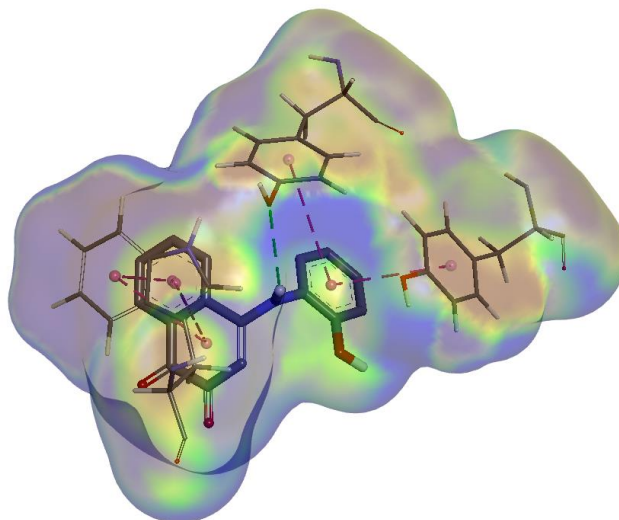




ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Avaliação de atividade citotóxica e propriedades biológicas de diferentes compostos heterocíclicos

GONÇALO DA COSTA VIEGAS

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica – Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Ana Catarina Cardoso de Sousa
Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Júri:

Presidente: Doutora Ana Maria G.H. Barreiros Joanaz de Melo
Vogais: Doutora Alexandra Maria Moita Antunes
Doutor Nelson Alberto Frade da Silva
Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Dezembro de 2023

Agradecimentos

Começo por agradecer às minhas orientadoras, a Professora Doutora Ana Catarina Sousa e a Professora Doutora Rita Pacheco. Agradeço pela ajuda, dedicação, disponibilidade, paciência, pela constante vontade de me desafiar e fazer mais e melhor.

Ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo apoio financeiro através do projeto IPL/2021/Naf4Med3D_ISEL.

Um especial agradecimento à Catarina, Filipe, Daniela, Ana, Olímpia e Patrícia, que também estiveram na bancada do lado a lutar em conjunto comigo. Obrigado por partilharem e viverem comigo este desafio.

Obrigado à Marta, Joana e Diana por estarem ao meu lado neste desafio e em todos os outros desafios que em simultâneo ocorriam na minha vida pessoal. Obrigado pela paciência, apoio, risos, ombros e abraços sempre disponíveis.

Obrigado aos colegas da equipa da Evulpo Portugal/Suíça pelo desafio de tornar a educação acessível a todos, por termos chegado a todas as salas de aula na Suíça e estarmos no top das start-ups de educação e tecnologia na Suíça.

Um agradecimento à equipa DP Seres da GenIbet, obrigado à Catarina, Filipe, Laura, Marcelo, Rita, Santinho e Sara por me apoiarem na fase final desta luta ao mesmo tempo que tínhamos em mãos um projeto que transformou toda a teoria e conhecimento que os últimos anos de estudo me deram, num produto comercial único que está a permitir salvar vidas.

Obrigado à minha Mãe e aos meus avós maternos pelo apoio, carinho e paciência durante estes anos em que muitos momentos foram sacrificados para que este projeto fosse concluído. Um agradecimento muito especial às minhas segundas Mães no Porto, obrigado por todo o carinho nos últimos dois anos.

Para terminar, um agradecimento muito especial ao Diogo por todo o amor e apoio incondicional desde o primeiro dia deste projeto e por o ter levado comigo por muitos lugares. Obrigado por tudo.

Termino por agradecer e dedicar esta tese à minha tia-avó Luísa por sempre ter acreditado em mim, por termos partilhado durante os anos o mesmo amor pelo conhecimento e o fazer chegar a todos. Agradeço por mesmo não estando aqui, esteve a apoiar-me.

Resumo

As naftoquinonas e fenazinas têm-se revelado como famílias de compostos de elevado interesse devido à sua capacidade de interação com diversos alvos biológicos. Nesta dissertação, com o objetivo de estender a biblioteca de compostos com potencial interesse biológico, foram avaliados os efeitos de compostos de ambas as famílias sobre alguns alvos biológicos. Foi estudada a de inibição *in vitro* da acetilcolinesterase (AChE), alvo terapêutico para a doença de Alzheimer, e previsto o mecanismo de ação por estudos de interação *in silico* de *docking* molecular. Foi ainda determinado o efeito destes compostos sobre a morte celular em linhas celulares cancerígenas humanas, sendo posteriormente investigado o mecanismo de ação por avaliação da capacidade antioxidante, da indução da apoptose por citometria de fluxo e da sua interação com o DNA. Os derivados das fenazinas estudados revelaram capacidade de interação com o DNA, evidenciado mecanismos semelhantes associados ao fármaco doxorrubicina. Verificou-se um elevado potencial inibitório para derivados com substituintes de menor diâmetro molecular, *N*,5-dimetil-3-imino-3,5-dihidrofenzazina-2-amina (**1.b**) e 2-hidroxi-4,8-dimetil-4,4a,10,10a-tetrahidro-3*H*-fenoxazina-3-ona (**2.b**) para a AChE e modos de interação previstos *in silico* semelhantes ao fármaco donepezilo. Os derivados das naftoquinonas revelaram um elevado potencial inibitório da AChE apresentando valores de inibição elevados quando funcionalizados com substituintes causadores de um aumento de densidade eletrônica nos anéis aromáticos, responsáveis pelas interações chave com a AChE, revelando modos de interação previstos *in silico* semelhantes ao donepezilo. Esta família de compostos revelou-se também com um elevado potencial citotóxico contra células Hep G2, apresentado o composto mais promissor, 4-(*p*-fenilenodiamina)-1,2-naftoquinona (**4.b**) um valor de EC50 (3±1 μM) próximo da doxorrubicina (1,46 μM). Em conclusão, este trabalho permitiu estabelecer a ligação entre a estrutura molecular das fenazinas e naftoquinonas e a sua atividade biológica, sendo possível também estabelecer ligações entre o tipo de alterações na estrutura destes compostos que permitem melhorar a sua atividade biológica.

Palavras-chave: Naftoquinonas; Fenazinas; Atividade inibitória da acetilcolinesterase; Atividade citotóxica; Atividade biológica.

Abstract

Naphthoquinones and phenazines have proven to be compound families of high interest due to their ability to interact with various biological targets. In this dissertation, to expand the library of molecules with potential biological interest, various derivatives from these families were studied against different biological targets. The compounds were studied via *in vitro* testing as Alzheimer's disease therapeutic target, enzyme acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, alongside *in silico* predictions of inhibition mechanisms by molecular docking. Cytotoxicity was studied on human cancer cell lines and, additionally, cell death mechanisms were investigated by analysis of antioxidant activity, DNA interaction and flow cytometry. Phenazine derivatives revealed the capacity to interact with DNA in a similar mode as the commercial pharmaceutical doxorubicin. An elevated potential was also revealed in terms of AChE interaction, especially in derivatives with low diameter ligands, 5-methyl-4,5-dihydrophenazine-2,3-diamine (**1.b**) and 2-hydroxy-4,8-dimethyl-4,4-dihydro-3H-phenoxazin-3-one (**2.b**), revealing similar *in silico* predicted interactions modes to AChE as the commercial pharmaceutical donepezil. Naphthoquinone derivatives revealed an elevated inhibition potential when functionalized with ligands, responsible for an increased electronic density in key aromatic rings related to AChE interaction, revealing similar *in silico* predicted binding modes to donepezil. This family also revealed an elevated cytotoxic potential against Hep G2 cells, highlighting 4-(hydroxyphenylamino)naphthalene-1,2-dione (**4.b**) as the most promissory compound, with an EC_{50} of $3 \pm 1 \mu\text{M}$, close to doxorubicin's EC_{50} of $1,46 \mu\text{M}$. This dissertation closes with the conclusions of success in establishing the connection between phenazines and naphthoquinones molecular structure and their biological activity, alongside the connection between structural changes that permit the increase and optimization of biological activity.

Keywords: Naphthoquinones; Phenazines; Acetylcholinesterase inhibitory activity; cytotoxic activity; biological activity.

Lista de abreviaturas

A5	Anexina V
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de acetiltiocolina
AChR	Recetor de acetilcolina
CAS	Centro aniónico catalítico
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	Dmem médium
Dok7	Jusante da tirosina quinase 7
DOXO	Doxorrubicina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DSB	Quebras de dupla cadeia
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EC50	Concentração efetiva média
FBS	Soro fetal bovino
FC5.5	Ficoeritrina Cianina 5.5
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward scatter channel</i>
FZ	Fenazina
GLU	Ácido glutâmico
HCC	carcinoma hepatocelular
HIS	Histidina
IC50	Concentração inibitória média
LDH	Lactato desidrogenase
Lrp4	Recetor 4 de lipoproteínas de baixa densidade
MARK/ERK	Via metabólica de quinases ativadas por mitogéno e sinais extracelulares regulados por quinases
MC/BFGS	Modelo de Monte Calor e Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MuSK	Quinase muscular específica
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NMDAR	Recetor de N-metil-D-aspartato
NQ	Naftoquinona
PAS	Centro aniónico periférico
PDGF	Fator de crescimento 3 derivados de plaquetas

PHE	Fenilalanina
PI	Iodeto de propídeo
PRAD	Domínio Proteico Rico em Prolina
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SCF	Fator de células estaminais
SER	Serina
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SSC	<i>Side scatter channel</i>
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
UV-Vis	Ultravioleta e Visível
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Índice

1. Introdução	3
1.1. Naftoquinonas	3
1.2. Fenazinas	6
1.3. Acetilcolinesterase e a doença de Alzheimer	9
1.3.1. Estrutura, função e distribuição biológica	9
1.3.2. Doença de Alzheimer	11
1.3.3. Inibidores da AChE	13
1.3.4. Docking molecular	17
1.4. Cancro	18
1.4.1. Definição de cancro e incidência global	18
1.4.2. Cancro da perspetiva celular	19
1.4.3. Tratamento do cancro	20
1.4.4. Cancro do fígado	20
2. Resultados e discussão	25
2.1. Fenazinas e fenoxazinonas	26
2.1.1. Atividade inibitória da AChE	27
2.1.2. Atividade antioxidante	34
2.1.3. Citotoxicidade em linhas celulares Hep GG2	36
2.1.4. Interação com o DNA	40
2.1.5. Citometria de fluxo – Mecanismo de morte celular	43
2.2. Naftoquinonas	48
2.2.1. Atividade inibitória da AChE	49
2.2.2. Atividade antioxidante	56
2.2.3. Citotoxicidade em linhas celulares Hep G2	57
2.2.4. Citometria de fluxo – Mecanismo de morte celular	61
3. Discussão, Conclusões e perspetivas futuras	65
4. Parte experimental	71
4.1. Crescimento e manutenção de linhas celulares Hep G2 e ensaios de viabilidade celular	71
4.1.1. Crescimento e manutenção das células Hep G2	71
4.1.2. Expansão células Hep G2	72
4.1.3. Crescimento de células em microplaca	72
4.1.4. Ensaio de viabilidade celular – MTT	73
4.1.5. Ensaio de viabilidade celular – LDH	74
4.1.6. Ensaios de citometria de fluxo – Estudo dos mecanismos de morte celular	75
4.2. Estudo da atividade inibitória da AChE	76

