3. Ensaio de Citotoxicidade

O método colorimétrico do MTT é um ensaio de citotoxicidade baseado na capacidade das células viáveis converter o sal de tetrazólio, o brometo de 3 - (4',5' - dimetiliazol-2' - ila) - 2,5-difeniltetrazol (MTT), hidrossólúvel e de coloração amarela, em um precipitado azul-violeta insolúvel em meio aquoso, denominado de formazana. Esta transformação ocorre devido à ação de enzimas succinato-desidrogenases, presentes nas mitocôndrias ativas, que são capazes de clivar o anel de tetrazólio (DENIZOT & LANG, 1986; MOSMANN, 1983; TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987).

As suspensões celulares foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades contendo quantidade de células pré-determinadas, conforme apresentado na Tabela 1 (página 19). As placas foram incubadas em atmosfera úmida, a 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, por 24 horas. As amostras solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) foram diluídas em meio de cultura suplementado com 1% SFB (MOSMANN, 1983; TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987). As diluições das substâncias variaram entre 280 e 7,5 x 10<sup>-5</sup> µg/ml. Após a formação da monocamada celular na superfície das cavidades, o meio de cultura foi removido e 100 µL das soluções diluídas das amostras juntamente com 100 µL de meio de cultura enriquecido com 1% de SFB foram adicionados e as placas incubadas sob a mesma condição atmosférica (MOSMANN, 1983; TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987). O volume das amostras foi calculado para que a quantidade de DMSO por poço não excedesse 0,02% (XU et al., 2006).

Decorridas 72 horas da adição das amostras, o meio de cultura foi removido, 28 µL da solução do MTT (2,0 mg/mL em PBS) foi adicionada em cada cavidade e as placas foram novamente incubadas, por 120 minutos. Ao término desse período, foram adicionados 138 µL de DMSO em todas as cavidades e as placas foram agitadas em agitador de placas durante 15 minutos para que a formazana formada fosse dissolvida (MOSMANN, 1983; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). A quantificação da formazana obtida pela redução do sal de tetrazólio nas células viáveis, foi realizada no leitor de microplacas VICTORTM X3 (Perkin Elmer®) empregando o *software WorkOut 2.5*, a 490 nm. A multiplicação celular foi comparada com controle celular.

A toxicidade celular foi expressa em termos de concentração citotóxica a 50% (CC<sub>50</sub>). A porcentagem citotóxica foi calculada como  $[(A-B)/A] \times 100$ , onde A e B são as densidades óticas a 490nm (DO<sub>490</sub>) das cavidades onde estão presentes células não tratadas (A) e tratadas (B), respectivamente.

#### **5.1.4. Análise estatística dos dados**

Os dados dos ensaios de citotoxicidade foram avaliados segundo suas médias e desvios-padrão. A concentração citotóxica a 50% foi determinada em comparação com o controle, obtidos a partir de regressão não-linear. Estas análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico do *GraphPad Prism 5.04*.

## **5.2. Avaliação da atividade antiviral**

### **5.2.1. Triagem antiviral**

#### **5.2.1.1. Vírus**

O ZIKV foi uma amostra gentilmente cedida pela professora Dr. Erna Kroon, do Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### **5.2.1.2. Preparo das suspensões virais**

O ZIKV foi replicado em células C6/36 para gerar estoques de trabalho durante 5 dias a 28°C. O sobrenadante da cultura de células infectadas foi recolhido decorridos os cinco dias, e clarificado por centrifugação a 4.000 RPM na incubadora e refrigeradora B.O.D Thoth, durante 10 minutos à 4°C e então foi aliquoteado e armazenado a -70 ° C como reserva de vírus até à sua utilização.

As linhagens celulares C6/36 e Vero foram as escolhidas para multiplicação e titulação do ZIKV, respectivamente. As células C6 / 36 têm sido caracterizadas por possuírem maiores rendimentos do vírus ZIKV, mostrando serem muito susceptíveis a infecção viral pelo ZIKV, e permitindo assim a produção de estoques de vírus altamente concentrados e isentos da maioria dos contaminantes celulares.

#### **5.2.1.3. Determinação do título infeccioso viral por TCID<sub>50</sub>**

TCID<sub>50</sub> é definida como a diluição de vírus exigida para infectar 50% da cultura celular. O cálculo informa a quantidade de unidades infecciosas presentes na suspensão original de vírus, pela diluição de vírus em que ocorre o efeito citopático (ECP) em 50% das células (REED & MUENCH, 1938).

Após o período de incubação (24 horas), para formação da monocamada de células Vero, foi feita a infecção com a suspensão viral, contendo em cada poço 100 µL de cada diluição em meio DEMEM 1% SFB. Os estoques virais foram diluídos ( $10^{-1}$  a  $10^{-18}$ ) e inoculados em monocamadas de células Vero implantadas em placas de 96 poços com confluência de aproximadamente 85% ( $2 \times 10^4$  células por poço), mantendo 3 colunas não infectadas para controle celular. As placas foram então incubadas a 37°C (CO<sub>2</sub> a 5%) e o ECP foi monitorado. O ECP foi registrado a cada período de 24 horas, durante 72 horas, observando-se o controle de células.

#### **5.2.1.4. Triagem da atividade antiviral pela técnica colorimétrica do MTT**

Foram preparadas soluções estoque das amostras, em DMSO, as quais foram avaliadas em concentrações não citotóxicas.

As monocamadas de células Vero foram cultivadas em placas de 96 cavidades ( $2 \times 10^4$ ). Após 24 horas de incubação em 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ , o meio de cultura (DMEM 5% SFB) foi removido e 100  $\mu\text{l}$  das diluições das amostras foram adicionadas em cada cavidade, juntamente com 100  $\mu\text{l}$  da suspensão viral. Em seguida, as culturas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ , por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pela técnica colorimétrica do MTT (MOSMANN, 1983). O sobrenadante foi removido e, em seguida, foram adicionados 28,0  $\mu\text{l}$  de uma solução de MTT (2,0 mg/ml em PBS), em cada cavidade. As placas foram incubadas por 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  e, após este tempo de incubação, foram adicionados 132,0  $\mu\text{l}$  de DMSO, em cada cavidade, para dissolver os cristais de formazana. As placas foram mantidas em agitação, por 15 minutos (Shaker New Brunswick Scientific C24) e a densidade ótica foi determinada em 490 nm ( $\text{DO}_{490}$ ), em leitor de microplacas.

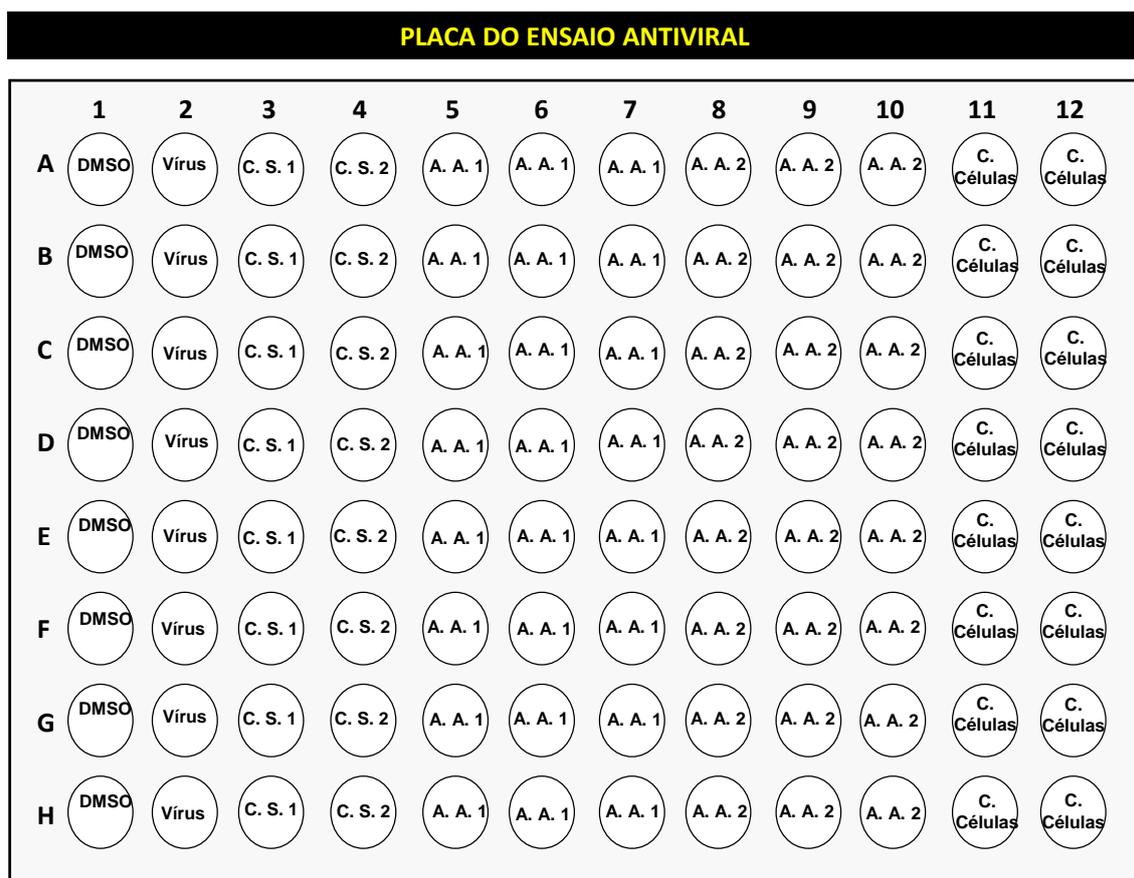
Para a realização deste experimento, foram utilizados os seguintes controles:

**Controle de células:** poços contendo somente células, acrescidas do meio de cultura DMEM 1% SFB. Utilizado para avaliar o comportamento das células sem que as mesmas tivessem contato com qualquer interferente durante o período de incubação. Com isso, os poços reservados para esse controle serviram de padrão para comparação com aqueles em que fossem observados alguma atividade citotóxica.

**Controle de vírus:** poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM 1% SFB e de suspensão de vírus sem nenhum tratamento. Utilizando como referência para análise da atividade citopática provocada pelo vírus durante o período de incubação das placas.

**Controle de vírus com DMSO:** Poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM 1% SFB e DMSO. Foi utilizado para avaliar se havia influência do solvente utilizado para diluição das amostras no meio de cultivo e se o mesmo poderia apresentar alguma potencial atividade antiviral aparente.

**Controle de Citotoxicidade dos compostos utilizados:** Poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM 1% SFB e as diluições das concentrações em que os respectivos compostos foram utilizados. Este controle foi feito para avaliar se haveria alguma possível atividade citotóxica das substâncias nas concentrações testadas. Um desenho representativo do teste antiviral esta é mostrado, a seguir:



**Figura 6:** Representação esquemática da placa utilizada no método do MTT na avaliação da atividade antiviral das substâncias selecionadas contra *Zika vírus*.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Determinação da concentração citotóxica 50 % (CC<sub>50</sub>)

Para a determinação das respectivas CC<sub>50</sub>, as vinte e três substâncias foram solubilizadas em DMSO na concentração de 280 a 40 µg/mL. Sendo testadas 8 concentrações de cada composto que variaram de 280 a 7,5 x 10<sup>-5</sup> µg/mL.

A citotoxicidade das substâncias foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico do MTT utilizando três linhagens celulares tumorais de humanos, HepG-2 (carcinoma hepático), TOV-21G (adenocarcinoma de ovário) e T 24 (bexiga urinária), além de duas linhagens celulares de origem não tumoral, sendo uma derivada de rim de hamster (BHK-21) e a Vero, uma linhagem celular derivada de rins de macaco verde africano. Os resultados das concentrações citotóxicas a 50% (CC<sub>50</sub>) estão apresentados na tabela 2, a seguir.