4.2.1. Determinação da atividade inibitória da AChE – Método de Ellman’s	76
4.2.2. Docking molecular	76
4.3. Estudo de atividade antioxidante.....	79
4.4. Estudo de interação com o DNA.....	79
5. Bibliografia	83
6. Anexos.....	93
Anexo 1 – Curva dose-resposta do composto 1.c face à inibição da AChE.	93
Anexo 2 – Curva dose-resposta do composto 2.b face à inibição da AChE.....	93
Anexo 3 – Distâncias de interações entre composto 1.b e cavidade catalítica da AChE.....	93
Anexo 4 – Distâncias de interações entre composto 1.c e cavidade catalítica da AChE.	94
Anexo 5 – Distâncias de interações entre composto 2.b e cavidade catalítica da AChE.....	94
Anexo 6 – Contaminantes fúngicos no meio de cultura nos fracos T50 usados para crescimento das células Hep G2.....	94
Anexo 7 – Percentagem de citotoxicidade para células Hep G2 dos compostos 1, 1.a, 1.b, 1.c e 2 e respetivo desvio padrão (s).....	95
Anexo 8 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto 1	95
Anexo 9 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 3.a	95
Anexo 10 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 3.b	96
Anexo 11 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 3.c	96
Anexo 12 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 3.d	96
Anexo 13 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 3.k	97
Anexo 14 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 3.l	97
Anexo 15 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 4.a	97
Anexo 16 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 4.b	98
Anexo 17 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 4.c	98
Anexo 18 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto 4.d	98
Anexo 19 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto 4.e	99
Anexo 20 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto 4.g	99

Anexo 21 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto 4.j	99
Anexo 22 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto 4.k	100
Anexo 23 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto 4.l	100

Índice de Figuras

Figura 1 – a) Eulentinona e b) fenazina glicérida extraídas de <i>Kitasatospora</i> sp.....	3
Figura 2 - Estrutura química da a) 1,2-naftoquinona e b) 1,4-naftoquinona.	3
Figura 3 - Transformações redox da 1,2-naftoquinona pela ação de ROS como agente oxidante e NADPH como agente redutor [16].	5
Figura 4 - Formação de ROS pela oxidação da seminaftoquinona [16].	5
Figura 5 - Estrutura da fenazina base.	6
Figura 6 – Estrutura da fenoxazina.	6
Figura 7 - Macroestrutura da acetilcolinesterase (AChE) em associação com a membrana celular. Acetilcolina (ACh), Recetor de acetilcolina (AChR), Jusante da tirosina quinase 7 (Dok7), Quinase muscular específica (MuSK), Recetor 4 de lipoproteínas de baixa densidade (Lrp4), Domínio Proteico Rico em Prolina (PRAD) [53].	9
Figura 8 – a) Distribuição de estruturas secundárias na AChE pelo modelo 4EY7.pdb e b) representação do centro ativo da AChE.	10
Figura 9 - Terminação da propagação do sinal nervoso pela hidrólise do neurotransmissor ACh pela acetilcolinesterase (AChE) [51].	11
Figura 10 - Cérebro afetado pela doença de Alzheimer em comparação com um cérebro saudável [55].	11
Figura 11 – Esquematização da ação dos inibidores da AChE nas sinapses colinérgicas.	12
Figura 12 - Inibidores da AChE do grupo da fisostigmina, o primeiro inibidor da AChE, e os respetivos análogos Neostigmina e a Pirostigmina.	13
Figura 13 – Estrutura química do Donepezilo.	13
Figura 14 – Estrutura química da Rivastigmina.	13
Figura 15 - Estrutura química da Galantamina.	13
Figura 16 – Hidrólise de propionato de p-nitrofenol (incolor) a p-nitrofenol (corado) pela AChE.	15
Figura 17 - Hidrólise de Butirato de resorufina (Incolor) ao seu produto fluorescente pela AChE.	15
Figura 18 - Reação de Ellman's para determinação da atividade da AChE.	16
Figura 19 - Curva dose-resposta do composto 1.b representando o modelo não linear ajustado à percentagem de Inibição da AChE para o logaritmo das diferentes concentrações do composto.	28
Figura 20 - Comparação dos IC ₅₀ para os compostos 1.b , 1.c e 2.b e respetivas estruturas. Letras diferentes significam valores diferentes com p-value<0,05.	30
Figura 21 - Interações do composto 1.b com a AChE, previstas por docking molecular pelo software Autodock Vina, visualizado em Discovery Studio Visualizer. a) modelo de interações em 3D; b) modelo de interações em 2D.	31
Figura 22 - Interações do composto 1.c com a AChE, previstas por docking molecular pelo software Autodock Vina, visualizado em Discovery Studio Visualizer. a) modelo de interações em 3D; b) modelo de interações em 2D.	31
Figura 23 - Interações do composto 2.b com a AChE, previstas por docking molecular pelo software Autodock Vina, visualizado em Discovery Studio Visualizer. a) modelo de interações em 3D; b) modelo de interações em 2D.	31
Figura 24 - Posições previstas dos compostos 1.a a) e 1.b b) na cavidade catalítica da AChE.	33
Figura 25 - Reação de eliminação do radical DPPH.	34
Figura 26 - Atividade antioxidante dos compostos da família das fenazinas a uma concentração de 100 µM. p-value<0,05.	35
Figura 27 - Citotoxicidade contra células Hep G2 a 50 µM em percentagem de células não viáveis, determinada pelo método colorimétrico do MTT.	36
Figura 28 - Curva dose-resposta para o composto 1	37

Figura 29 - Influencia de log P na citotoxicidade das fenazinas contra células Hep G2.	38
Figura 30 - Espectro de absorção do Composto 1 e DNA em H2O e 1% DMSO para várias concentrações de DNA.....	40
Figura 31 - Espectro de absorção do Composto 2 e DNA em H2O e 1% DMSO para várias concentrações de DNA.....	41
Figura 32 - Espectro de absorção do Composto 1.a e DNA em H2O e 1% DMSO para várias concentrações de DNA.....	42
Figura 33 - Comparação entre a localização da fosfatidiserina (PS) em células saudáveis e em células em estado inicial de apoptose. a) Célula saudável, b) Célula em apoptose no estado inicial.....	43
Figura 34 - Comparação da acessibilidade do DNA em células apoptóticas em estado inicial e em células em estado tardio de apoptose. a) Célula apoptóticas em estado inicial, b) Célula em apoptose no estado tardio.	43
Figura 35 - Identificação das células Hep G2 usadas nos detetores SSC-A e FSC-A sem marcação.	44
Figura 36 - Identificação das células HepG2 para marcação com A5 no canal FITC-A e PI no canal PC5.5-A.	45
Figura 37 - Identificação das células HepG2 após contacto com o composto 1 durante 24h, a) marcação com A5 no canal FITC-A e PI no canal PC5.5-A, e b) sem marcação com deteção no canal FSC-A e SSC-A.....	46
Figura 38 - Contagem de células HepG2 marcadas com PI e A5 no ensaio CTR-, CTR+ e em contacto com o composto 1.....	47
Figura 39 - Comparação da percentagem de inibição dos derivados da 1,4-naftoquinonas e respetivas estruturas.	51
Figura 40 - Comparação da percentagem de inibição dos derivados da 1,2-naftoquinonas e respetivas estruturas.	54
Figura 41 - Comparação das interações dos compostos 3.a e 4.a com a cavidade catalítica da AChE, previstos por Chimera e visualizados no software BioVia.....	54
Figura 42 - Comparação das interações dos compostos 3.b e 4.b com a cavidade catalítica da AChE, previstos por Chimera e visualizados por BioVia.	55
Figura 43 - Comparação das interações dos compostos 4.e, 4.g e 4.j com a cavidade catalítica da AChE, previstos por Chimera e visualizados por BioVia.	56
Figura 44 - Curvas dose-resposta para os compostos 3 e 4.....	57
Figura 45 - Comparação do valor de EC50 dos derivados da 1,4-naftoquinonas e respetivas estruturas.	58
Figura 46 - Curva dose-resposta incompleta para o composto 4.f após precipitação a partir de uma concentração a 20 μ M.	60
Figura 47 - Comparação do valor de EC50 dos derivados da 1,2-naftoquinonas e respetivas estruturas.	60
Figura 48 - Identificação das células HepG2 após contacto com o composto 3.d durante 24h, a) marcação com A5 no canal FITC-A e PI no canal PC5.5-A, e b) sem marcação com deteção no canal FSC-A e SSC-A.....	62
Figura 49 - Contagem de células HepG2 marcadas com PI e A5 no ensaio CTR-, CTR+ e em contacto com o composto 3.d.....	62
Figura 50 - Redução do MTT em Formazan pela ação de redutases celulares.....	73
Figura 51 - Redução do INT a Formazan pelo mecanismo do LDH na oxidação do lactato a piruvato.	74
Figura 52 - Definições da preparação dos ficheiros .pdb para docking.	77
Figura 53 - Definições de docking usados na extensão Autodock Vina.....	77
Figura 54 - Volume de docking usado.	78
Figura 55 - Exemplo de resultados obtidos no docking molecular.....	78

Figura 56 - Definições de visualização dos resultados do docking no software BioVia
Discovery Studio..... 79

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Naftoquinonas produzidas por diferentes organismos, a sua classificação e atividade biológica.....	4
Tabela 2 - Fenazinas produzidas por diferentes organismos, a sua classificação e atividade biológica.....	7
Tabela 3 – Principais características de células cancerígenas [84].	18
Tabela 4 - Fenazinas e fenoxazinas estudadas.	26
Tabela 5 - Percentagem de inibição da AChE pela família das fenazinas e fenoxazinas à concentração de 100 μM , determinadas pelo método descrito no Capítulo 4.2.1. O valor apresentado é a média de x ensaios, s é o desvio à média.....	27
Tabela 6 - Valores de IC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para os compostos da família das fenazinas e fenoxazinas.	28
Tabela 7 - Valores de p-value entre os compostos da família das fenazinas e fenoxazinas testados.....	29
Tabela 8 - Valores obtidos para a %AA e respetivo desvio padrão, a uma concentração de 100 μM para os compostos 1, 1.a, 1.b e 2.b.....	34
Tabela 9 - Valores de p-value entre os compostos da família das fenazinas e fenoxazinas testados.....	35
Tabela 10 - Valores de log P previstos pelo software Molinspiration para a família das fenazinas e fenoxazinas testadas para citotoxicidade.....	38
Tabela 11 - Citotoxicidade obtida para os compostos da família das fenazinas a 50 μM pelo método do LDH.....	39
Tabela 12 - Resultados da marcação e canais de deteção para diferentes estados celulares.....	44
Tabela 13 - Naftoquinonas estudadas.....	48
Tabela 14 - Percentagem de inibição da AChE pela 1,4- e 1,2-NQ, determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).....	49
Tabela 15 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,4-naftoquinonas à concentração de 50 μM , determinadas pelo método de Ellman's e respetivos desvios padrão (s).	50
Tabela 16 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,4-naftoquinonas à concentração de 50 μM , determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).50	
Tabela 17 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,2-naftoquinonas à concentração de 50 μM , determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).52	
Tabela 18 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,2-naftoquinonas à concentração de 50 μM , determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).53	
Tabela 19 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,2-naftoquinonas à concentração de 50 μM , determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).53	
Tabela 20 - Tabela 20 - Valores de EC50, limites máximos e mínimos, declive e ER para os compostos 3 e 4.....	57
Tabela 21 - Valores de EC50, limites máximos e mínimos, declive e ER para os compostos da família 3.	57
Tabela 22 - Valores de EC50, limites máximos e mínimos, declive e S para os compostos da família 4.	59

Capítulo 1 – Introdução

1. Introdução

Os compostos policíclicos caracterizam-se por possuírem dois ou mais anéis aromáticos na sua estrutura e apresentam uma grande versatilidade de funcionalização molecular e por isso, uma vasta capacidade de serem precursores para o desenvolvimento de novos compostos com atividades biológicas relevantes. Para além disso, estes compostos podem ter uma elevada seletividade para os seus alvos biológicos, tornando-os em produtos de valor acrescido, quer de um ponto de vista científico, quer económico [1].

As naftoquinonas e as fenazinas são duas famílias diferentes de compostos policíclicos que têm demonstrado uma vasta diversidade de aplicações biológicas. O esqueleto principal de ambas é parte integrante de diversos produtos naturais com atividade biológica comprovada, e são inúmeros os estudos que reportam a utilização de diferentes derivados, com atividades anticancerígenas e antibacterianas. Um exemplo de um derivado de naftoquinona, a eleuterinona, que pode ser extraída da *Eleutherine americana* [2] **Figura 1a)**, apresenta atividades anticancerígenas e antibacterianas [3]. Os derivados das fenazinas [4], à semelhança dos derivados das naftoquinonas, podem ser extraídos de várias espécies bacterianas, como a *Kitasatospora sp.*, onde foram identificadas fenazinas glicerídeas [5], **Figura 1b)**.

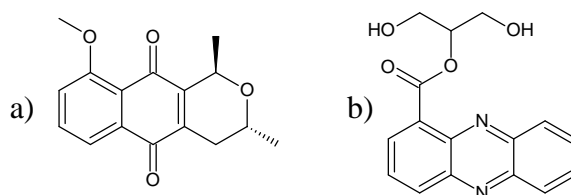


Figura 1 – a) Eulentinona e b) fenazina glicerídea extraídas de *Kitasatospora sp.*

1.1. Naftoquinonas

As naftoquinonas são uma classe de compostos que fazem parte da família das quinonas cuja estrutura central é constituída por dois anéis aromáticos substituídos com dois grupos carbonilos adjacentes, 1,2-naftoquinona, ou paralelos, 1,4-naftoquinona, **Figura 2a)** e **2b)** [6].

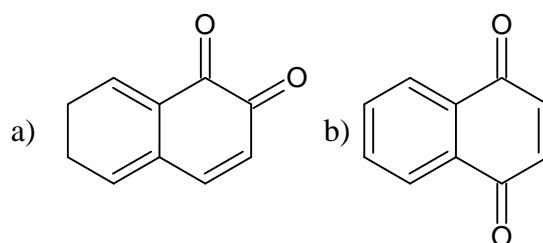
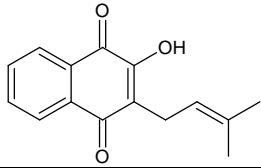
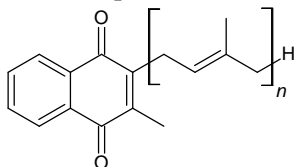
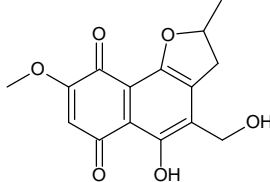
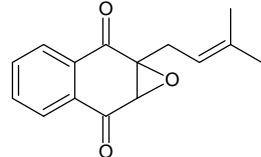


Figura 2 - Estrutura química da a) 1,2-naftoquinona e b) 1,4-naftoquinona.

Os derivados de naftoquinonas podem ser isolados de diversos seres vivos, como bactérias, fungos, plantas e algas [7][8]. Algumas naftoquinonas de elevado interesse biológico devido às suas propriedades encontram-se compiladas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Naftoquinonas produzidas por diferentes organismos, a sua classificação e atividade biológica.

Derivado da naftoquinona	Classificação do organismo produtor	Espécie produtora	Atividade biológica
Lapachol [9] 	Planta	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Citoestática e antiviral
Menaquinonas [10] 	Bactéria	<i>Bacillus cereus</i>	Anticoagulante
Javanicina [11][12] 	Fungo	<i>Fusarium solani</i>	Anti-inflamatória
2-(3-metil-2-butenil)- 2,3-epoxi-1,4- naftoquinona [13][14] 	Alga	<i>Landsburgia quercifolia</i>	Anticancerígena para leucemia e cancro do rim

As aplicações das naftoquinonas estão maioritariamente direcionadas para a área farmacêutica e medicinal devido à grande lista de atividades biológicas de onde se destacam a antiviral [9], anticoagulante [10], anti-inflamatória [11][12], anticancerígena [13][14], antibacteriana, antifúngica [15], antidiabética [16], entre outras.

Os mecanismos associados às atividades biológicas das naftoquinonas frequentemente são relacionados com as suas propriedades redox, tendo as naftoquinonas a capacidade de aceitar um ou dois eletrões. Desta forma, as naftoquinonas têm um papel relevante na inibição do transporte de eletrões, podendo ter a capacidade de iniciar ou propagar reações de formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) [16]. Em sistemas biológicos, as naftoquinonas podem ser reduzidas

a seminaftoquinonas e a hidronaftoquinonas pela ação de redutases celulares, como o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) redutase, **Figura 3**. No estado de seminaftoquinona, estes compostos têm uma grande capacidade de formar ROS, **Figura 4**, espécies estas de elevada toxicidade para as células. A toxicidade das ROS parte da sua capacidade de oxidar biomoléculas, levando à danificação celular, estando o stress oxidativo causado por estas espécies associado a várias condições patológicas como doenças cardiovasculares, cancro e envelhecimento.

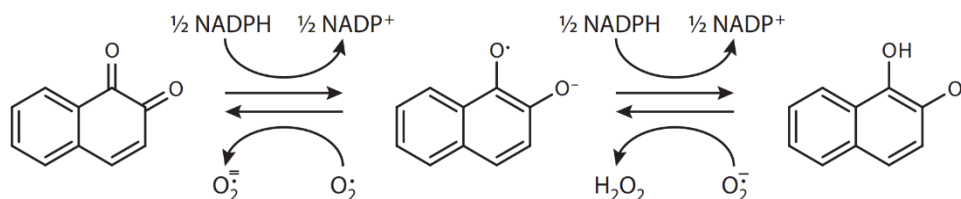


Figura 3 - Transformações redox da 1,2-naftoquinona pela ação de ROS como agente oxidante e NADPH como agente redutor [16].

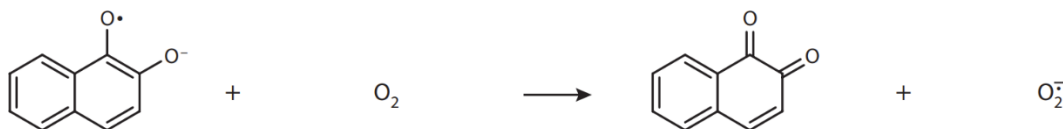


Figura 4 - Formação de ROS pela oxidação da seminaftoquinona [16].

Para além dos mecanismos de ação induzidos pelas suas propriedades redox, estas podem atuar como agentes eletrofílicos [17], causando modificações estruturais em proteínas [18] e ativação de vias celulares regulatórias [19]. Em particular, as suas atividades anti-inflamatórias foram associadas à sua ligação ao fator nuclear κ B, responsável por induzir processos inflamatórios [20].

Os derivados das naftoquinonas podem ser obtidos de diversas formas, de acordo com a sua complexidade. Derivados mais complexos podem ser diretamente extraídos das suas fontes naturais, com recurso a diferentes solventes orgânicos [21], derivados mais simples podem ser sintetizados por adição de ligando ao esqueleto central, por síntese convencional a partir de naftoquinonas halogenadas [22][23], síntese assistida por micro-ondas [24], biocatálise pela ação de bactérias comuns na indústria biotecnológica, como a *Escherichia coli* [25], podendo ainda ser realizada a semi-síntese de derivados [26], realizando a adição ou alteração de grupos funcionais a partir de derivados extraídos de modo a obter moléculas de maior complexidade e funcionalidade.

1.2. Fenazinas

As fenazinas são compostos heterocíclicos azotados, estruturalmente constituídas por dibenzo pirazinas aneladas, cuja unidade estrutural básica se apresenta na **Figura 5**. Essencialmente são produzidas naturalmente como metabolitos secundários de bactérias, tendo função de transportadoras de elétrons, promotoras de virulência [27], e defesa face a agentes biológicos externos, tendo assim uma atividade antibacteriana [28]. Para além de poderem ser produzidas por bactérias, podem ser produzidas por algumas espécies de fungos e algas [29], apresentando-se na **Tabela 2** alguns exemplos de estruturas relevantes, os seus organismos produtores e as respetivas atividades biológicas. As fenazinas podem ser produzidas tanto por bactérias de diversos géneros, como *Nocardia*, *Sorangium* e *Streptomyces*, podendo assim ser produzidas por bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas [28].

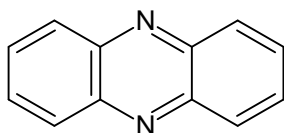


Figura 5 - Estrutura da fenazina base.

As fenazinas têm uma família de compostos diretamente relacionados, uma família em que um dos átomos de azoto do anel central é substituído por um átomo de oxigénio, sendo este composto a fenoxazina, **Figura 6**. À semelhança das fenazinas, as fenoxazinas têm aplicações, fontes e formas de produção bastante variadas, tendo de igual forma um elevado interesse nas áreas de química medicinal e biotecnologia [27].

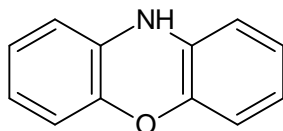


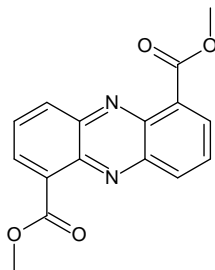
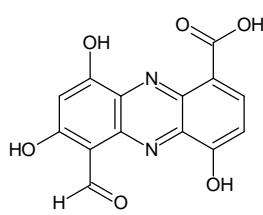
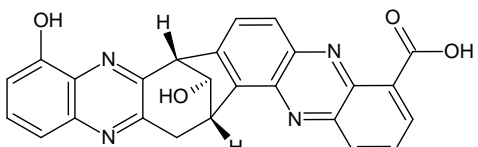
Figura 6 – Estrutura da fenoxazina.