**Tabela 2:** Citotoxicidade (BHK-21, HepG-2, TOV-21G e T 24), e respectivos desvios padrão (n=3), das substâncias pelo ensaio colorimétrico do MTT.

Amostra	CC <sub>50</sub> (µg/mL)				
	BHK-21	Vero	HepG-2	TOV-21G	T 24
<b>NQ 1</b>	15,5 ±1,43	110,2 ±1,26	250,6 ±1,39	25,7 ±1,19	231,8 ±1,57
<b>NQ 2</b>	0,9 ±1,65	0,0001 NA	0,002 NA	3,3 ±1,45	2,2 ±2,10
<b>NQ 3</b>	101,3 ±1,32	56,5 ±1,32	110,7 ±1,36	135,3 ±1,97	132,9 ±1,47
<b>NQ 4</b>	18,1 ±1,24	40,5 ±1,30	63,6 ±1,34	26,9 ±1,19	14,0 ±1,44
<b>NQ 5</b>	75,6 ±1,53	147,2 ±1,54	500,0 NA	66,1 ±1,47	500,0 NA
<b>NQ 6</b>	5,4 ±1,55	29,1 ±1,24	515,7 ±1,33	18,0 ±1,17	53,3 ±1,17
<b>NQ 7</b>	24,8 ±1,20	83,3 ±1,48	26,6 ±1,88	5,8 ±1,31	11,3 ±2,00
<b>NQ 8</b>	0,5 ±1,59	77,3 ±1,94	1,7 ±1,34	0,4 ±2,64	4,0 ±1,21
<b>NQ 9</b>	0,3 ±2,00	0,0005 NA	3,4 ±1,36	17,6 ±1,24	0,0002 NA
<b>NQ 10</b>	22,6 ±1,29	1,1 ±1,70	3,7 ±1,34	1,9 ±1,41	3,7 ±1,19
<b>NQ 11</b>	26,1 ±1,33	14,7 ±1,32	6,4 ±1,27	0,5 ±1,99	27,8 ±1,43
<b>NQ 12</b>	45,4 ±1,35	39,4 ±1,23	52,5 ±1,44	20,9 ±1,25	19,7 ±1,27
<b>NQ 13</b>	86,2 ±1,30	165,1 ±1,57	68,7 ±1,35	5,0 ±1,75	14,3 ±1,09
<b>NQ 14</b>	285,6 ±1,78	62,3 ±1,30	201,0 ±1,32	24,1 ±1,41	63,9 ±1,28
<b>NQ 15</b>	45 ±1,19	36,4 ±1,24	34,2 ±1,19	31,6 ±1,19	48,3 ±1,19
<b>NQ 16</b>	100,8 ±1,19	105,5 ±1,31	13,1 ±1,16	23,7 ±1,25	39,1 ±1,29
<b>NQ 17</b>	58,5 ±1,27	463,9 ±1,80	3,6 ±1,32	12,1 ±1,14	11,9 ±1,27
<b>NQ 18</b>	31,3 ±1,20	121,1 ±1,24	23,8 ±1,14	13,8 ±1,20	9,0 ±1,15
<b>NQ 19</b>	178,7 ±1,37	189,6 ±1,64	25,7 ±1,17	4,8 ±1,26	14,9 ±1,16
<b>NQ 20</b>	19,2 ±1,89	12,7 ±1,42	18,1 ±1,25	2,6 ±1,31	2,5 ±1,32
<b>NQ 21</b>	37,9 ±1,23	385,0 ±1,96	24,2 ±1,22	8,5 ±1,23	11,7 ±1,13
<b>NQ 22</b>	44,9 ±1,20	87,4 ±1,41	22,5 ±1,23	1,6 ±1,46	10,9 ±1,20
<b>β-Lap.</b>	6,8 ±1,37	2,1 ±1,40	9,3 ±1,54	1,1 ±1,25	1,0 ±1,32

A avaliação da citotoxicidade da  $\beta$ -lapachona que foi testada na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ , controle positivo deste estudo, apresentou concentração citotóxica média de 6,8 ( $\pm 1,37$ ); 2,1 ( $\pm 1,40$ ); 9,3 ( $\pm 1,54$ ); 1,1 ( $\pm 1,25$ ) e 1,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $\pm 1,32$ ) para as linhagens celulares BHK-21, Vero, HepG-2, TOV-21G e T 24 respectivamente.

Certamente, a biodiversidade de plantas e seus derivados tornam detentores de substâncias que podem ser usadas para o tratamento de neoplasias. De fato, nossos resultados corroboram com essa hipótese, visto que dentre as 23 substâncias testadas neste estudo, apenas 4 (NQ 1, NQ 3, NQ 5 e NQ 14) não apresentaram efeito citotóxico apreciável contra as linhagens utilizadas, sendo que 5 (NQ 2, NQ 8, NQ 9, NQ 10 e NQ 11) diminuíram de forma expressiva a viabilidade celular da maioria das linhagens de células tumorais.

Diante de análises dos resultados obtidos na tabela 2, a substância NQ 2 foi consideravelmente citotóxica nas linhagens celulares em todas as doze concentrações testadas (120 a  $7,5 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/mL}$ ), sendo que, o maior valor de  $\text{CC}_{50}$  (3,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi para a linhagem celular TOV-21G. Em todas as linhagens celulares de origem tumoral a citotoxicidade dessa substância foi expressiva, porém, vale destacar o baixo valor da  $\text{CC}_{50}$  de 0,002  $\mu\text{g/mL}$  para a linhagem de células tumorais HepG-2. As substâncias NQ 8, NQ 9, NQ 10 e NQ 11, também apresentaram atividade citotóxicas elevadas contra as linhagens celulares testadas neste estudo, como mostra suas respectivas  $\text{CC}_{50}$  na tabela 2. A citotoxicidade dos compostos NQ 8 e NQ 11 podem estar relacionado a sua lipossolubilidade, sendo relatado na literatura que estruturas que possuem substituintes alifáticos de cadeia carbônica longa apresentam maior citotoxicidade, o que deve estar associado ao maior acúmulo destes compostos pelas células (SILVA, et al., 2016).

A substância NQ 9, uma furanonaftoquinona, apresentou elevada citotoxicidade para as três linhagens de células tumorais com  $\text{CC}_{50}$  variando entre 17,6 e 0,0002  $\mu\text{g/mL}$ . Furanonaftoquinonas são descritas na literatura como substância que apresentam elevada atividade citotóxica. O composto NQ 10 também mostrou ser bastante citotóxico para as células tumorais com  $\text{CC}_{50}$  variando de 2,0 a 3,7  $\mu\text{g/mL}$ , o qual possui em sua estrutura a função epóxido, sendo esta caracterizada por induzir citotoxicidade a diversas substâncias.

O composto menos citotóxico deste estudo foi a substância NQ 5, que apresentou valores de  $\text{CC}_{50}$  maiores que 500  $\mu\text{g/mL}$  em duas linhagens celulares, HepG-2 e T 24.

**Tabela 3:** Valores da  $CC_{50}$  para linhagem celular MRC-5 e para as linhagens celulares de origem tumoral, na qual as substâncias foram mais tóxicas e seus respectivos índices de seletividade.

Substâncias	Linhagem Tumoral	MRC-5	IS
	µg/mL		
NQ 2 (Hep G-2)	0,002	0,6	300,0
NQ 8 (TOV-21G)	0,4	2,0	5,0
NQ 9 (T 24)	0,0002	0,0003	1,5
NQ 10 (TOV-21G)	1,9	0,7	0,3
NQ 11 (TOV-21G)	0,5	7,3	14,6
β-Lapachona (T 24)	1,0	125	125,0

IS (Índice de Seletividade): MRC-5 / Linhagem tumoral.

Os resultados dos IS apresentados na Tabela 3 mostraram que das cinco substâncias analisadas três apresentaram índice de seletividade maior que cinco frente às células MRC-5. Destaca-se a alta seletividade da substância NQ 2, a qual mostrou um índice de seletividade (IS) de 300,0 vezes para a linhagem HepG2. Assim, quando comparamos este resultado com o controle positivo a β-lapachona (IS de 125,0) para a mesma linhagem celular podemos sugerir que esta substância é um potencial agente citotóxico para carcinoma hepato celular. Experimentos futuros empregando técnicas de biologia molecular aliados a ensaios *in vivo* poderão confirmar este achado. Sendo assim, esta substância se torna uma candidata para pesquisas mais aprofundadas na busca de um novo agente antitumoral.

## 6.2. Ensaio antiviral com os compostos selecionados

Após a determinação das concentrações de uso não citotóxicas ideais, realizou-se ensaios tratando as células com oito concentrações à partir das concentrações não citotóxicas para cada composto e infectando as células Vero com o ZIKV.

Os compostos avaliados pela técnica de redução de MTT frente ao ZIKV não mostraram inibir a replicação deste, uma vez que nas concentrações não citotóxicas

para as células o efeito antiviral não foi significativo em relação ao controle celular, como observado na figura 7 e tabela 4.

PLACA DO ENSAIO ANTIVIRAL												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,109	0,089	0,998	1,241	0,106	0,132	0,123	0,210	0,230	0,217	1,902	2,021
B	0,097	0,101	1,877	1,689	0,114	0,141	0,123	0,220	0,215	0,186	2,150	1,982
C	0,095	0,096	1,967	1,929	0,124	0,162	0,137	0,249	0,196	0,176	2,043	2,038
D	0,098	0,100	2,033	2,062	0,147	0,123	0,189	0,241	0,232	0,193	2,400	1,970
E	0,112	0,101	2,105	2,078	0,118	0,133	0,172	0,239	0,195	0,162	2,161	2,245
F	0,100	0,098	2,138	2,135	0,113	0,116	0,138	0,183	0,182	0,160	2,036	2,013
G	0,101	0,100	2,210	2,154	0,115	0,118	0,148	0,188	0,216	0,193	2,065	1,892
H	0,098	0,101	2,263	2,317	0,111	0,113	0,143	0,189	0,180	0,188	1,986	1,822

**Figura 7:** Representação esquemática dos resultados obtidos pelo método do MTT na avaliação da atividade antiviral das substâncias selecionadas contra *Zika vírus* e seus respectivos valores.

Os valores representados foram analisados em absorvância (DO 490) conforme distribuição relacionada abaixo:

- 1: Estão representados os poços com células onde foram adicionados DMSO e *Zika vírus*;
- 2: Controle de vírus, no qual os poços contém *Zika vírus* e células.
- 3: Controle de células tratadas e não infectadas do composto 1. Nesse esquema, os valores nos mostra que o composto não foi citotóxico as células.
- 4: Controle de células tratadas e não infectadas do composto 1. Nesse esquema, os valores nos mostra que o composto não foi citotóxico as células.
- 5, 6 e 7: Poços onde foi analisado a atividade antiviral frente ao *Zika vírus* do composto 1. Estes contém células, composto e vírus.
- 8, 9, e 10: Poços onde foi analisado a atividade antiviral frente ao *Zika vírus* do composto 2. Estes contém células, composto e vírus.
- 11 e 12: Controle de células. Nestes poços contém apenas células e meio de cultura DMEM 1% SFB.

**Tabela 4:** Citotoxicidade (Vero) e atividade antiviral (ZIKV) das substâncias analisadas frente ao ZIKV pela técnica colorimétrica do MTT. (NA= não ativo).