Apesar da vasta lista de aplicações terapêuticas, em certas situações, a produção de fenazinas por bactérias patogénicas pode ser uma ameaça em doentes imunocomprometidos, como é o caso de doentes com fibrose cística. As fenazinas produzidas por estes patogénicos têm como efeito promover a formação de biofilmes, os quais podem ser povoados por novas espécies bacterianas e vírus patogénicos agravando o estado da infeção [33][34].

Para além do papel natural das fenazinas, estas podem ter aplicações e usos benéficos em contextos diferentes. As aplicações dos derivados das fenazinas são muitas extensas e variadas, apresentando usos benéficos em diferentes contextos, com aplicações num grande conjunto de áreas devidos às suas propriedades químicas e biológicas. As atividades biológicas reportadas na bibliografia incluem exemplos da sua ação como agentes antibacterianos [30], antifúngicos [31], anticancerígenos para cancro do pulmão, fígado, próstata, mama, cólon [30][32], antiparasitários [35] e antimaláricos [36]. Para além das atividades biológicas [37], os derivados de fenazinas

foram usados como sensores devido à sua capacidade de reconhecimento seletivo de espécies químicas e biológicas quando em associação a nanotubos de carbono [38].

Tabela 2 - Fenazinas produzidas por diferentes organismos, a sua classificação e atividade biológica.

Derivado da fenazina	Espécie produtora	Atividade biológica
Fenazina-1,6-dicarboxilato [30] 	<i>Micromonospora</i> sp. UR56	Antibacteriana; anticancerígena (Fígado, pulmão, cólon e mama)
1-carboxil-6-formil-4,7,9-trihidroxifenazina [31] 	<i>Streptomyces lomondensis</i> S015	Antifúngica em plantas (Pesticida)
Barafenazina [32] 	<i>Streptomyces</i> sp. PU-10A	Anticancerígena (Pulmão e próstata)

Os mecanismos de atividade biológica dos derivados das fenazinas estão frequentemente associados à sua capacidade para transportar elétrons permitindo a sua interação com diversos alvos biológicos [27]. As fenazinas são facilmente oxidadas pelo oxigênio intracelular gerando ROS. [28]. A formação destes ROS é a chave para os mecanismos de defesa bacteriana promovida pelas fenazinas [39], mas pode também ser como agente citotóxico devido à capacidade de interferir na produção de fatores que ativam o sistema imunitário, como a interleucina 2, podendo também induzir a apoptose dos neutrófilos [40]. A formação destes ROS pelas fenazinas foi associada à capacidade de condensar a cromatina e fragmentação do DNA, induzindo a apoptose [41]. A fragmentação do DNA causada pelas fenazinas pode também ser explicada pela sua capacidade de intercalar esta alvo biológico, hipótese prevista em estudos *in silico*. Este mecanismo é semelhante a mecanismos de fármacos usados atualmente no tratamento do cancro, como a cisplatina [42]. Outro mecanismo estudado é a promoção da apoptose por ativação de

fatores apoptóticos como o citocromo C e o fator APAF1 [43]. Para além destes mecanismos, foi também identificada a sua seletividade contra células cancerígenas em comparação com células saudáveis, evidenciando assim para alguns destes derivados o potencial como agente anticancerígeno seletivo [43]. Apesar de estarem identificados inúmeros novos derivados de fenazinas com estas e outras atividades biológicas relevantes, os seus mecanismos de ação estão ainda por ser compreendidos na totalidade [29], revelando-se assim uma área de estudo interessante e com uma elevada procura de resultados de modo a estabelecer relações entre a estrutura e a atividade das fenazinas e dos seus derivados.

Os derivados das fenazinas podem ser obtidos de diversas formas, de acordo com a sua complexidade. Diferentes vias sintéticas encontram-se descritas na literatura, sendo que nas primeiras sínteses eram utilizados reagentes e métodos pouco sustentáveis, com elevado impacto ambiental. Estes métodos originavam derivados de baixa complexidade e simétricos [44], sendo a regioseletividade na adição de substituintes um desafio ainda por ultrapassar [45]. Métodos mais sustentáveis encontram-se atualmente desenvolvidos e o recurso a catalisadores de cobre, como o acetato de cobre (II) é habitual na sua síntese química [46]. Os derivados de fenazinas podem também ser sintetizados por reações de oxidação de aminas aromáticas mediadas enzimaticamente pela enzima CotA-lacase de *Bacillus subtilis*, um método sustentável e mais simples, permitindo obter fenazinas substituídas em diversas posições. Esta enzima tem como centro ativo um cofator de cobre, tendo este um papel essencial na oxidação das aminas aromáticas precursoras de fenazinas [47].

A extração de fenazinas de produtos naturais é também uma via comum para a sua obtenção realizada com recurso a extrações líquido-líquido usando solventes orgânicos como o clorofórmio [48][49], método que deve ser otimizado de modo a serem utilizados solventes de extração menos tóxicos e de menor impacto ambiental. A biossíntese com recurso à engenharia genética e engenharia metabólica pode permitir maximizar a produção de fenazinas em microrganismos [50].

Pelo estudo bibliográfico é possível naftoquinonas e fenazinas foram estudadas para uma grande diversidade de alvos biológicos, incluindo a acetilcolinesterase (AChE) [7][27], alvo terapêutico da doença de Alzheimer. Nesta dissertação serão então estudados os diversos derivados de naftoquinonas e fenazinas de acordo com o seu potencial inibitório para a AChE.

1.3. Acetilcolinesterase e a doença de Alzheimer

1.3.1. Estrutura, função e distribuição biológica

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima pertencente à classe das colinesterases, que catalisa a hidrólise da acetilcolina (ACh) (E.C.3.1.1.7) um neurotransmissor presente nas sinapses colinérgicas, estando este tipo de sinapses distribuídas tanto pelo sistema nervoso central (SNC) como pelo sistema nervoso periférico (SNP). A AChE tem a função de terminar a transmissão dos impulsos nervosos pela rápida hidrólise dos neurotransmissores do grupo das colinas. A AChE tem uma elevada especificidade para a hidrólise de ACh [51][52]. A AChE está presente na sua maioria nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas do cérebro, podendo também estar presentes nas junções que concentram recetores adrenérgicos [51]. Estruturalmente, a AChE é um tetrâmero ligado por pontes de dissulfureto, estando esta estrutura ligada à membrana celular por ligação com o colagénio, através dos seus domínios, Domínio Proteico Rico em Prolina (PRAD). Geralmente encontram-se ligados três tetrâmeros a cada molécula de colagénio, sendo que cada domínio do tetrâmero contém um centro ativo que hidrolisa a ACh, como demonstrado na **Figura 7** [53].

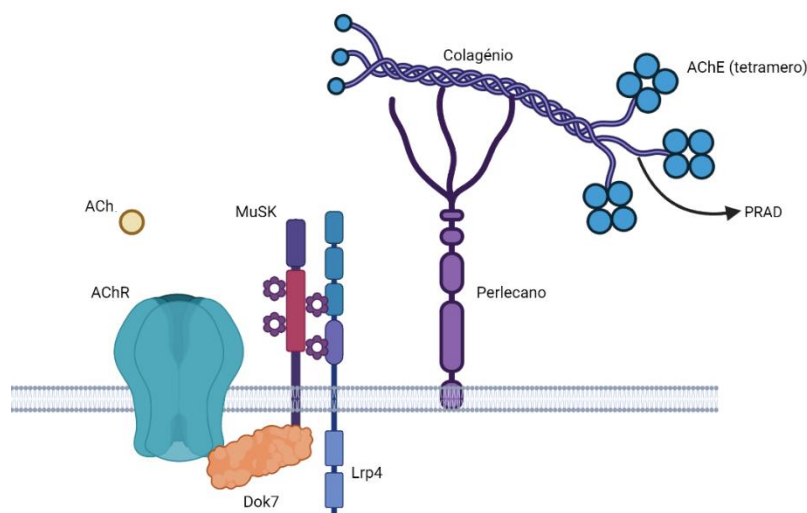


Figura 7 - Macroestrutura da acetilcolinesterase (AChE) em associação com a membrana celular. Acetilcolina (ACh), Recetor de acetilcolina (AChR), Jusante da tirosina quinase 7 (Dok7), Quinase muscular específica (MuSK), Recetor 4 de lipoproteínas de baixa densidade (Lrp4), Domínio Proteico Rico em Prolina (PRAD) [53].

Na **Figura 8a)** apresenta-se a estrutura do monómero da AChE prevista pelo modelo 4EY7.pdb. O centro ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de Glu, His e Ser, tendo uma estrutura planar característica das hidrolases que têm como a serina o resíduo aminoacídico principal do seu centro catalítico, sendo esta região uma região conservada neste tipo de enzimas. Esta estrutura planar ocorre devido aos motivos estruturais causados por uma série de hélices α e folhas β . Ao garantir esta conformação, a hidrólise de ACh decorre pelo mecanismo representado na **Figura 8b)** [58] A tríade catalítica, Ser200, His400 e

Glu327, encontra-se alojada no fundo da cavidade catalítica estreita, onde existem dois centros de ligação responsáveis pelo transporte da ACh até ao centro ativo. Estes dois centros são: centro aniónico periférico (PAS) e o centro aniónico catalítico (CAS), sendo constituídos por resíduos na sua maioria aromáticos, com exceção da Asn, orientados para o interior da cavidade.

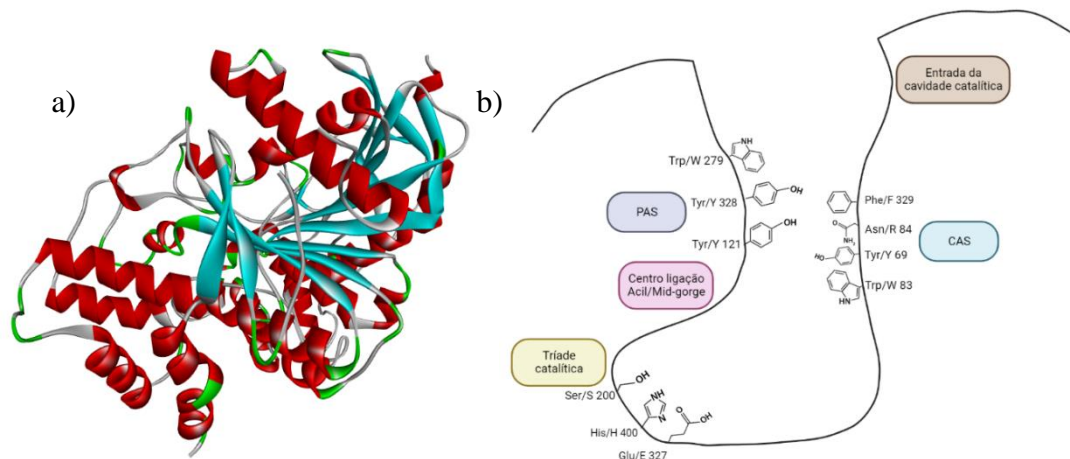


Figura 8 – a) Distribuição de estruturas secundárias na AChE pelo modelo 4EY7.pdb e b) representação do centro ativo da AChE.