<b>Substâncias Analisadas</b>	<b>Vero/CC<sub>50</sub> 72 horas (µg/mL)</b>	<b>Zika vírus/CC<sub>50</sub> 72 horas</b>
<b>NQ 1</b>	110,2 ±1,26	NA
<b>NQ 3</b>	56,5 ±1,32	NA
<b>NQ 10</b>	1,1 ±1,70	NA
<b>NQ 13</b>	165,1 ±1,57	NA
<b>NQ 16</b>	105,5 ±1,31	NA
<b>NQ 17</b>	463,9 ±1,80	NA
<b>NQ 18</b>	121,1 ±1,24	NA
<b>NQ 19</b>	189,6 ±1,64	NA
<b>NQ 20</b>	12,7 ±1,42	NA
<b>NQ 21</b>	385,0 ±1,96	NA
<b>NQ 22</b>	87,4 ±1,41	NA

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Atividade antitumoral

A natureza sempre despertou no homem um fascínio, não só por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado, mas também pelos recursos oferecidos para sua alimentação, manutenção e também para os cuidados básicos de saúde. Por séculos, plantas medicinais formaram a base dos medicamentos tradicionais da China (CHANG & BUT, 1986), da Índia (DEV, 1999), África e muitas outras civilizações (SCHULTES & RAFFAUF, 1990).

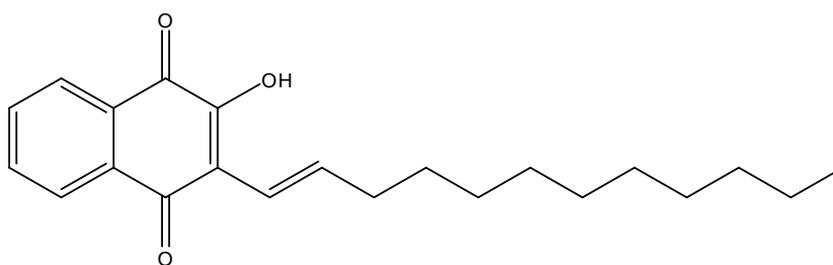
Estudos realizados para a descoberta de compostos ativos usualmente iniciam-se pela análise da citotoxicidade destes compostos em modelos de células. Neste trabalho adotou-se o ensaio do MTT para análise de substâncias sintéticas cujo protótipo é um produto natural (Lapachol) frente a quatro linhagens celulares. O ensaio do MTT é uma técnica colorimétrica, sensível e quantitativa, vastamente utilizada para a avaliação *in vitro* da viabilidade celular e citotoxicidade, bem como no estudo de aditivos, micotoxinas e fármacos. Tal análise é feita baseando-se numa reação biológica, em células viáveis, catalisada por desidrogenases mitocondriais que reduzem o sal de tetrazólio, composto hidrossolúvel de coloração amarelo-pálido, à cristais de formazana. A absorvância da formazana, medida espectrofotometricamente, é diretamente correlacionada com o número de células metabolicamente ativas. Sendo assim, valores de absorvância altos indicam uma elevada produção de formazana (cor roxa), o que significa uma alta atividade enzimática e, conseqüentemente, um maior número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

A avaliação da citotoxicidade da  $\beta$ -lapachona, controle positivo deste estudo, apresentou concentração citotóxica elevada em todas as linhagens celulares utilizadas no presente trabalho, corroborando dados da literatura para esta substância. Naftoquinonas e antraquinonas são conhecidas por sua vasta gama de propriedades farmacológicas, por exemplo, são ativos contra parasitas, bactérias e fungos, (IBIS, C., et al.; 2013) e suas propriedades antitumorais (SUNASSEE S. N. et al., 2013) (KONGKATHIP B. et al., 2013) tendo atraído crescente interesse de pesquisa. A literatura registra a ocorrência de Lapachol,  $\alpha$ - e  $\beta$ - Lapachona, além de furanonaftoquinonas isoladas de várias espécies dos gêneros *Tabebuia*, *Tecoma*, *Handroanthus* (THOMSON, 1971; OLIVEIRA et al., 1990; FONSECA, BRAGA & SANTANA, 2003; HUSSAIN et al., 2007). Os pesquisadores relacionam a atividade antitumoral demonstrada por diversas espécies desses gêneros à presença das

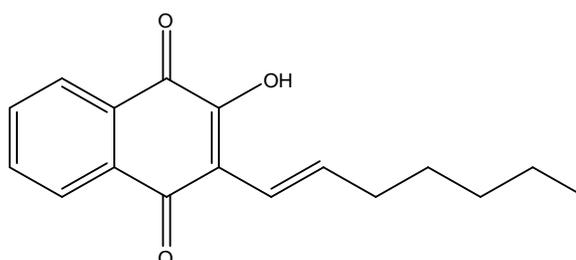
naftoquinonas, como o lapachol (FONSECA, BRAGA & SANTANA, 2003) e a  $\beta$ -lapachona, mas também, a outras classes de produtos naturais como as lignanas (HIRSCHMANN & PAPASTERGIU, 2003).

A  $\beta$ -lapachona exibe *in vitro* atividade citotóxica frente a diferentes linhagens de células, principalmente células dos cânceres de pulmão, mama, colo-retal, próstata, melanoma e leucemia (Li, Y. Z., et al., 1999), o que mostra o amplo espectro de atividade deste composto. Além disso, o uso combinado de  $\beta$ -lapachona com outros fármacos, como por exemplo, o taxol, foi efetivo contra tumores humanos de ovário e próstata (FERREIRA et al., 2010).

Os resultados da relação estrutura química versus atividade biológica demonstram que na farmacologia de naftoquinonas o caráter hidrofóbico é um importante fator relacionado à atividade citotóxica dessa classe de substâncias. Esse tipo de investigação pode direcionar a síntese de novas naftoquinonas com essa característica e potencial atividade anticâncer (VERMA, 2006). Diante do fato do potencial caráter hidrofóbico de uma substância gerar uma maior citotoxicidade, pode-se concluir que os resultados deste trabalho estão coerentes com o descrito na literatura, uma vez que as substâncias, NQ 8 e NQ 11, com tal característica, mostraram citotoxicidades em todas as linhagens celulares testadas. As maiores toxicidades das substâncias NQ 8 e NQ 11 foram na linhagem celular TOV-21, onde apresentaram CC<sub>50</sub> de 0,4 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.



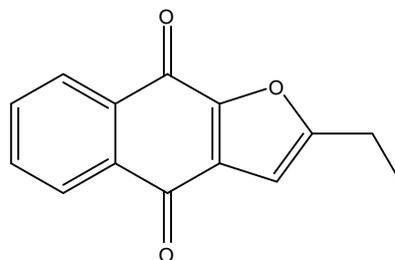
**Figura 8:** NQ 8: 2- (1-dodeceno-1-il) 3 – Hidroxi – naftalen – 1,4 – diona.



**Figura 9:** NQ 11: (E) – 2 – (hept-1-eno) 3 – hidroxi – naftalen – 1,4 – diona.

Em estudo recente, foi relatado que as maiores atividades citotóxicas estão associadas com substituintes alifáticos, ao passo que a presença de substituintes aromáticos ( $C_6H_5$ , 4-Me- $C_6H_4$ , 4-OMe- $C_6H_4$ ) conduz a compostos menos ativos. O maior comprimento dos substituintes alifáticos pode ser atribuído a maior acumulação celular destes derivados sintéticos, mostrando que os compostos lipofílicos são caracterizados por possuir atividade citotóxica elevada (SILVA, et al., 2016), o que podemos mostrar com os dados obtidos neste estudo, sendo as substâncias NQ 8 e NQ 11 altamente tóxicas para as células em que foram testadas. Os menores valores da  $CC_{50}$ , ainda podem estar relacionados a outros fatores que também influenciam a citotoxicidade, entre os quais, distribuição eletrônica e ligação de hidrogênio como resultado da natureza dos substituintes em  $C_{11}$  e no átomo de nitrogênio.

O composto NQ 9 apresentou citotoxicidade elevada contra linhagens de origem tumoral, principalmente frente às células T 24, na qual a  $CC_{50}$  foi de 0,0002  $\mu\text{g/mL}$ . Esse composto trata-se de uma furanonaftoquinona, as quais já tem sido relatadas na literatura de possuírem atividade citotóxica, como por exemplo os compostos 2-acetil furanonaftoquinona; 2-acetil-5-hidroxi e 2-acetil-8-hidroxi-furanonaftoquinona e (+)-8-hidroxi-2-(1-hidroxietil) furanonaftoquinona que apresentaram atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais: A-549 (Adenocarcinoma de pulmão humano), MCF-7 (Câncer de mama humano) e HT-29 (Carcinoma de cólon humano) (SAIZARBITORIA et al., 1997), mostrando que o resultado obtido corrobora com os dados presente na literatura.

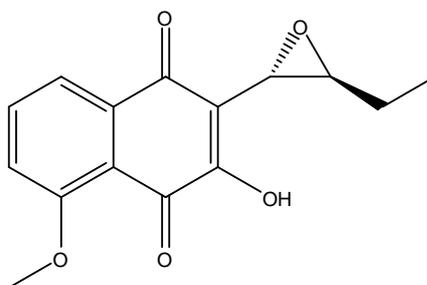


**Figura 10:** NQ 9: 2 – etil – nafto [2,3-b] furan – 4,9 – diona.

Neste estudo NQ 10, trata-se de uma molécula que possui em sua estrutura a função epóxido, a qual já é descrita por induzir efeitos tóxicos proeminentes. A naftoquinona NQ 10 apresentou alta inibição do crescimento das células tumorais que foram utilizadas no presente trabalho. Sua ação antiproliferativa foi evidenciada na linhagem celular TOV-21, apresentando  $CC_{50}$  de 1,9  $\mu\text{g/mL}$ .

Em estudo recente foi evidenciada a toxicidade da função epóxido, uma vez que o (-) Perilaldeído 8,9-epóxido, composto monoterpeneo contendo a função epóxido em sua estrutura, apresentou alta citotoxicidade quando comparado com outros

monoterpenos contendo diversos grupos funcionais em suas moléculas, com um valor de porcentagem de inibição variando de 96,32% a 99,89%, induzindo quase 100% de mortalidade nas células, a uma concentração de 25 µg / mL. As linhagens celulares nas quais o composto citado foi altamente tóxico, incluem três linhas de células tumorais humanas: HCT-116 (cólon), OVCAR-8 (ovário) e SF-295 (cérebro) (ANDRADE et al., 2015).



**Figura 11:** NQ 10: 2 - ((2S,3S) 3 - etil - oxiran - 2 - il) 3 - hidroxi - 5 - metoxi - naftalen - 1,4 - diona.

As naftoquinonas de origem natural contendo uma cadeia lateral prenila como a β-lapachona e o lapachol isoladas de espécies de Bignoniaceae e de Verbenaceae junto com outras naftoquinonas de Angiospermae, como os isômeros alcanina e chiconina (Boraginaceae), e as naftoquinonas hidroxiladas plumbagina e juglona (Droseraceae, Juglandaceae e Plumbaginaceae) têm sido objeto de intensa investigação. Sendo tanto em termos de avaliação de múltiplas atividades biológicas e quanto aos diferentes mecanismos de ação, como também de síntese de derivados, visando à obtenção de novos fármacos mais ativos ou seletivos para se estabelecer uma relação estrutura-atividade. Vale ressaltar que a etnofarmacologia e a quimiosistemática vêm se consolidando como instrumentos poderosos na descoberta de novos medicamentos de origem natural demonstrando a multidisciplinaridade da Química de Produtos Naturais (MACIEL et al., 2002).

Um importante critério na pesquisa de compostos ativos com potencial terapêutico contra o câncer, é determinar a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro. A citotoxicidade para MRC-5 e para as linhagens celulares de origem tumoral foram comparadas utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) para células MRC-5 e para as células de tumores. Assim, os resultados dos IS apresentados na Tabela 3 mostraram que as substâncias analisadas apresentaram certa seletividade frente às células MRC-5, exceto a amostra NQ 10. Resultado interessante foi obtido com a substância NQ 2, a qual mostrou um índice de seletividade de 300,0 vezes frente às células MRC-5.

## 7.2. Atividade antiviral

Sabe-se que apenas uma pequena fração do vasto reservatório de compostos disponíveis na natureza são explorados visando à descoberta de substâncias antivirais. Além disso, a disponibilidade limitada de drogas antivirais tem sido atribuída, parcialmente, à dificuldade de encontrar alvos ou drogas que eliminem o vírus sem prejudicar as células hospedeiras (COCK & KALT, 2010).

A rápida propagação de doenças virais emergentes e reemergentes, como por exemplo, a dengue e a infecção pelo ZIKV, tem incentivado a pesquisa para a descoberta de substâncias antivirais derivadas de produtos naturais que possam ser utilizadas para o tratamento dessas doenças que foram consideradas um problema mundial de saúde pela OMS (JASSIM & NAJI, 2003; CHATTOPADHYAY & NAIK, 2007; OMS, 2016).

Estudos químicos de espécies da tribo Tecomeae da família Bignoniaceae já levaram ao isolamento de metabólitos secundários pertencentes a diversas classes estruturais. O grupo químico mais característico de espécies desta tribo, as naftoquinonas, inclui representantes com atividade antiviral, como por exemplo, o lapachol, a julgona, a lawsona e outras (LAGROTTA et al., 1983; VANDER BERGHE et al., 1986; SANTOS, 1992; SILVA et al., 2002; SACAU et al., 2003).

Costa et al. (2013) demonstraram a atividade antiviral contra DENV2 frente ao tratamento de células Vero com piranonaftoquinonas isômeras do Lapachol,  $\beta$ - e  $\alpha$ -Lapachona, obtendo até 99% de inibição do vírus em concentrações de aproximadamente 100 $\mu$ M. Takegami et al. (1998) demonstraram atividade de furanonaftoquinonas contra o vírus da Encefalite Japonesa (Flavivirus) utilizando a concentração de 3  $\mu$ g/mL, o que mostra o potencial efeito destas estruturas quanto à atividade antiviral.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, observou-se que não houve atividade antiviral frente ao tratamento com nenhum dos compostos avaliados em relação ao controle celular não tratado. As substâncias sintéticas derivadas de naftoquinonas que foram selecionadas neste estudo para análise do teste antiviral, não mostraram valores de inibição contra o ZIKV nas concentrações em que estas não apresentaram citotoxicidade as células. Portanto, a taxa de crescimento, bem como o diâmetro e a porcentagem na viabilidade celular de células Vero, não foram alterados mediante o tratamento com os compostos.

Em um estudo fitoquímico recente, realizado por Brandão et al. (2017), de extratos etanólicos de *Fridericia formosa* (Bignoniaceae) de folhas, hastes e frutos foi

feito por ensaios *in vitro* pelo método do MTT, no qual pôde-se confirmar a importância das substâncias presentes nas Bignoniaceas frente à muitos vírus. Assim, destaca-se os vírus vaccínia Western Reserve (VACV-WR), herpes humano 1 (HSV-1), vírus da encefalomielite murina (EMCV) e vírus da dengue tipo 2 (DENV-2), os quais foram utilizados neste trabalho. De fato, todos os extratos etanólicos foram ativos contra DENV-2, HSV-1, e VACV-WR com melhores resultados para o extrato de frutas frente ao DENV-2 (SI > 38,2), mostrando assim o potencial efeito antiviral dos compostos presentes em extratos de espécies da família Bignoniaceae.

A recente pandemia mundial de ZIKV trouxe nocivas marcas a sociedade brasileira, sendo de extrema relevância uma necessidade urgente de intervenções terapêuticas para contornar o impacto do ZIKV na saúde global. Anticorpos monoclonais, vacina inativada purificada com ZIKV, vacina plasmídica de DNA e, principalmente os medicamentos antivirais, com destaque para o sofosbuvir, que vem ganhando notoriedade em relação a sua promessa como terapêutica devido à capacidade de obter proteção substancial contra a infecção por ZIKV em modelos de desafio animal, bem como *in vitro* (BRAIRA WAHID et al., 2017).

Dentro deste contexto, pode inferir-se que mesmo com os resultados negativos obtidos para a atividade antiviral nesse estudo, a literatura registra várias atividades antivirais das naftoquinonas, as quais já são conhecidas pela sua vasta gama de propriedades farmacológicas. Além disso, espera-se que com a continuação deste trabalho possamos explorar e registrar os potenciais efeitos desta classe de substâncias.

## 8. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos a partir dos ensaios descritos, podemos concluir que, apesar das substâncias selecionadas para o teste de atividade antiviral não terem mostrado resultados positivos frente ao ZIKV, o composto NQ 2 foi altamente citotóxico e seletivo contra células tumorais Hep-G2.

Os resultados deste trabalho fortalecem às evidências do quão é importante a pesquisa e descoberta de compostos biologicamente ativos encontrados em derivados de produtos naturais que inibam a atividade proliferativa de células tumorais. Certamente, serão necessários mais estudos para desvendar os mecanismos de ação, toxicidade e também a realização de ensaios *in vivo* e ensaios clínicos para comprovar os resultados de citotoxicidade das naftoquinonas desse estudo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBINK, P., LAROCCA, R.A., DE LA BARRERA, R.A., BRICAULT, C.A., MOSELEY, E.T., BOYD, M., KIRILOVA, M., LI, Z., NG'ANG'A, D., NANAYAKKARA, O., NITYANANDAM, R., MERCADO, N.B., BORDUCCHI, E.N., AGARWAL, A., BRINKMAN, A.L., CABRAL, C., CHANDRASHEKAR, A., GIGLIO, P.B., JETTON, D., JIMENEZ, J., LEE, B.C., MOJTA, S., MOLLOY, K., SHETTY, M., NEUBAUER, G.H., STEPHENSON, K.E., PERON, J.P.S., ZANOTTO, P.M.D.A., MISAMORE, J., FINNEYFROCK, B., LEWIS, M.G., ALTER, G., MODJARRAD, K., JARMAN, R.G., ECKELS, K.H., MICHAEL, N.L., THOMAS, S.J. AND BAROUCH, D.H. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science* 353, 1129, 2016.
- ALCANTARA, S.; LOHMANN, L.G. Evolution of floral morphology and pollination system in Bignoniaceae (Bignoniaceae). *American Journal of Botany*. 97:782–796, 2010.
- ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. *Ciência Animal*. v.18, p.25-31, 2008.
- BALUNAS, M. J., & KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*, 78(5), 431-441, 2005.
- BRANDÃO, G. C.; G.C.; KROON, E. G.; DOS SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; DE OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1 *Letters in applied microbiology* 51 (4), 469-476.
- BRANDÃO, G.C.; KROON, E. G.; DOS SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; DE OLIVEIRA, A. B. (2010b). Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. Part 2. Screening Bignoniaceae species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20, 742-750, 2010a.
- BRANDÃO, G.C. Fitoquímica triagem antiviral e fracionamento biomonitorado de espécies vegetais da biodiversidade brasileira. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2010c. 326 p. (Tese, Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

- BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; MATOS, A. W.; JD SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B.; Bioguided isolation of an antiviral compound from *Xylophragma myrianthum* (Cham.) Sprague (Bignoniaceae Juss). *Revista Fitos Eletrônica* 8 (2), 125-136.
- BRANDÃO, G.C.; ERNA G. KROON, JOSÉ D. SOUZA FILHO, AND ALAÍDE BRAGA OLIVEIRA, "Antiviral Activity of *Fridericia formosa* (Bureau) L. G. Lohmann (Bignoniaceae) Extracts and Constituents," *Journal of Tropical Medicine*, vol. 2017, Article ID 6106959, 11 pages, 2017. doi:10.1155/2017/6106959
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*. 55: 37–39, 2003.
- CALVET, G. ET AL. Detecção e sequenciamento do vírus Zika de líquido amniótico de fetos com microcefalia no Brasil: um estudo de caso. *Lancet Infect Dis* 16, 653-660, 2016.
- CAO-LORMEAU, VM ET AL. Surto de Síndrome de Guillain-Barré associada à infecção pelo vírus Zika na Polinésia Francesa: um estudo de caso-controle. *Lancet* 387, 1531-1539, 2016.
- CERBINO-NETO, J. ET AL. As manifestações clínicas da infecção por vírus de Zika, Rio de Janeiro, Brasil, 2015. *Emerg Infect Dis* 22, 2016.
- CHAN, E.H.; SAHAI, V.; CONRAD, C.; BROWNSTEIN, J.S. Using Web Search Query Data to Monitor Dengue Epidemics: A New Model for Neglected Tropical Disease Surveillance. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, 5(5): e 1206. doi:10.1371/journal.pntd.0001206, 2011.
- CHANG, H. M.; BUT, P. P. H. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*. World Scientific Inc. 1986; 1(2).
- CHATTOPADHYAY D, NAIK TN. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini Rev Med Chem*. 7(3):275-301, 2007.
- CHEN LH, HAMER DH. Vírus de Zika: propagação rápida no hemisfério ocidental. *Ann Intern Med* 2016; 164 : 613-615.
- CHUTAPUTTI, A. Efeitos adversos e outros aspectos de segurança dos medicamentos antivirais hepatite C. *J Gastroenterol Hepatol* 15, E156-163, 2000.
- CIPRIANI, F.A. Aspectos quimiotaxonômicos da família Bignoniaceae. Dissertação de Mestrado, Museu Nacional, UFRJ. 73f, 2006.

- COCK I, Kalt FR. A modified MS2 bacteriophage plaque reduction assay for the rapid screening of antiviral plant extracts. *Pharmacognosy*; 2(4):221-8, 2010.
- CUNHA, M. S. S.; ALVES F. C.; ALVES, G. M. C.; MONTEIRO, D. B.; MEDEIROS F. P. M. M.; ROLIM, P. J. Beta-lapachona: desenvolvimento e validação de metodologia analítica para nova alternativa terapêutica antineoplásica. *Revista Brasileira de Farmácia*. v.86, p.39-43, 2005.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.
- DICK, G. W.; COZINHA, S. F.; HADDOW, A. J.; Vírus Zika, I. isolamentos e especificidade sorológica. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46, 509-520, 1952.
- FARIA, N. R ET AL. Vírus Zika nas Américas: achados epidemiológicos e genéticos iniciais. *Ciência* 352, 345-349, 2016.
- FERREIRA, S. B; GONZAGA, D. T. G; SANTOS, W. C; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA V. F.  $\beta$ -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Revista Virtual de Química*. v.2, p.140-160, 2010.
- FOGLIO, M. A.; SOUSA, I. M. O. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. Divisão de Fitoquímica, CPQBA/ UNICAMP, 2006.
- FONSECA, S. G.C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol - Química, farmacologia e métodos de dosagem. *Revista Brasileira de Farmácia*. v.84, p.9-16, 2003.
- FUCK, S. B.; MING, L. C.; et al. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por moradores da área urbana de Bandeirantes, PR, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. 26: 291–296, 2005.
- GAUNT, M. W.; SALL, A. A.; DE LAMBALLERIE, X.; FALCONAR, A. K; DZHIVANIAN, T. I.; GOULD, E. A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology*. v.82, p.1867-1876, 2001.
- GENTRY, A.H. Bignoniaceae-Part I (Crescentieae and Tourretieae). *Flora Neotropica*. Monograph 25. The New York Botanical Garden, New York, 130p, 1980.