No centro ativo, **Figura 9**, a serina é responsável pelo ataque ao neurotransmissor ACh e a histidina atua como ácido de modo a doar um próton, inicialmente adquirido pela sua atuação como base sobre o ião hidrónio formado, libertando a porção colina do neurotransmissor que permaneceu ligada à serina. Com a saída deste grupo, a AChE fica acetilada, sendo reconvertida à sua forma com atividade por atuação da água como nucleófilo, hidrolisando o grupo acetilo, ocorrendo a libertação de ácido acético [58].

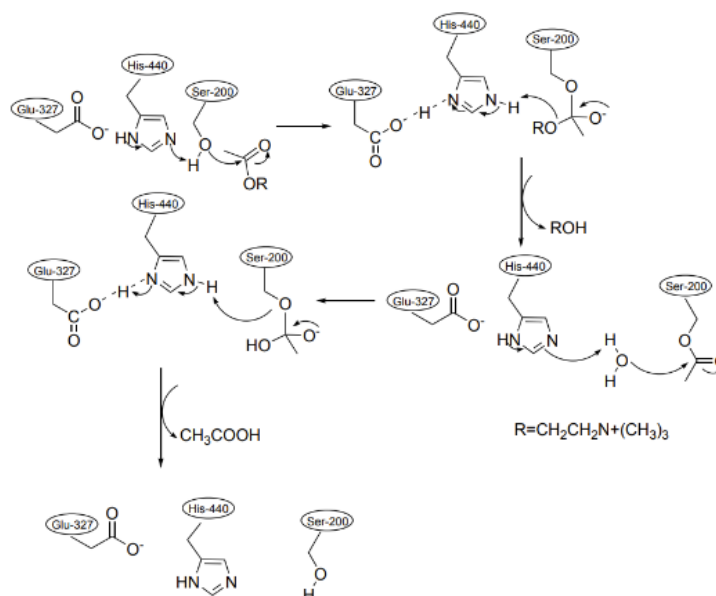


Figura 9 – Mecanismo de hidrólise do substrato da AChE pela tríade catalítica.

A AChE tem como função a terminação da transmissão e sinalização nervosa entre sinapses, prevenindo a continuação da dispersão da ACh e consequente ativação dos recetores nervosos nas proximidades, que ao libertar iões cálcio, propagam o sinal nervoso [51].

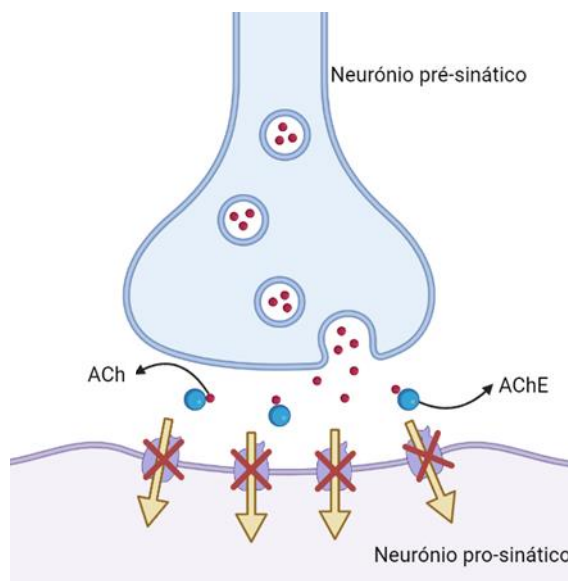


Figura 9 - Terminação da propagação do sinal nervoso pela hidrólise do neurotransmissor ACh pela acetilcolinesterase (AChE) [51].

1.3.2. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença que se caracteriza pela perda da função cognitiva de forma acentuada em comparação com a normal perda cognitiva associada ao envelhecimento. Sintomas como a perda de memória, incapacidade de decisão e de julgamento de situações, deterioração de capacidades sociais e imprevisibilidade emocional são sinais desta patologia. A DA é responsável por cerca de 70% dos casos de demência em cerca de 40 milhões de pacientes em todo o mundo [54]. Patologicamente a DA é caracterizada pela perda de sinapses, acumulação de proteínas α amiloides formando placas e agregados de proteína τ , **Figura 11** [55].

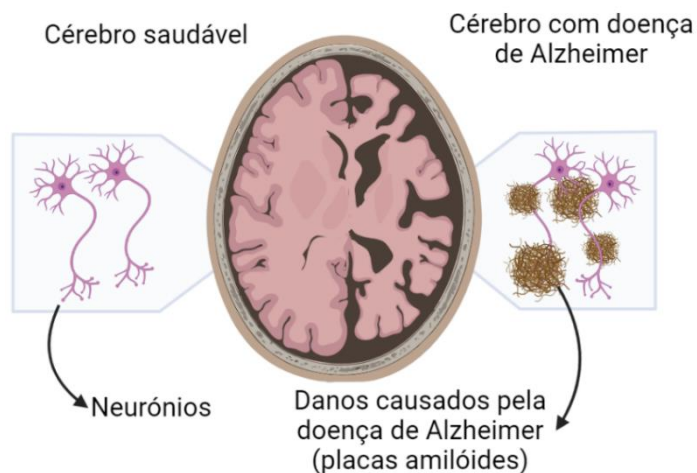


Figura 10 - Cérebro afetado pela doença de Alzheimer em comparação com um cérebro saudável [55].

As causas da DA são multifatoriais mas não são totalmente conhecidas, havendo duas teorias principais, a teoria dos danos colinérgicos e a teoria da deposição $\alpha\beta$ [56]. Para sustentar a hipótese da teoria da deposição $\alpha\beta$ foi identificada a sobreexpressão da proteína apolipoproteína (apoE), uma proteína transportadora do colesterol que interage com a proteína β -amiloide, levando à sua agregação [56][57]. A teoria dos danos colinérgicos baseia-se na constatação que nestes doentes se verifica uma diminuição abrupta no nível de ACh nas sinapses colinérgicas. Estas duas hipóteses são investigadas e debatidas em conjunto pois a deposição $\alpha\beta$ aparenta ser um dos fatores que leva à diminuição dos níveis de ACh nas sinapses colinérgicas [58]. Atualmente não existe um tratamento eficaz para a doença, mas existem fármacos que permitem a amenização de alguns sintomas, quer por aumento de tempo de permanência dos neurotransmissores nas sinapses, por inibição da formação e deposição das placas amilóides e ou por antagonistas dos recetores de N-metil-D-aspartato (NMDA) que permitem a abertura dos canais de cálcio nas sinapses [56][58].

A inibição da AChE tem sido usada como forma de tratamento dos sintomas da DA, uma vez que a inibição da hidrólise da ACh leva a um maior tempo de permanência deste neurotransmissor na fenda sináptica visto que há uma redução na sua hidrólise levando a uma intensificação da transmissão colinérgica, **Figura 12** [51][59]. Os inibidores da AChE, como fármacos para a redução destes sintomas não atuam nas causas da DA, pois não têm a capacidade de cura ou reversão da degeneração nervosa, mas reduzem o avanço da demência [55]. Uma problemática associada ao uso destes inibidores é a possibilidade de ocorrer um aumento dos níveis de ACh no líquido cefalorraquidiano, o que pode levar a um agravamento da DA devido à acumulação dos agregados amiloides [59][60].

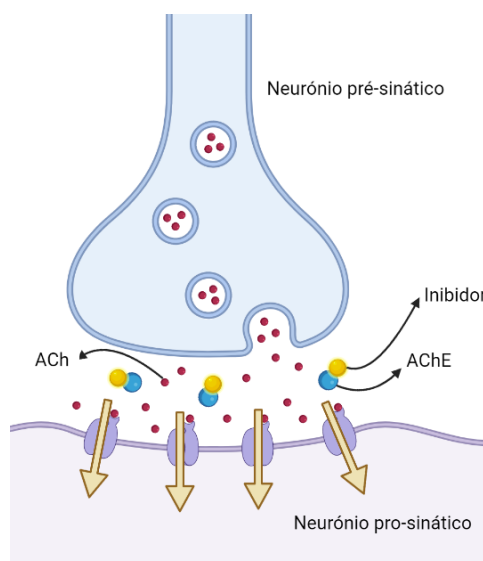


Figura 11 – Esquemática da ação dos inibidores da AChE nas sinapses colinérgicas.

1.3.3. Inibidores da AChE

Os inibidores da AChE são compostos com estruturas diversas, tendo sido o primeiro descoberto nos anos 20. Este inibidor reversível, a fisostigmina, proveniente de *Physostigma venenosum*, uma planta da família das leguminosas conhecida por feijão de Calabar, pertence à família dos alcaloides e é atualmente usado para o tratamento de glaucoma [51][61]. Atualmente são usados análogos sintéticos da fisostigmina como a neostigmina e a pirostigmina, mais simples estruturalmente, cujas estruturas se apresentam na **Figura 13** [51].

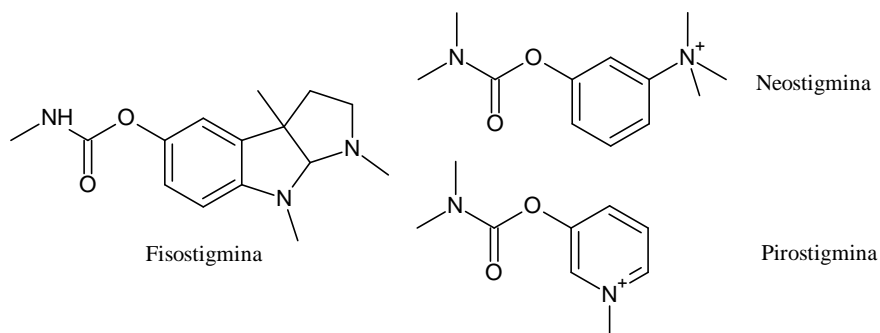


Figura 12 - Inibidores da AChE do grupo da fisostigmina, o primeiro inibidor da AChE, e os respectivos análogos Neostigmina e a Pirostigmina.

Posteriormente, novos inibidores foram introduzidos, entre eles a tacrina que se encontra retirada do mercado por apresentar citotoxicidade hepática. Atualmente, os fármacos mais usados são o donepezilo, **Figura 13**, a rivastigmina, **Figura 14**, e a galantamina, **Figura 15** [62][63].

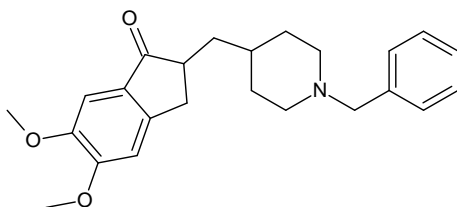


Figura 15 – Estrutura química do Donepezilo.

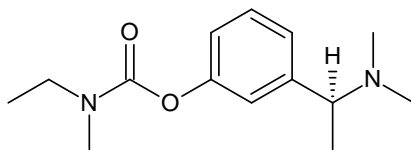


Figura 14 – Estrutura química da Rivastigmina.