- GOULART, M. O. F.; LIMA, N. M. F.; SANT'ANA, A. E. G.; FERRAZ, P. A. L.; CAVALCANTI, J. C. M.; FALKOWSKI, P.; OSSOWSKI, T.; LIWO, A. Electrochemical studies of isolapachol with emphasis on oxygen interaction with its radical anions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. v.566, p.25-29, 2004.
- GOVERO J, ESAKKY P, SCHEAFFER SM, ET AL . A infecção do vírus Zika danifica os testículos em camundongos. *540*: 438-442, 2016.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the links between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 12: 3864-3874, 1991.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 3(4), 376-396,1990.
- HIRSCHMANN, G.S.; PAPASTERGIOU, F. Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug "Tayi Pytá" (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). *Journal of Biosciences*, v. 58, n. 7-8, p. 495-501, 2003.
- HUANG, L.; PARDEE, A. B. Beta-lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Molecular Medicine*. 5, 711, 1999.
- HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEN, I. R. Lapachol: an overview. *Special Issue Reviews and Accounts*. v.2, p.145-171, 2007.
- IBIS, C.; TUYUN, A. F.; BAHAR, H.; AYLÁ, S. S.; STASEVYCH, M. V.; MUSYANOVYCH, R. Y.; KOMAROVSKA-POROKHNYAVETS, O.; NOVIKOV, V. *Med. Chem. Res.* 22, 2879, 2013.
- INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) – (Brasil). Disponível em:<[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)> Acesso em: 24 mai. 2016.
- INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) – (Brasil). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>> Acesso em: 24 mai. 2016.
- INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) – (Brasil). Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2015.

- Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>> Acesso em: 24 mai. 2016.
- JASSIM SA, NAJI MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol.* 95(3):412-27, 2003.
- KONGKATHIP, B.; AKKARASAMIYO, S.; HASIPATAN, K.; SITTIKUL, P.; BOONYALAI, N.; KONGKATHIP, N. EUR. J. *Journal of Medicinal Chemistry.* 60, 271, 2013.
- LAROCCA, R.A., ABBINK, P., PERON, J.P.S., DE A. ZANOTTO, P.M., IAMPIETRO, M.J., BADAMCHI - ZADEH, A., BOYD, M., NG'ANG'A, D., KIRILOVA, M., NITYANANDAM, R., MERCADO, N.B., LI, Z., MOSELEY, E.T., BRICAULT, C.A., BORDUCCHI, E.N., GIGLIO, P.B., JETTON, D., NEUBAUER, G., NKOLOLA, J.P., MAXFIELD, L.F., DE LA BARRERA, R.A., JARMAN, R.G., ECKELS, K.H., MICHAEL, N.L., THOMAS, S.J. AND BAROUCH, D.H. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* 536, 474 -478, 2016.
- LI, Y. Z.; LI, C. J.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. *Molecular Medicine.* 5, 232, 1999.
- LÓPEZ, L. I. L.; FLORES, Q. F. B.; BELMARES, S. Y. S.; GALINDO, A. S. Naphthoquinones: biological properties and synthesis of lawsone and derivatives-a structured review. *Vitae.* v.21, p.248-258, 2014.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova,* v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- MACIEL, M. A. M.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova.* 25: 429–438, 2002.
- MA W, LI S, MA S, ET AL. O vírus Zika provoca danos nos testículos e leva a infertilidade masculina em camundongos. 167 : 1511-1524.e15, 2016.
- MINER JJ, SENE A, RICHNER JM, ET AL . A infecção do vírus Zika em camundongos provoca panuveíte com derramamento de vírus em lágrimas. 16 : 3208-3218, 2016.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quím Nova.;* 24(1):105-11, 2001.

- MORRISON, R. K.; BROWN, D. E.; OLESON, J. J.; COONEY, D. A. Oral toxicology studies with lapachol. *Toxicology applied Pharmacology*. 17: 01–11, 1970.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55–63, 1983.
- MUSSO, D. & GUBLER, D. J. Virus Zika. *Clinical Microbiology Reviews*. 29, 487-524, 2016.
- MUSSO, D.; BAUD, D.; GUBLER, D.J. Zika virus: what do we know? *Clinical Microbiology and Infection*. 22 (6), 494–496, 2016.
- MUSSO, D. ET AL. Transmissão sexual potencial de vírus Zika. *Emerg Infect Dis* 21, 359-361, 2015.
- NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *Journal of Medicinal Chemistry*. 51(9):2589–99, 2008.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*. 66 (7):1022–37, 2003.
- NORMILE, D. “Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts”. *Science* 342 (6157): 415, 2013.
- OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Química Nova*. v.13, p.302-307, 1990.
- ONO, S. J. L.; EIGENBRODE, A. A.; PAVLOV, KHARECHA P.; RUMBLE, D.; III, J.F. KASTING; AND K. H. FREEMAN: New insights into Archean sulfur cycle from mass-independent sulfur isotope records from the Hamersley Basin, Australia. *Earth and Planetary Science Letters*. 213, 15-30, 2003.
- PADHYE, S.; DANDAWATE, P.; M. YUSUFI; AHMAD, A.; SARKAR, F. H. Perspectivas sobre as propriedades medicinais da plumbagina e seus análogos. *Medicinal Research Reviews*; 32: 1131-1158. Doi: 10.1002 / med.20235, 2012.
- PARDI, N. AND WEISSMAN, D. Nucleoside Modified mRNA Vaccines for Infectious Diseases. In: *RNA Vaccines: Methods and Protocols* (Kramps, T. and Elbers, K. eds), pp. 109 -121. New York, NY: Springer New York, 2017.
- RAHMATULLAH, M., RAHMAN, M. A.; HOSSAN, M. S.; RAHMAN, M. T.; JAHAN, R. AND MOLLIK, M. A. H. A pharmacological and phytochemical evaluation of

- medicinal plants used by the harbang clan of the Tripura tribal community of Mirsharai area, Chittagong district, Bangladesh. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*.16:769-785, 2010.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American journal of hygiene*. 27, 493-497, 1938.
- SAIZARBITORIA, T. C.; ANDERSON, J. E.; AFONSO, D. E MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive furanaphthoquinones from *Tabeluia barbata*. – *Acta Cientifica Venezolana*, v.48, n.1, p. 42-46, 1997
- SÁNCHEZ, R.; PIEPER, U.; MIRKOVIÆ, N.; DE BAKKER, P. I.; WITTENSTEIN, E.; SALI A. MODBASE, A. database of annotated comparative protein structure models. *Nucleic Acids Research*. 28:250–253, 2000.
- SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. *The Healing Forest*. Dioscorides. Press, Portland, 1990.
- SHARMA, A.; SANTOS, I. O.; GAUR, P.; FERREIRA, V. F.; GARCIA, C. R. S.; ROCHA, D. R. EUR. *Journal of Medicinal Chemistry*. 59, 48, 2013.
- SILVA, GUSTAVO B. DA ET AL. Studies of the Colloidal Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Platinum Complexes in Aqueous and PBS Buffer Media. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo v. 28, n. 5, p. 731-739, 2016.
- SOLOMON, T., BAYLIS, M. & BROWN, D. vírus Zika e doenças neurológicas- abordagens para o desconhecido. *Lancet Infect Dis* 16, 402-404, 2016.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG III*. 3ª Ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum, São Paulo, 2012.
- SUNASSEE, S. N.; VEALE, C. G. L.; SHUNMOOGAM-GOUNDEN, N.; OSONIYI, O.; HENDRICKS, D. T.; CAIRA, M. R.; MARE, J. A.; EDKINS, A. L.; PINTO, A. V.; DA SILVA JÚNIOR, E. N.; DAVIES-COLEMAN, M. T. Cytotoxicity of Lapachol,  $\beta$ -Lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against Oesophageal Cancer Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 62, 98, 2013.
- SUNAZUKA, T.; HIROSE, T.; OMURA, S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. *Accounts of Chemical Research*. 41(2):302–14, 2008.
- WHO (World Health Organization). Disponível em: <> Acesso em: 24 de mai. 2016.

- WHO (World Health Organization). Cancer. Fact sheet N°297, Update February 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 24 mai. 2016.
- WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. *Journal of Organic Chemistry*. 71 (22):8329–51, 2006.
- THOMSON, R.H. Distribution of naturally occurring quinones. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition*, v.3, n. 2, p. 70-73, 1991.
- TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, v.56, p. 279-285, 1987.
- VERMA, R. P. Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones:A QSAR Study. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v.6, p. 489-499, 2006.
- XU, L.; HUANG, F.; CHEN, S.; CHEN, S.; XIAO, P. A new triterpene and dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra propinqua* (WALL.) BAILL. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, v. 54, n. 4, p. 542-545, 2006.

## 10. APÊNDICE

### *In vitro* evaluation of the antitumoral activity of synthetic naphthoquinones

Hélia Maria Marques de Moura<sup>1</sup>; Breno de Melo Silva<sup>2</sup>; *Guilherme Rocha Pereira*<sup>3</sup> Alaíde Braga Oliveira<sup>4</sup>; Geraldo Célio Brandão<sup>1,\*</sup>;

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, 35.400-000 Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, 35.400-000 Ouro Preto, MG, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Física e Química Instituto de Ciências Exatas e Informática ICEI. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, PUC Minas, Av. Dom José Gaspar, 500, Belo Horizonte, CEP 30535.901, MG, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

**ABSTRACT**

Quinones are well-known compounds, which can be classified, in different structural types such as benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones, furanonaftoquinones and other. Such structural variety beside their wide spectrum of biological activities, justifies the scientific interest on this group of compounds. The present work had as objective the evaluation of the antitumor activity of synthetic naphthoquinones *in vitro* models. The antitumor activity was evaluated against three tumor cell lines, TOV-21, HepG-2 and T 24. In addition, the substances with the highest cytotoxicity were tested against human fibroblasts (MRC-5), a non-tumor cell line, in order to evaluate the selectivity. Twenty-three naphthoquinones were evaluated against five cell lines, where the cytotoxic concentrations fifty percent CC<sub>50</sub> ranged from 0.0001 to 515.7 µg / mL. The results of this study showed that the substances tested, for the most part, were cytotoxic at the concentrations tested. In addition, we can highlight the high selectivity index (300.0) of the NQ 2 substance in front of the Hep-G2 tumor line, when compared to the cells of the human fibroblast line MRC-5.

**KEYWORDS:** naphthoquinones; antitumor activity, anti-*Zika virus* activity.

## INTRODUCTION

The natural products are the oldest methods employed in the treatment of illnesses [1], due to easy access to them, and mainly due to the popular knowledge about the therapeutic efficacy of these plants. The continuous role that natural products and derived or related structures have contributed and continue to perform as one of the main agents in the development of the current therapeutic army of the doctor [2].

The development of such research is due to the fact that many isolated bioactive substances are already known and also to the expectation to discover other active principles [3]. As an example, derivatives of Beta-lapachona, which were substances synthesized using a direct methodology and evaluated against several cell lines of cancer (leukemia, human colon carcinoma, prostate, metastatic human prostate, ovary, central nervous system and breast), showing, in some cases, values of  $IC_{50}$  below 1mM.

There is a great impact of plants in the development of drugs, and this can be observed in the main therapeutic areas. It is important to highlight that between 1981 and 2002, out of the 90 antibacterial and chemical entities approved by the FDA, 10% were natural products whereas other 68% were derived from natural products [4]. Moreover, plants and other natural products have inspired the development of organic chemistry, leading to improvements in synthetic methods and the possibility to make analogous of the original product with improved pharmacologic, pharmaceutical properties and also decreased cytotoxicity [2, 5, 6].

Within the antineoplastic potential of isolated substances from species of Bignoniaceae family, lapchol stands out, a naphthoquinone isolated from stems of several species of the tribe Tecomae ( Bignoniaceae). They are known for their anticarcinogen, anti-inflammatory, analgesic, antibiotic, anti-malaria, anti-trypanosome and antiulcerogenic properties [7].

In the late 60s, systematic research on the selection of different plant species in order to discover antineoplastic agents was started [4]. Several compounds of vegetal origin with anti cancer potential were submitted to clinical tests and shutdown because of lack of efficacy and or unacceptable toxicity, such as lapachol, camptotecina and podofilotoxina. However, they can and have been used as model compounds to develop new potential derivatives, through techniques such as oriented syntheses and combinatory chemical synthesis [2, 4].

In this context, the present work aims to evaluate the activities of antiproliferative action in strains of tumor cells of 23 substances obtained by synthesis, whose model was isolated naphthoquinone from species of Bignoniaceae family, since literature has been showing the potential effect of these secondary metabolites against tumor.

## MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Compounds

The naphthoquinones were obtained by synthesis in the Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais UFMG in collaboration with the group of Profa. Alaíde Braga de Oliveira. The compounds were identified on the basis of spectral analyses.  $^1\text{D}$  and  $^2\text{D}$   $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra such as COSY, HSQC, and HMBC were obtained on a Bruker Avance DRX400 instrument in DMSO- $d_6$  with TMS as internal standard. Chemical shifts are given as  $\delta$  (ppm). LC-MS data were obtained by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) in an Esquire 3000 Plus Bruker Daltonics equipment, Capillary: 4000 V, Nebulizer: 27 psi, Dry Gas: 7.0 L/min, Dry Temp: 320 °C, mass flux 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , in the Central Analítica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Data published by [8] and submitted for publication [9]. The structures of the tested compounds are shown in Figure 1.

## 2.2 Cell Culture

A panel of human cancer cell lines was used for the cytotoxicity studies. ATCC<sup>®</sup> cell lines including hepatocellular carcinoma Hep G2 (ATCC<sup>®</sup> HB-8065<sup>™</sup>), ovarian cell carcinoma TOV-21G (ATCC<sup>®</sup> CRL-11730<sup>™</sup>) and transitional cell carcinoma T24 (ATCC<sup>®</sup> HTB-4<sup>™</sup>), were used in the assays. The cells were cultivated in complete cell medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brazil), supplemented with 5% fetal bovine serum, 50 µg/mL gentamicin, 100 U/mL penicillin and 5 µg/mL amphotericin B. The cells were grown in 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and harvested in log-phase for experimental use. Fibroblasts MRC-5 Human (ATCC<sup>®</sup> CRL-171<sup>™</sup>) non-tumor cell line used for the cytotoxicity studies and Vero cells (ATCC CCL-81) employed in the antiviral assays were cultured as a previously described for cancer cell lines.

## 2.3 Cytotoxicity Assay

Cell lines were exposed to different concentrations of compounds for 72 h [9]. After incubation, cell viability was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Merck) assay at a concentration of 2 mg/mL in PBS [9, 10]. Each sample was assayed in four replicates for concentrations ranging from 280 a  $7,5 \times 10^{-5}$  µg/mL. The cytotoxicity of each sample was expressed as CC<sub>50</sub>, i.e. the concentration of sample that inhibited cell growth by 50% [9].

## RESULTS

In the CC<sub>50</sub> assays, 8 different concentrations ranging from 280 to  $7,5 \times 10^{-5}$  µg/ml were used, and the results are represented in Table 1. The results of CC<sub>50</sub> were

determined from the values obtained in distinct experiments by non-linear regression using GraphPad prism 5.0 software package (Statistica). In some compounds, the values obtained from the  $CC_{50}$  showed a decrease in the cell viability, and consequently the increase in cytotoxicity was not dose-dependent, showing that certain naphthoquinones are strong candidates for further analysis.

The cytotoxicity of  $\beta$ -lapachone (40  $\mu\text{g/mL}$ ) as positive control presented a mean cytotoxic concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of  $6.8 \pm 1.37$ ;  $2.1 \pm 1.40$ ;  $9.3 \pm 1.54$ ;  $1.1 \pm 1.25$  and  $1.0 \pm 1.32$  regarding BHK-21, Vero, HepG-2, TOV-21G and T 24 cell lines respectively. Among the 23 compounds tested, four of them (NQ 1, NQ 3, NQ 5 and NQ 14) presented diminished cytotoxic effect against the cells used. On the other hand, five compounds (NQ 2, NQ 8, NQ 9, NQ 10 and NQ 11) revealed a marked decrease in the cellular viability in most of the cell lines tested.

The less cytotoxic compound of this study was NQ 5, which exhibits  $CC_{50}$  values superior than 500  $\mu\text{g/mL}$  in HepG-2 and T-24 cell lines, and 63.66  $\mu\text{g/mL}$  related TOV-21G. The NQ 3 presented  $CC_{50}$  values superior than 100  $\mu\text{g/mL}$  in the tumor cells. The compounds NQ 1 and NQ 14 also presented a reduced cytotoxic activity against the cell lines tested in this study, and showed similar  $CC_{50}$  values regarding HepG-2 and TOV-21G while in T-24 cells NQ1 (231.8  $\mu\text{g/mL}$ ) was superior than NQ14 (63.9  $\mu\text{g/mL}$ ).

On the other hand, five compounds (NQ 2, NQ 8, NQ 9, NQ 10 and NQ 11) revealed a marked decrease in the cellular viability in most of the cell lines tested. The NQ 2 and NQ 8 compounds were high cytotoxic in tumor cells. The first showed a  $CC_{50}$  value of 0.002  $\mu\text{g/mL}$  in the Hep-G2 cell line, 3.3  $\mu\text{g/mL}$  in TOV-21G, and 2.2  $\mu\text{g/mL}$  in T 24. In turn, NQ 8 presented a  $CC_{50}$  value of 1.7  $\mu\text{g/mL}$  in the Hep-G2 cell line, 0.4  $\mu\text{g/mL}$  in TOV-21G, and 4.0  $\mu\text{g/mL}$  in the T 24. The compounds NQ 9, NQ 10, and NQ 11 also showed considerable cytotoxic activity against the cell lines tested in this study.

The selectivity index (SI) are presented in the Table 2. The compounds presented

considerable selectivity against the MRC-5 cells, except the sample NQ 10. The high SI was obtained for NQ 2 that showed a selectivity index of 300.0, which in turn were superior to the SI regarding the positive control of  $\beta$ -lapachone (125.0) considering T-24 and MRC-5 cells. The results indicate that the compounds that were more cytotoxic in this work have a high SI.

## DISCUSSION

### Anti-tumor Activity

Nature has always generated fascination in humans, not only because it is their main source of inspiration and learning, but also because of the resources offered for food, survival and also for basic healthcare. For centuries, medicinal plants formed the basis of traditional medicine of China [11], Africa and many other civilizations [12].

Studies carried out in order to discover active compounds are usually started by analyzing the cytotoxicity of these compounds in cell models. In this work, MTT essay was used to analyze the synthetic substances in four cell types. MTT essay is a colorimetric, sensitive and quantitative technique, widely used for in vitro evaluation of the cell viability and cytotoxicity, as well as in the studies of additives, mycotoxins and drugs. Such analysis is made based on a biological reaction, in viable cells, catalysed by mitochondrial dehydrogenase which reduces the tetrazolium salt, hydrosoluble compound of pale-yellow color, to formazan crystals. The formazan absorbance, spectrophotometrically measured, is directly correlated to the number of cells metabolically active. Thus, high absorbance values indicate high production of formazan (purple color), which means high enzymatic activity and, consequently, a higher number of viable cells [13].

The evaluation of cytotoxicity of  $\beta$ -lapachona, positive control of this study, presented high cytotoxic concentration in all cell strains used in this work, being the quinonas well known for their wide range of pharmacological properties. Naftoquinonas and antraquinonas, for instance, are active against parasites, bacteria and fungi, [14] and their anti-tumor activities [15, 16] have attracted growing research interest. The literature registers the occurrence of Lapachol,  $\alpha$ - e  $\beta$ - Lapachona, besides the isolated furanonaftoquinonas of several species of the genera *Tabebuia*, *Tecoma* and *Handroanthus* [17, 18, 19, 20]. The researchers relate the anti-tumor activity presented by several species of these genera to the presence of the naftoquinonas, such as lapachol [19] and  $\beta$ -lapachona, but also to other classes of natural products such as lignanas [21].

$\beta$ -lapachona presents cytotoxic activity in vitro for different cell strains, especially for malign human cells of lungs, breast, colon-rectal, prostate, melanoma and leukemia cancers [22], which shows the wide range of activity of this compound. Moreover, the combined use of  $\beta$ -lapachona with other drugs, such as taxol, for instance, was effective against human tumors in ovary and prostate [23].

The results of the relation chemical structure versus biological activity show that in the pharmacology of naftoquinonas the hydrophobic character is an important factor related to the cytotoxic activity of this class of substances. This type of investigation may direct the synthesis of new naftoquinonas with this characteristic and potential anti-cancer activity [24]. Facing the fact of the hydrophobic character potential of a substance generating higher cytotoxicity, it is possible to conclude that the results of this work are in accordance with what has been described in the literature, since the substances NQ 8 and NQ 11, with such characteristic, presented cytotoxicity in all cell strains tested. The highest toxicity of the substances NQ 8 and NQ 11 were in the cell strain TOV-21, where they presented  $CC_{50}$  of 0.4 and 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

In a recent study [25], showed that the higher cytotoxic activities are associated with aliphatic substitution, whereas the presence of aromatic substitution (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 4-Me-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-OMe-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) leads to less active compounds. The longer length of the aliphatic substitution may be attributed to higher cell accumulation of these synthetic derivatives, showing that lipophilic compounds are characterized by having high cytotoxicity activity, which can be demonstrated by the data obtained in this study, with the substances NQ 8 and NQ 11 highly toxic for the cells in which they were tested. The lowest values of CC<sub>50</sub> may still be related to other factors that also influence the cytotoxicity, among which, the lipophilicity, electron distribution and hydrogen bonds as a result of the nature of substitution in C11 and in the nitrogen atom.

The compound NQ 9 presented high toxicity against strains of tumor origin, mainly for cells T 24, in which the CC<sub>50</sub> was 0.0002 µg/mL. This compound is a furanonaftoquinona, which has already be reported in the literature as having cytotoxic activity, such as, for example, the compounds 2-acetil furanonaftoquinona; 2-acetil-5-hidroxi e 2-acetil-8-hidroxi-furanonaftoquinona e (+)-8-hidroxi-2-(1-hidroxietil) furanonaftoquinona which presented cytotoxic activity against strains of tumor cells: A-549 (Adenocarcinoma of human lung), MCF-7 (Human breast cancer) e HT-29 (Carcinoma of human colon) [26], showing that the result obtained corroborates with the data present in the literature.

NQ10 in this study is a molecule that has the function epoxide in its structure, which is already described as inducing prominent toxic effects. Naftoquinona NQ 10 presented high inhibition in the growth of tumor cells that were used in this work. Its antiproliferative action was evidenced in cell strain TOV-21, presenting CC<sub>50</sub> of 1.9 µg/mL. In a recent study, showed that (-) Perilaldeído 8,9-epóxido, monoterpene compound containing the epoxide function in its structure, presented high cytotoxicity

when compared with other monoterpenes containing several functional groups in their molecules, with a PI (Percentage Inhibition) value varying from 96.32% to 99.89%, inducing almost 100% of mortality in the cells, at a concentration of 25 µg / mL. The cell strains in which the mentioned compound was highly toxic include three strains of human tumor cells: HCT-116 (colon), OVCAR-8 (ovary) e SF-295 (brain).