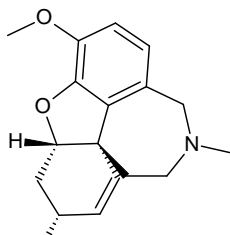


Figura 13 - Estrutura química da Galantamina.

O donepezilo, **Figura 13**, é um dos fármacos mais usados na redução dos efeitos da doença de Alzheimer, sendo usado como tratamento de primeira linha numa dosagem de 5 mg diários, podendo chegar aos 23 mg diários em casos graves [63][64]. O seu uso prolongado garantiu benefícios aos pacientes, possibilitando a recuperação de alguma autonomia nas tarefas diárias e uma melhoria geral das funções cognitivas. O donepezilo, no entanto apresenta alguns efeitos secundários como fraqueza muscular e diarreia. A concentração à qual o donepezilo inibe 50 % da atividade enzimática (IC_{50}) é de 6,7 nM, tendo como mecanismo de inibição, um mecanismo misto devido à interação direta com a tríada catalítica e, em simultâneo com o PAS [65].

A rivastigmina, **Figura 14**, tem um IC_{50} de 4,15 μ M [62], tendo como mecanismo a inibição não competitiva, por bloqueio da entrada do centro ativo em consequência da sua ligação com o centro PAS, constituindo um mecanismo de inibição periférica [66]. É usada em adesivos de libertação prolongada, no entanto causa efeitos secundários como vómitos, diarreia e náuseas. É aconselhada uma dosagem de 4 mg diárias e após 4 semanas de tratamento em casos mais graves, a dosagem pode chegar aos 9 mg diários [64]. O seu uso demonstra melhorias a nível da recuperação da fala e da imprevisibilidade emocional. A rivastigmina é seletiva para uma isoforma da AChE existente no córtex cerebral [66].

A galantamina, **Figura 15**, é administrada a partir de 16 mg diários até 24 mg em casos mais severos, podendo o tratamento chegar às 26 semanas [64]. Os benefícios da galantamina são a melhoria na regulação do sono, um sintoma comum de demências, no entanto apresenta como efeitos secundários principais náuseas, vómitos, diarreia, dores abdominais, astenia e insónias [64]. A Galantamina apresenta um IC_{50} de 11 nM [62], tendo um mecanismo de inibição semelhante à rivastigmina, ligando-se ao centro PAS [66].

Tendo em conta que a maioria dos fármacos disponíveis como inibidores da AChE apresentam alguns efeitos secundários, tem sido constante a procura de alternativas. Estabeleceram-se algumas metodologias e modelos *in vitro* para avaliação da atividade da enzima e potenciais inibidores. A primeira tentativa concluída com sucesso de obter um modelo *in vitro* da AChE foi desenvolvida por Nachmansohn e Lederer, isolando a AChE de enguia elétrica, capaz de hidrolisar 3 g de AChI (análogo da ACh) durante 1h, com recurso a apenas 1 mg de AChE [67]. A AChE de enguia elétrica apresenta uma elevada semelhança estrutural, quer por análise estrutural de corpo rígido, quer de corpo flexível, com a AChE humana, revelando assim a possibilidade de usar a AChE de enguia elétrica para estudos *in vitro* de modo a desenvolver novos inibidores da AChE [67].

Desde então foram desenvolvidos inúmeros métodos de estudos cinéticos *in vitro* para a determinação da capacidade de inibição de potenciais fármacos tendo como alvo a AChE, baseando-se na comparação da velocidade inicial da reação de hidrólise da AChI por parte da AChE, na presença e na ausência de inibidor. A hidrólise da AChI tem como produto a tiocolina e o ácido acético, e os primeiros métodos usados recorriam à titulação do ácido acético [51][67]. Posteriormente foram desenvolvidos novos métodos baseados em colorimetria, galvanometria e fluorescência. Como exemplo de método baseado em colorimetria para a análise da atividade da AChE pode ser identificado o método do *p*-nitrofenol, **Figura 16** [68][69]. Neste método o propionato de *p*-nitrofenol, um éster incolor, é hidrolisado pela AChE em *p*-nitrofenol, um composto amarelo, que analisado por galvanometria permite quantificar a variação da atividade da AChE na presença do inibidor [51][70].

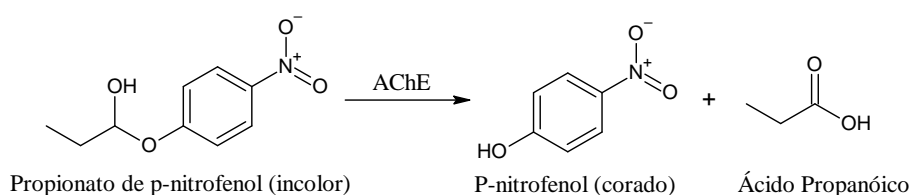


Figura 16 – Hidrólise de propionato de *p*-nitrofenol (incolor) a *p*-nitrofenol (corado) pela AChE.

Um método com recurso a fluorescência é o método do butirato de resorufina, **Figura 17**. Neste método há também a hidrólise de um éster incolor, neste caso num ião fluorescente. O butirato de resorufina é hidrolisada num ião fluorescente, sendo a atividade da AChE analisada pela quantificação do ião formado [51][71].

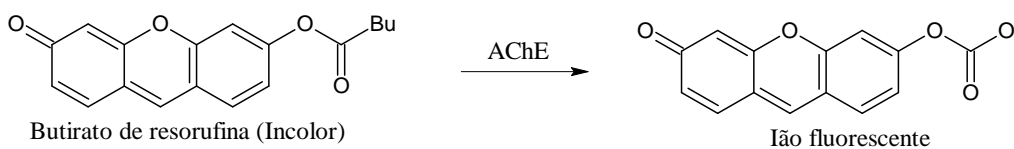


Figura 17 - Hidrólise de Butirato de resorufina (Incolor) ao seu produto fluorescente pela AChE.

O método mais usado atualmente é o método de Ellman, tendo sido desenvolvido por Ellman [72] no seu processo de desenvolvimento de um reagente para quantificação de compostos de enxofre em tecidos celulares. Este método é baseado na velocidade de hidrólise da AChI pela AChE na presença de um inibidor, comparando esta velocidade de hidrólise na ausência de um inibidor [73]. Neste método a AChI incolor, é hidrolisada a tiocolina, um composto também incolor. Na presença do reagente de Ellman, o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), a tiocolina liga-se ao DTNB e dissocia-o em dois iões, o 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina, incolor, e o 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), um ião amarelo, produto que absorve a 405 nm e cuja concentração pode ser determinada por espectrofotometria UV-Vis. A velocidade de formação deste ião amarelo depende apenas da hidrólise da AChI, sendo este o passo determinante da reação em comparação com a grande velocidade com que ocorre a dissociação do DTNB. Esta velocidade da reação enzimática é a quantidade de produto formado medida por espectrofotometria a um comprimento de onda de 405 nm ao longo do tempo da reação [74]. O esquema reacional [73] deste método está representado na **Figura 18**.

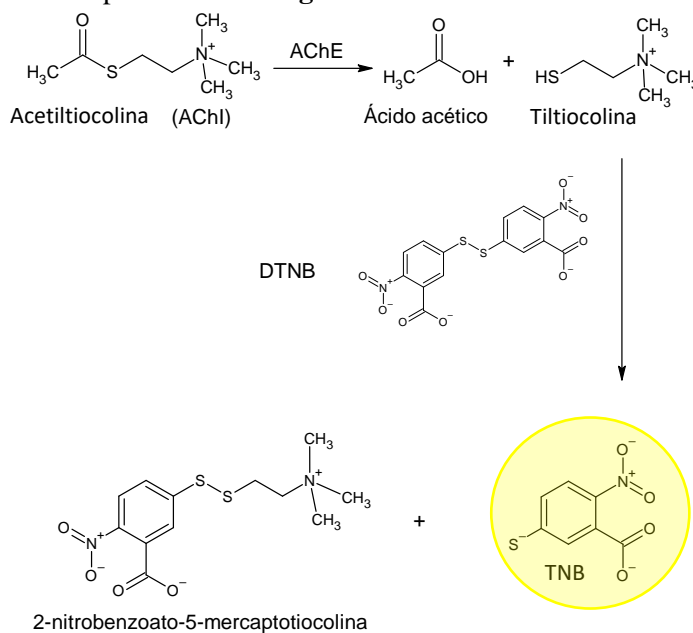


Figura 18 - Reação de Ellman's para determinação da atividade da AChE.

O estudo dos mecanismos de inibição tem sido revolucionado pelo uso de ferramentas in silico, ferramentas estas que usam previsões bioinformáticas baseadas em probabilidade e estatística de modo a sugerir modos de interação entre alvos biológicos e compostos efetores [75]. Nesta dissertação, como complemento ao estudo de inibição enzimática in vitro, será usado o docking molecular, uma ferramenta bioinformática in silico.

1.3.4. Docking molecular

Os estudos de *docking* molecular são cada vez mais usados para explicar o mecanismo de ação de um inibidor sobre uma enzima, sendo muitas vezes associados à descoberta de novos fármacos e mesmo à elucidação das propriedades de compostos já conhecidos [75]. O *docking* molecular é uma ferramenta *in silico* que permite a prever as interações entre moléculas, habitualmente interações entre um recetor/alvo e um ligando. As interações, posição e orientação previstas de um ligando em relação ao recetor permitem obter dados úteis para prever mecanismos da ação de potenciais fármacos, estudar a afinidade de compostos com um determinado alvo, prever o mecanismo de ação entre uma enzima e um substrato [76][77]. Os estudos de *docking* molecular permitem prever a energia de ligação organizando os resultados de interação com base em pontuações e scores [75].

No desenho de fármacos, o *docking* molecular pode ser usado com base em dois tipos de abordagens, a abordagem *Bottom up* ou *Top down* [76]. A abordagem *Bottom-up* é considerada a abordagem tradicional, usando a literatura como ponto de partida, iniciando-se o processo pela síntese de potenciais fármacos e sendo de seguida realizados estudos *in vitro* das propriedades relevantes dos compostos para o fim desejado, sendo o *docking* usado como ferramenta de previsão de mecanismos de ação dos compostos e prever grupos funcionais chave na interação [78]. A abordagem *Top down* tem como ponto de partida a análise *in silico* por *docking* de uma grande quantidade de candidatos a fármacos, sendo que apenas os promissores avançam para estudos *in vitro* [75][78].

Existem diversos algoritmos de *docking* molecular, baseando-se em diferentes métodos de cálculo de scores. A generalidade dos algoritmos calcula a soma das energias livre de Gibbs, para várias orientações entre o ligando e o recetor nas regiões selecionadas para a interação. O cálculo do score varia de acordo com o algoritmo, havendo diversas formas de cálculo que atribuem diferentes pesos a cada parâmetro [76][77]. O estudo de *docking* de ligandos em proteínas é geralmente realizado pelo método semi flexível. Este método usa algoritmos que realizam a procura exaustiva de interações prováveis num determinado volume selecionado. Outros algoritmos fragmentam o recetor ou o ligando procurando interações prováveis e uma consequente montagem do modelo. Existem também modelos não sistemáticos. Estes modelos estoicos baseiam-se na rapidez de encontrar zonas de elevada probabilidade de interação com base nos graus de liberdade. Um dos modelos é o modelo de Monte Carlo que se baseia na introdução de alterações nos graus de liberdade de forma aleatória, verificando o efeito da variação com a interação anterior. Um dos softwares mais usados, AutoDock Vina, que será também usado nesta dissertação, utiliza o modelo de Monte Carlo e o algoritmo do modelo iterativo de Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno (MC/BFGS) [76][79].