The naftoquinonas of natural origin containing a prenil lateral chain such as the β-lapachona and lapachol isolated from species of Bignoniaceae and Verbenaceae together with other naftoquinonas from Angiospermae, with the isomers alcanina and chiconina (Boraginaceae), and the hydroxilated naftoquinonas plubagina and juglona (Droseraceae, Juglandaceae and Plumbaginaceae) have been object of intense investigation, in terms of evaluation of multiple biological activities and regarding the different mechanisms of action, as well as the synthesis of derivatives, aiming to obtain more active or selective new drugs in order to establish a structure-activity relationship. It is important to highlight that the ethnopharmacology and chemosistematic have been consolidating as powerful tools in the discovery of new medicines of natural origin demonstrating the multidisciplinary of Natural Products Chemistry [27].

An important criterion in the research of active compounds with therapeutic potential against cancer is to determine the absence of the toxic effect in the host cells. The cytotoxicity for MRC-5 and for the cell strains of tumor origin were compared using the selectivity index (SI), which is the ratio between Cytotoxicity Concentration 50% (CC<sub>50</sub>) for cells MRC-5 and for tumor cells. Thus, the SI results presented in table 4 showed that the substances analyzed presented some selectivity for cells MRC-5, except for the sample NQ 10. An interesting result was obtained with the substance NQ 2, which showed a selectivity index of 300.0 times for cells MRC-5.

The results of this work strengthen the evidences of how important the research and discovery of biologically active compounds found in derivatives of natural products that inhibit the proliferative activity in tumor cells are. Surely, further studies are needed to unveil the mechanisms of action, toxicity and also the performance of in vivo and clinical essays to prove the results of cytotoxicity of the naftoquinonas in this study.

## **CONCLUSIONS**

In view of the results obtained from the described tests, we can conclude that, although the substances selected for the test of antiviral activity did not show positive results against ZIKV, compound NQ 2 was highly cytotoxic and selective against Hep-G2 tumor cells.

## **ACKNOWLEDMENTS**

This work was supported by funds from FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Brazil), process number APQ-01529-15 and CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamrnto de Pessoal de Ensino Superior (Brazil).

**REFERENCES**

1. Fuck, s. b.; ming, l. c.; et al. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por moradores da área urbana de Bandeirantes, PR, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. 26: 291–296, 2005.
2. Newman, d. j. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *Journal of Medicinal Chemistry*. 51(9):2589–99, 2008.
3. Foglio, M. A.; Sousa, I. M. O. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. Divisão de Fitoquímica, CPQBA/ UNICAMP, 2006.
4. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*. 66 (7):1022–37, 2003.
5. Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. *Journal of Organic Chemistry*. 71 (22):8329–51, 2006.
6. Sunazuka, T.; Hirose, T.; Omura, S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. *Accounts of Chemical Research*. 41(2):302–14, 2008.
7. Morrison, R. K.; Brown, D. E.; Oleson, J. J.; Cooney, D. A. Oral toxicology studies with lapachol. *Toxicology applied Pharmacology*. 17: 01–11, 1970.
8. J. M. M. del Corral, M. A. Castro, A. B. Oliveira et al., “New cytotoxic furoquinones obtained from terpenyl-1, 4-naphthoquinones and 1, 4-anthracenediones,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 21, pp. 7231–7240, 2006.
9. G. C. Brandão, E. G. Kroon, D. E. R. Souza, J. D. Souza Filho, and A. B. Oliveira, “Chemistry and Antiviral Activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae),” *Molecules*, vol. 18, no. 8, pp. 9919-9932, 2013.

- 10.P. R. Twentyman, and M. Luscombe, "A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity", *British Journal of Cancer*, vol. 56, pp. 279-285, 1987.
- 11.Chang, H. M.; But, P. P. H. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*. World Scientific Inc. 1986; 1(2).
- 12.Schultes, R. E.; Raffauf, R. F. *The Healing Forest. Dioscorides*. Press, Portland, 1990.
- 13.Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55–63, 1983.
- 14.Ibis, C.; Tuyun, A. F.; Bahar, H.; Ayla, S. S.; Stasevych, M. V.; Musyanovych, R. Y.; Komarovska-Porokhnyavets, O.; Novikov, V. *Med. Chem. Res.* 22, 2879, 2013.
- 15.Sunasse, S. N.; Veale, C. G. L.; Shunmoogam-Gounden, N.; Osoniyi, O.; Hendricks, D. T.; Caira, M. R.; Mare, J. A.; Edkins, A. L.; Pinto, A. V.; da Silva Júnior, E. N.; Davies-coleman, M. T. Cytotoxicity of Lapachol,  $\beta$ -Lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against Oesophageal Cancer Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 62, 98, 2013.
- 16.Kongkathip, B.; Akkarasamiyo, S.; Hasipatan, K.; Sittikul, P.; Boonyalai, N.; Kongkathip, N. *Eur. J. Journal of Medicinal Chemistry*. 60, 271, 2013.
- 17.Thomson, R.H. Distribution of naturally occurring quinones. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition*, v.3, n. 2, p. 70-73, 1991.
- 18.Oliveira, A. B.; Raslan, D. S; Miraglia, M. C. M.; Mesquita, A. A. L. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Química Nova*. v.13, p.302-307, 1990.

- 19.Fonseca, S. G.C.; Braga, R. M. C.; Santana, D. P. Lapachol - Chemistry, pharmacology and dosage methods. *Brazilian Journal of Pharmacy*. v.84, p.9-16, 2003.
- 20.Hussain, H.; Krohn, K.; Ahmad, V. U.; Miana, G. A.; Green, I. R. Lapachol: an overview. *Special Issue Reviews and Accounts*. v.2, p.145-171, 2007.
- 21.Hirschmann, G.S.; Papastergiou, F. Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug "Tayi Pytá" (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). *Journal of Biosciences*, v. 58, n. 7-8, p. 495-501, 2003.
- 22.Li, Y. Z.; Li, C. J.; Pinto, A. V.; Pardee, A. B. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. *Molecular Medicine*. 5, 232, 1999.
- 23.Ferreira, S. B; Gonzaga, D. T. G.; Santos, W. C; Araújo, K. G. L.; Ferreira V. F.  $\beta$ -Lapachona: Its importance in medicinal chemistry and structural modifications. *Contact Us*. v.2, p.140-160, 2010.
- 24.Verma, R. P. Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones:A QSAR Study. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v.6, p. 489-499, 2006.
- 25.Silva, Gustavo B. da et al., Studies of the Colloidal Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Platinum Complexes in Aqueous and PBS Buffer Media. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo v. 28, n. 5, p. 731-739, 2016.
- 26.Saizarbitoria, T. C.; Anderson, J. E.; Afonso, D. e Mclaughlin, J. L. Bioactive furanaphthoquinones from *Tabebuia barbata*. – *Acta Cientifica Venezuelana*, v.48, n.1, p. 42-46, 1997.
- 27.Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Júnior, V. F. Medicinal Plants: The need for multidisciplinary studies. *New Chemistry*, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

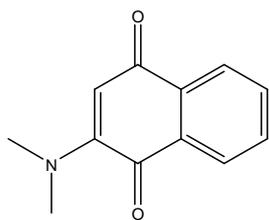
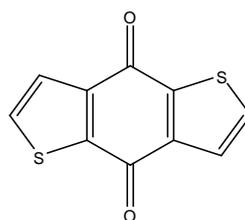
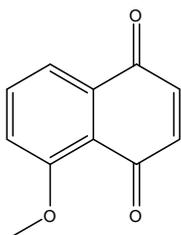
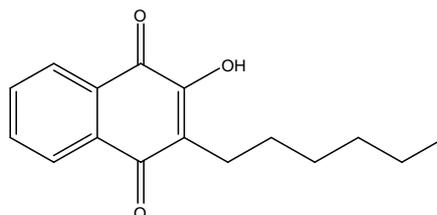
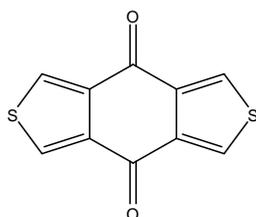
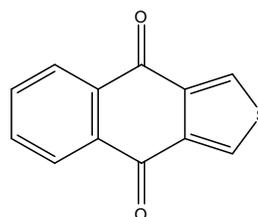
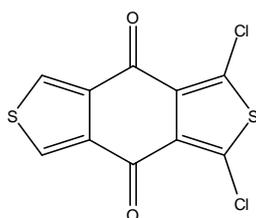
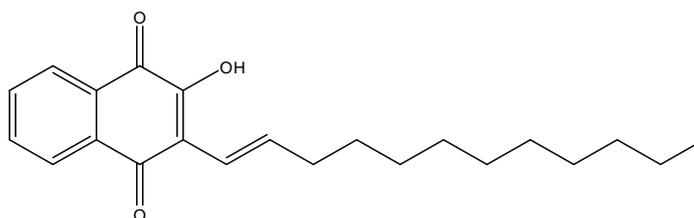
**Table 1:** In vitro cytotoxicity (CC<sub>50</sub> in BHK-21, Vero, Hep-G-2, TOV-21G and T 24 cells) of the synthetic naphthoquinones.

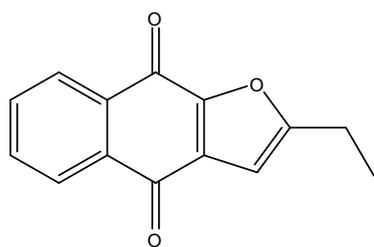
Compound <sup>s</sup>	CC <sub>50</sub> ± SD (µg/mL)				
	BHK-21	Vero	HepG-2	TOV-21G	T 24
NQ 1	15.5 ±1.43	110.2 ±1.26	250.6 ±1.39	25.6 ±1.19	231.8 ±1.57
NQ 2	0.9 ±1.65	0.0001 NA	0.002 NA	3.3 ±1.45	2.2 ±2.10
NQ 3	101.3 ±1.32	56.5 ±1.32	110.7 ±1.36	135.3 ±1.97	132.9 ±1.47
NQ 4	18.1 ±1.24	40.5 ±1.30	63.6 ±1.34	26.9 ±1.19	14.0 ±1.44
NQ 5	75.6 ±1.53	147.2 ±1.54	500 NA	66.1 ±1.47	500 NA
NQ 6	5.4 ±1.55	29.1 ±1.24	515.7 ±1.33	18.0 ±1.17	53.3 ±1.17
NQ 7	24.8 ±1.20	83.3 ±1.48	26.6 ±1.88	5.8 ±1.31	11.3 ±2.00
NQ 8	0.5 ±1.59	77.3 ±1.94	1.7 ±1.34	0.3 ±2.64	4.0 ±1.21
NQ 9	0.3 ±2.00	0.0005 NA	3.4 ±1.36	17.6 ±1.24	0.0002 NA
NQ 10	22.6 ±1.29	1.1 ±1.70	3.7 ±1.34	1.9 ±1.41	3.7 ±1.19
NQ 11	26.0 ±1.33	14.7 ±1.32	6.4 ±1.27	0.5 ±1.99	27.8 ±1.43
NQ 12	45.4 ±1.35	39.4 ±1.23	52.5 ±1.44	20.9 ±1.25	19.7 ±1.27
NQ 13	86.2 ±1.30	165.1 ±1.57	68.7 ±1.35	5.0 ±1.75	14.3 ±1.09
NQ 14	285.6 ±1.78	62.3 ±1.30	201.0 ±1.32	24.1 ±1.41	63.9 ±1.28
NQ 15	45.0 ±1.19	36.4 ±1.24	34.2 ±1.19	31.6 ±1.19	48.3 ±1.19
NQ 16	100.8 ±1.19	105.5 ±1.31	13.1 ±1.16	23.7 ±1.25	39.0 ±1.29
NQ 17	58.5 ±1.27	463.9 ±1.80	3.6 ±1.32	12.1 ±1.14	11.9 ±1.27
NQ 18	31.3 ±1.20	121.1 ±1.24	23.8 ±1.14	13.8 ±1.20	9.0 ±1.15
NQ 19	178.7 ±1.37	189.6 ±1.64	25.7 ±1.17	4.8 ±1.26	14.9 ±1.16
NQ 20	19.2 ±1.89	12.7 ±1.42	18.0 ±1.25	2.6 ±1.31	2.5 ±1.32
NQ 21	37.9 ±1.23	385.0 ±1.96	24.1 ±1.22	8.5 ±1.23	11.7 ±1.13
NQ 22	44.9 ±1.20	87.4 ±1.41	22.5 ±1.23	1.6 ±1.46	10.9 ±1.20
β-Lap.	6.8 ±1.37	2.1 ±1.40	9.3 ±1.54	1.1 ±1.25	1.0 ±1.32