A grande vantagem do *docking* molecular é o baixo custo, fácil acessibilidade e flexibilidade. Com diversos modelos e algoritmos disponíveis, é possível obter modelos bastante precisos e de elevado valor científico. Apesar destas vantagens, a principal desvantagem é esta ser uma técnica baseada em previsões, só podendo ser confirmado um mecanismo de inibição, modo de ligação e posição do ligando face ao recetor com recurso a técnicas *in vitro*, como por exemplo ensaios enzimáticos de modo a determinar constantes de inibição, cristalografia e sequenciação proteica [76].

1.4. Cancro

Uma das aplicações e atividades biológicas mais investigadas é a atividade anticancerígena devido à grande necessidade de novos tratamentos com maior eficácia e maior seletividade de modo a diminuir os efeitos secundários graves dos tratamentos atualmente usados. Desta forma, torna-se importante o estudo desta atividade biológica no contexto da presente dissertação.

1.4.1. Definição de cancro e incidência global

O cancro é a designação geral para um conjunto de doenças complexas causadas pelo crescimento descontrolado de células alteradas que não desempenham a sua atividade normal, sendo estas células chamadas de células neoplásicas [81]. O crescimento de células cancerígenas ocorre devido a mutações nos genes, na sua maioria, genes que controlam o crescimento e divisão celular, oncogenes e genes supressores de tumores, resultando da expressão de proteínas anormais ou até na ausência da expressão das proteínas, causando o crescimento descontrolado destas células [82][83][84]. As principais diferenças características das células cancerígenas estão listadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Principais características de células cancerígenas [84].

Características	Células cancerígenas
Morfologia	Contornos e irregulares
Divisão celular	descontrolada
Maturação celular	Diferenciação não regulada
Apoptose	Não sofrem apoptose
Comprimento dos telómeros	Mantém-se inalterado
Organização de tecidos	desorganizados
Deteção pelo sistema imunitário	Não detetáveis
Propagação	Migram para outros tecidos
Fatores de crescimento (FC)	Dividem-se independentemente de FC

O cancro é uma doença comum aumentando com o envelhecimento da população e também com a exposição a fatores de risco, como agentes carcinogénicos e mutagénicos, como o tabaco, radiação UV e ionizante, excesso de peso, consumo excessivo de álcool, infeções virais e dietas não saudáveis [81]. Em 2020, data dos últimos dados compilados a nível global, foram diagnosticados por todo o mundo 18 milhões de novos casos, havendo uma incidência de 190 casos por 100 mil habitantes, sendo que a média de mortalidade atingiu os 100 óbitos por 100 mil habitantes. Estima-se que 40% das mortes causadas por cancro podem ser evitadas por adoção de comportamentos saudáveis e uma monitorização frequente para um diagnóstico em fases iniciais, aumentando significativamente a probabilidade de cura e sobrevivência [85].

1.4.2. Cancro da perspetiva celular

De um ponto de vista celular, o cancro tem dez características chaves propostas por Hanahan e Weinberg, sendo estas: a independência de fatores de crescimento; evasão de fatores de inibição de crescimento; potencial de replicação ilimitado; instabilidade do genoma e mutação; evasão de morte celular e reprogramação do metabolismo; podendo ainda ocorrer a metastização e angiogenese [86][87].

O ciclo celular numa célula normal apresenta quatro fases agrupadas em duas grandes etapas, a fase M e a interfase. A interfase é composta por é composta pelas fases G1, S e G2. Na fase S o material genético da célula é replicado e ocorre a síntese de DNA [88]. Após a fase S a célula entra em pausa, fase G2, onde a célula se prepara para a fase seguinte. Após esta pausa ocorre a fase M, onde o material genético replicado é dividido para duas células a partir da célula mãe, ocorrendo assim a mitose e a citocinese [88][89]. Após a fase M ocorre mais uma pausa, a fase G1, onde a célula se prepara de novo para a fase S, fechando assim o ciclo celular. Nas fases G1, G2 e a meio da fase M ocorrem checkpoints de modo a verificar se existe alguma irregularidade no procedimento do ciclo celular [90]. Estas verificações são reguladas pelas ciclinas e cinases, tendo estas um papel de extrema importância na identificação de mutações.

As mutações que ocorrem no DNA podem causar incapacidade de reparação das mutações. Quando genes supressores de tumores são mutados, a sua expressão deixa de resultar na produção de proteínas que inibem e levam à destruição de células mutadas, um exemplo desse gene é o gene p53 [90]. Uma mutação no gene p53 leva a que a proteína que este codifica deixe de executar a sua atividade normal, não sendo capaz de detetar as mutações e atuar sobre estas. O caso do gene p53 é um dos mais evidentes no estudo do cancro, sendo que 50% dos cancros desenvolvidos envolvem a mutação do gene p53 [92][93].

A expressão de genes mutados e a ausência dos genes supressores de tumores leva a que haja um descontrolo do crescimento e propagação celular, gerando aglomerados de células disfuncionais e que consomem nutrientes de forma elevada e abrupta, colocando outras células sob condições de stress. Desta forma, os tumores adaptam-se as estas condições, vascularizam e

metastizam, passando para a corrente sanguínea e iniciando o seu crescimento noutra local do organismo, alterando outras células e tornando-se dominantes no organismo [89][92]. A apoptose, é um mecanismo de morte celular programada e geneticamente regulada, permite que células durante o seu desenvolvimento normal ou em doenças como o cancro possam ser eliminadas de modo a não propagar células não necessárias ou com funcionalidades incorretas. A má regulação dos mecanismos de apoptose é um fator que permite a proliferação destas células disfuncionais, como as células cancerígenas [91][92].

1.4.3. Tratamento do cancro

Após o diagnóstico do cancro realiza-se um plano de tratamento único para cada doente, tendo em conta que não existem dois tipos de cancro iguais entre os pacientes. Em planos clínicos ideais, cada doente é submetido a análises clínicas detalhadas de modo a identificar cada tipo de cancro de modo a personalizar o tratamento para que este se torne mais eficaz [95]. Em casos em que não existe metastização do tumor, este pode ser removido cirurgicamente se não comprometer a vida do paciente [89][95]. Os tratamentos mais comuns para erradicação de células cancerígenas são a quimioterapia, o uso de fármacos com atividade biológica anticancerígena e a radioterapia, o uso de radiação ionizante e radiofármacos com objetivo de causar danos a nível do DNA das células cancerígenas, levando à sua morte [96]. Existe um novo ramo de tratamentos, a imunoterapia, onde o sistema imunitário do paciente é programado para reconhecer as células cancerígenas como alvos das células efectoras deste sistema de modo que estas sejam eliminadas. Qualquer dos tratamentos usados no cancro têm um grande número de efeitos secundários. Associado à quimioterapia está a elevada toxicidade e falta de especificidade dos fármacos, levando a danos em órgãos não afetados. Devido à diversidade das doenças cancerígenas e a sua extensão de ocorrência na população, é necessária a descoberta de novos fármacos anticancerígenos que tenham uma eficácia elevada minimizando os seus efeitos secundários [96].

Vários compostos da família das fenazinas e naftoquinonas já foram identificadas com atividade biológica anticancerígena, como por exemplo uma 1,4-naftoquinona [13][14] com atividade biológica anticancerígena para leucemia e cancro do rim. A barafenazina [32] foi identificada como anticancerígena contra o cancro do pulmão e próstata. Desta forma é possível verificar que estas famílias de compostos se apresentam promissoras para a descoberta de novos derivados anticancerígenos.

1.4.4. Cancro do fígado

O cancro do fígado é um tipo de cancro em que o crescimento da massa tumoral inicial de um cancro ocorre nos tecidos do fígado. Em 2020, data dos últimos dados globais compilados, os novos casos de cancro do fígado corresponderam a 4,7% de todos os novos casos de cancro, estando em sexto lugar dos cancros mais diagnosticado. Em termos de mortalidade no mesmo

ano, o cancro do fígado correspondeu a 8,3% de todos os óbitos, sendo o terceiro com maior taxa de mortalidade a seguir ao colon e pulmões [85]. Em 2023, na Europa, o cancro do fígado tem uma incidência de 14% face a todos os cancros diagnosticados, sendo que em Portugal corresponde a 2,6% de todos os casos diagnosticados [97]. Existem diversos tipos de cancro do fígado, sendo os mais comuns o carcinoma hepatocelular (HCC) e o colangiocarcinoma, também conhecido como cancro da vesícula biliar.

Os tratamentos aplicados atualmente para o cancro do fígado variam de acordo com a dimensão dos tumores nodulares que se encontram no paciente. De acordo com o número e tamanho dos nódulos, estes podem ser tratados com vários tipos de radiação ou então, em casos em que este tratamento não seja possível, por remoção cirúrgica dos nódulos [99]. Devido à elevada capacidade regenerativa do a remoção das zonas afetadas por tumores é frequente, podendo o fígado regenerar as zonas removidas. Um dos fármacos mais usados para tratar HCC avançado resistente a tratamentos radiológicos é o sorafenic [100]. O sorafenic é um inibidor de múltiplas tirosina cinases responsáveis pela angiogénese e proliferação de hepatócitos cancerígenas. Este fármaco, um inibidor do Fator de crescimento 3 derivado de plaquetas (PDGF-B), Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e Fator de células estaminais (SCF) nos hepatócitos, bloqueando as vias metabólicas de quinases ativadas por mitogénico e sinais extracelulares regulados por quinases (MAPK/ERK), responsáveis pela proliferação dos tumores [101]. Existem tratamentos de quimioterapia para o cancro do fígado que usam fármacos baseados em anticorpos ou pequenas moléculas seletivas para marcadores do fígado, tendo uma elevada eficácia neste tratamento, estando estes tratamentos nas fases finais de ensaios clínicos, revelando um futuro promissor para estas soluções [102].

Foram identificadas naftoquinonas [7] com capacidade de inibir a proliferação de diversas linhas celulares humanas de cancro do fígado, salientando de novo o grande potencial desta família de compostos na atividade anticancerígena. A doxorubicina (DOXO) é um dos fármacos mais usados no tratamento do cancro e de elevada citotoxicidade, sendo por isso usada como referência nos estudos de citotoxicidade. A doxorubicina consegue ser permeada pela membrana interna do núcleo e intercalar o DNA. A zona de intercalação da doxorubicina no DNA coincide com o gene que codifica a DNA topoisomerase II α , TOP2A. Esta enzima é responsável pelo desenrolamento do DNA e também pela reparação das DSB, estruturas que induzem a apoptose por ativação dos genes apoptóticos p53 e FOXO3. Assim, a doxorubicina tornou-se um fármaco largamente usado devido à sua elevada efetividade no tratamento de diversos tipos de cancro, como leucemias, sarcomas e cancros da pele, mama e fígado [99][100][102].