**Table 2:** Selectivity index (SI) for synthetic naphthoquinones

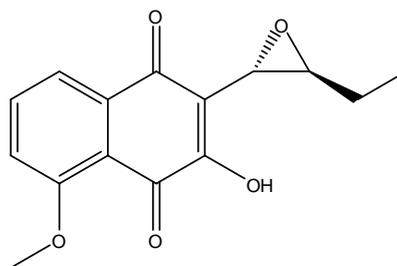
<b>Compounds</b> (tumoral cell)	<b>Tumoral cell</b>	<b>MRC-5</b>	<b>SI</b>
	<b>µg/mL</b>		
<b>NQ 2</b> (Hep G-2)	0.002	0.6	300.0
<b>NQ 8</b> (TOV-21G)	0.4	2.0	5.0
<b>NQ 9</b> (T 24)	0.0002	0.0003	1.5
<b>NQ 10</b> (TOV-21G)	1.9	0.7	0.3
<b>NQ 11</b> (TOV-21G)	0.5	7.3	14.6
<b>B-Lapachona</b> (T 24)	1.0	125	125.0

SI: MRC-5 / tumoral cell

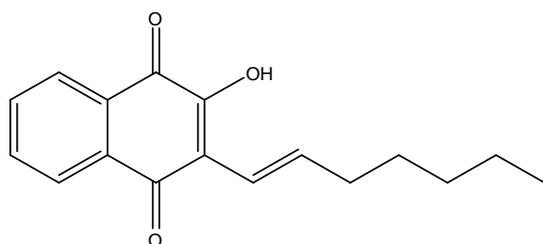
**Figure 1:** List of compound names, structure and code.**NQ 1** : 2-(dimetilamino)naftalen-1,4-diona**NQ 2** : Benzo [ 1,2-b:5,4-b'] ditiofeno-4,8-diona**NQ 3** : 5-metoxi-naftalen-1,4-diona**NQ 4** : 2-hexano-3 hidroxi-naftalen-1,4-diona**NQ 5** : Benzo [1,2-c:4,5-c'] ditiofeno-4,8-diona**NQ 6** : Nafto [2,3-c] tiofeno-4,9-diona**NQ 7** : 1,3-dicloro-4H,8H-Benzo [1,2-c:4,5-c'] ditiofeno-4,8-diona**NQ 8** : 2-(1-dodeceno-1-il) 3-hidroxi-naftalen-1,4-diona



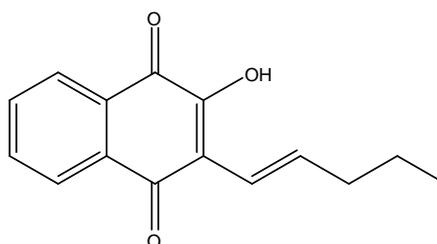
**NQ 9** : 2-etil-nafto [2,3-b] furan-4,9-diona



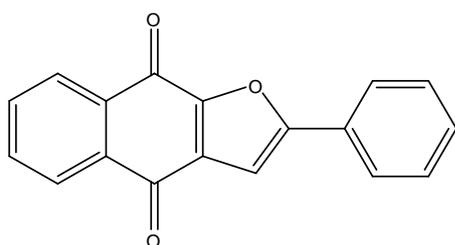
**NQ 10** : 2-((2S,3S) 3-etil-oxiran-2-il) 3-hidroxi-5-metoksi-naftalen-1,4-diona



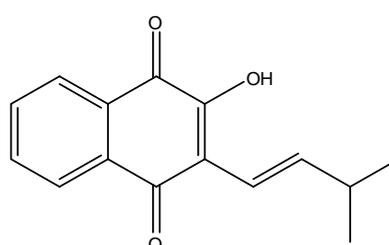
**NQ 11** : (E)-2 (hept-1-eno) 3-hidroxi-naftalen-1,4-diona



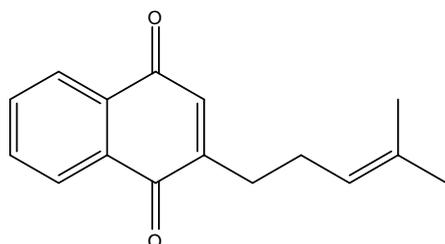
**NQ 12** : (E)-2-hidroxi-3-(pent-1-eno) naftalen-1,4-diona



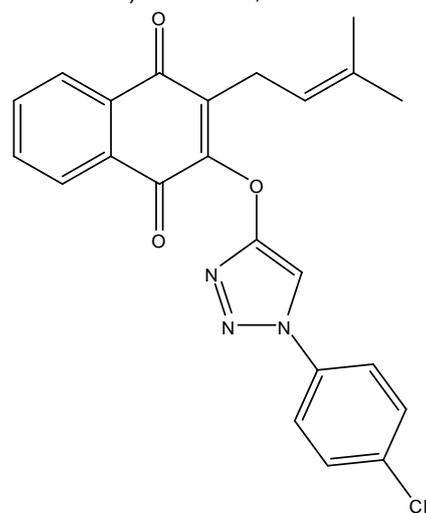
**NQ 13** : 2-fenil-nafto [2,3-b] furan-4,9-diona



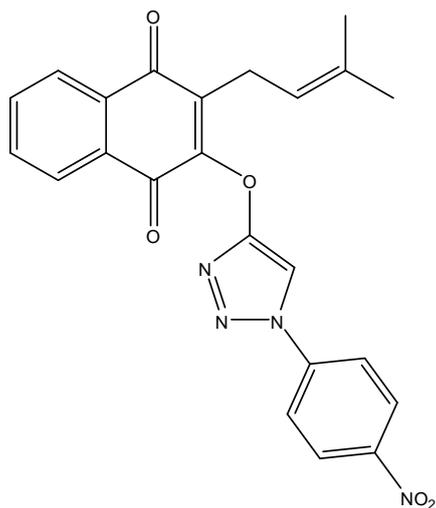
**NQ 14** : (E)-2-hidroxi-3-(3-metil-but-1-eno) naftalen-1,4-diona



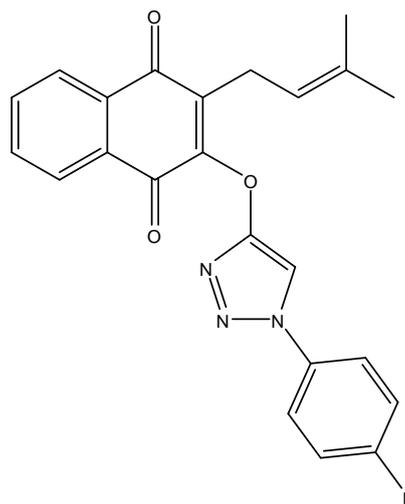
**NQ 15** : 2-(4-metil-pent-3-enil) naftalen-1,4-diona



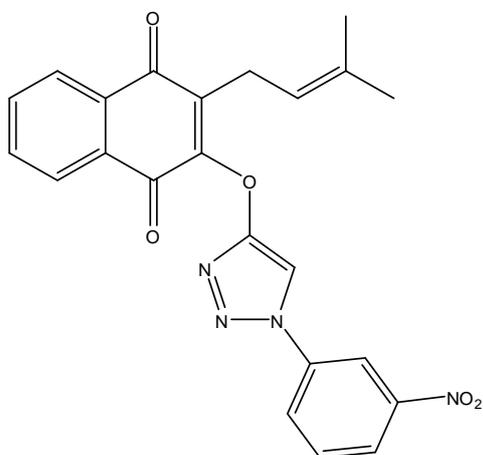
**NQ 16** : 4-(4-((3-metil-but-2-enil) 1,4-dioxo-1,4-diidronaftalen-2-il) metil) 1H-1,2,3-triazol-1-il) benzonitrila



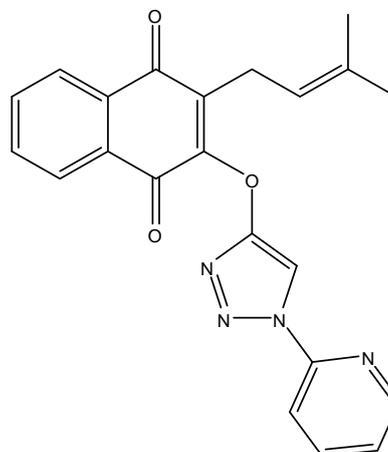
**NQ 17** : 2-(3-metil-but-2-enil) 3-((1-(4-nitrofenil) 1H-1,2,3-triazol-4-il) metil) naftalen-1,4-diona



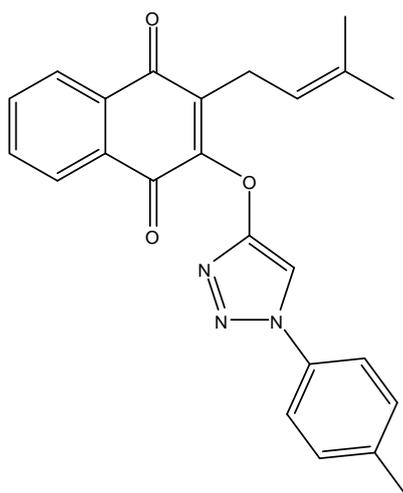
**NQ 18** : 2-((1-(4-fluorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) metil) 3-(3-metil-but-2-enil) naftalen-1,4-diona



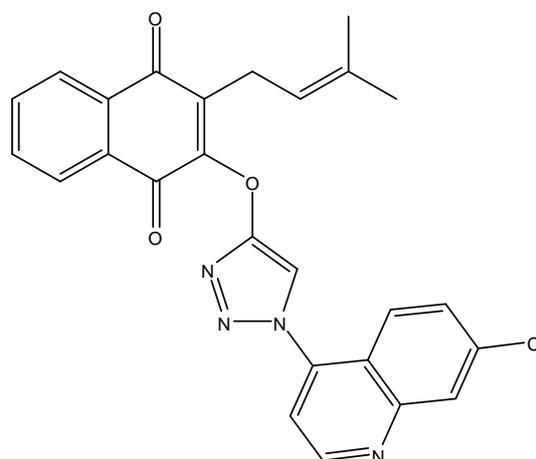
**NQ 19** : 2-(3-metil-but-2-enil) 3-((1-(3'-nitrofenil-4-il) 1H-1,2,3-triazol-4-il) metil) naftalen-1,4-diona



**NQ 20** : 2-(3-metil-but-2-enil) 3-((1-(4-(piridin-2-il) fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) metil) naftalen-1,4-diona



**NQ 21** : 2-((1-(4'-metil-bifenil-4-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il) metil)-3-(3-metil-but-2-enil) naftalen-1,4-diona



**NQ 22** : 2-((1-(4-(7-cloroquinolin-4-il) fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) metil)-3-(3-metil-but-2-enil) naftalen-1,4-diona