Apesar de diversos fármacos em estudo, a procura por novas soluções de tratamento continua a ser de grande dimensão devido à mortalidade deste tipo de cancro. Em investigação e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de HCC são usados modelos celulares *in*

vitro para estudar a citotoxicidade dos potenciais fármacos a partir de diversos métodos, como o Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e Lactato desidrogenase (LDH). Estes ensaios são realizados em linhas celulares Hep G2, correspondendo esta linha celular a 76% das linhas celulares usadas para estes estudos [103]. As células Hep G2 em comparação com hepatócitos normais são de menor dimensão e irregulares à semelhança das células com HCC *in vivo*. As células Hep G2 têm um nível de mitocôndrias muito baixo em comparação com hepatócitos normais, da mesma forma que as células HCC *in vivo*. Enquanto as células HCC *in vivo* têm um genoma instável, as células Hep G2 tem um genoma estável. Apesar destas diferenças, as células Hep G2 constituem modelos de grande qualidade para testes de citotoxicidade, também devido à sua facilidade de cultivo *in vitro* e propagação [103].

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* são amplamente usados devido à facilidade de crescimento de células *in vitro* e da ampla biblioteca de células disponíveis para cultura. A versatilidade e disponibilidade de meios e suportes de cultura em termos comerciais torna este método o método de eleição para estudos de citotoxicidade preliminares [104]. Apesar disso, o uso de cultura de células animais *in vitro* não representa o funcionamento de um organismo vivo na sua totalidade, podendo haver resultados que diferem de estudos usando modelos *in vivo* devido à sua complexidade e variabilidade de vias metabólicas. O uso de cultura *in vivo* requer, muito frequentemente, o uso de soro fetal bovino, um componente de origem animal e por consequente, de elevada variabilidade, de elevado custo, complexo de um ponto de vista ético e regulatório quando se trata do seu uso para produtos biotecnológicos comerciais [104][105].

Capítulo 2 – Resultados e Discussão

2. Resultados e discussão

Analisando a literatura para o potencial de atividades biológicas da família das fenazinas e naftoquinonas é possível afirmar o interesse destas famílias para diversas aplicações terapêuticas. Com recurso às técnicas disponíveis para a dissertação, o estudo de diversas propriedades biológicas para estas famílias foi realizado de modo a confirmar atividades biológicas e descobrir alguns dos seus mecanismos de ação. Desta forma estes resultados podem ser usados para complementar bibliotecas de compostos e respetivas atividades biológicas, gerando dados de valor científico para futura investigação de modo a descobrir e propor novos compostos como potenciais fármacos. Os compostos testados serão apresentados, listados e numerados no início de cada subcapítulo onde os seus resultados são apresentados e discutidos. A família das fenazinas está numerada com os números **1** (fenazinas) e **2** (fenoxazinas), e seguindo a mesma lógica sequencial, a família das naftoquinonas com os números **3** (1,4-naftoquinonas) e **4** (1,2-naftoquinonas).

Usando ensaios de inibição enzimática e de *docking* molecular será possível prever e propor modos de interação entre os compostos estudados e a AChE, podendo também ser possível relacionar o tipo de interações com o tipo de substituintes usados. A mesma lógica pode ser aplicada para os estudos de citotoxicidade, onde será estudada a citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 através do método do MTT e LDH, seguido de estudos de interação com DNA, citometria de fluxo e de atividade antioxidante com recurso ao 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Desta forma é possível relacionar os compostos estudados e o seu potencial citotóxico com os respetivos substituintes.

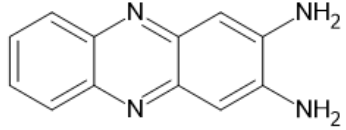
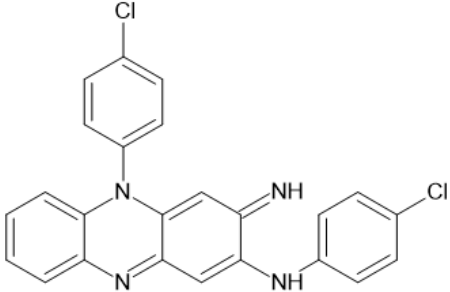
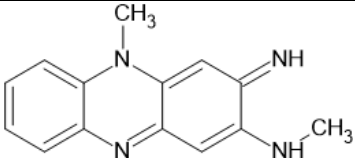
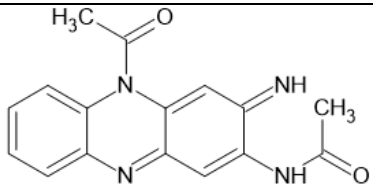
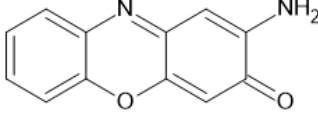
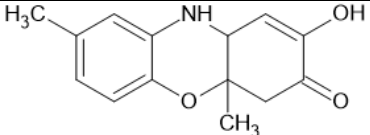
Para os ensaios de inibição da AChE, interação com DNA e atividade antioxidante, foram realizados ensaios em triplicado (n=3) e para os ensaios de MTT e LDH em sextuplicado (n=6).

Deste modo, a presente dissertação propõe-se a estabelecer estas relações de modo a contribuir para um desenvolvimento científico, apresentando resultados que permitem expandir conhecimento sobre atividades biológicas e mecanismos de ação de diversos compostos da família das naftoquinonas e fenazinas.

2.1. Fenazinas e fenoxazinonas

De forma a avaliar a potencialidade de compostos da família das fenazinas (**1-1.c**) e das fenoxazinonas (**2-2.b**), relativamente à capacidade de inibir a AChE e efeito citotóxico contra células Hep G2 do hepatocarcinoma humano foram obtidas por diferentes métodos de síntese os compostos cujas estruturas se apresentam na **Tabela 4**. Os compostos estudados são análogos da Fenazina-2,3-diamina (**1**) com diferentes substituintes (**1a-1.c**) e ainda um análogo da 2-amino-3*H*-fenoxazina-3-ona (**2**) com um substituinte apolar (**2.b**).

Tabela 4 - Fenazinas e fenoxazinas estudadas.

Composto	Ref.	Nome
	1	Fenazina-2,3-diamina
	1.a	<i>N</i> ,5-di(4-clorofenil)-3-imino-3,5-dihidrofenzina-2-amina
	1.b	<i>N</i> ,5-dimetil-3-imino-3,5-dihidrofenzina-2-amina
	1.c	<i>N</i> ,5-diacetil-3-imino-3,5-dihidrofenzina-2-amina
	2	2-amino-3 <i>H</i> -fenoxazina-3-ona
	2.b	2-hidroxi-4a,8-dimetil-4,4a,10,10a-tetrahidro-3 <i>H</i> -fenoxazina-3-ona

2.1.1. Atividade inibitória da AChE

A atividade inibitória das fenazinas e fenoxazinas estudadas (**Tabela 4**) contra a AChE foi determinada de acordo com o método de Ellman's descrito no **Capítulo 4.2.1**, verificando-se a diferença entre a velocidade inicial em ensaios sem composto presente na mistura reacional e a velocidade em ensaios com a presença do composto adicionado. A atividade inibitória foi estudada para diferentes concentrações dos compostos entre os 5 μM e os 100 μM , valor a partir do qual ocorreu a precipitação dos compostos em estudo. Para os compostos que atingiram valores de inibição superiores a 50% até cerca de 80 μM foram calculados os respectivos IC_{50} , ou seja a concentração à qual ocorre 50 % de inibição da enzima (IC_{50}). A **Tabela 5** apresenta os resultados dos ensaios de inibição para a família das fenazinas e fenoxazinas estudadas.

Tabela 5 - Percentagem de inibição da AChE pela família das fenazinas e fenoxazinas à concentração de 100 μM , determinadas pelo método descrito no Capítulo 4.2.1. O valor apresentado é a média de 3 ensaios, s é o desvio médio.

Composto	Inibição \pm s (100 μM) ($\bar{x}\pm s$ %)
1	29 \pm 2
1.a	16 \pm 3
1.b	100 \pm 1
1.c	100 \pm 1
2	32 \pm 2
2.b	97 \pm 1

Ao analisar os resultados da **Tabela 5** é possível verificar que apenas três compostos (**1.b**, **1.c** e **2.b**) desta família atingiram uma percentagem de inibição máxima próxima de 100 %. Em oposição os compostos **1**, **1.a** e **2** não alcançaram 50% de inibição à concentração máxima testada de 100 μM , revelando um fraco potencial inibitório. Considerando que estruturalmente, os compostos **1** e **2** são compostos de base sem substituintes adicionados, pode admitir-se que a sua estrutura tem uma baixa capacidade de interação com a AChE ou com a sua fenda catalítica, não interferindo com a atividade enzimática. O composto **1.a** interfere ainda menos na atividade da AChE, com uma baixa capacidade de inibição, evidenciando que a adição do substituinte aromático clorado não o favorece em interações que resultam na inibição da AChE. Este composto (**1.a**) é particularmente volumoso em comparação com os restantes, o que sugere a possibilidade de ocorrer algum impedimento estérico entre o composto e as interações com a enzima, em particular na fenda catalítica, justificando a baixa capacidade de inibição da atividade enzimática.

Os compostos **1.b**, **1.c** e **2.b**, ao contrário dos restantes, apresentaram maior potencial inibitório, e aumentado em particular, relativamente aos compostos **1** e **2** que são a sua estrutura

percursora inicial com a adição de substituintes. Para estes compostos **1.b**, **1.c** e **2.b**, foram calculados os valores do IC₅₀ de modo a comparar os seus potenciais inibitórios, por representação das curvas dose resposta no software *GraphPad Prism 5*. À medida que ocorreu o aumento da concentração dos compostos **1.b**, **1.c** e **2.b** potenciais inibidores foi possível verificar uma diminuição do declive da curva de progressão da reação, o que significa que há uma diminuição da velocidade inicial da reação, aumentando a percentagem de inibição.

Na **Tabela 6** apresentam-se os IC₅₀ calculados para os compostos **1.b**, **1.c** e **2.b**, bem como os limites de concentração testados e respetivos erros e declives de Hill que fornece o declive da curva dose-resposta. Apresenta-se também uma das curvas de dose resposta obtidas na **Figura 19**, neste caso para o composto **1.b**, de modo a ilustrar os resultados obtidos. As restantes curvas estão presentes no **Anexo 1 e 2**, para as curvas obtidas os valores de coeficiente de correlação (r²) foram superiores a 0,966.

Tabela 6 - Valores de IC₅₀, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para os compostos da família das fenazinas e fenoxazinas.

Composto	IC ₅₀ ±s (μM)	Limite mínimo (μM)	Limite máximo (μM)	Declive	ER (%)
1.b	17±6	5,01	31,6	5,2	5,1
1.c	96±3	25,1	100	1,9	8,3
2.b	24±3	7,09	79,4	1,5	6,2

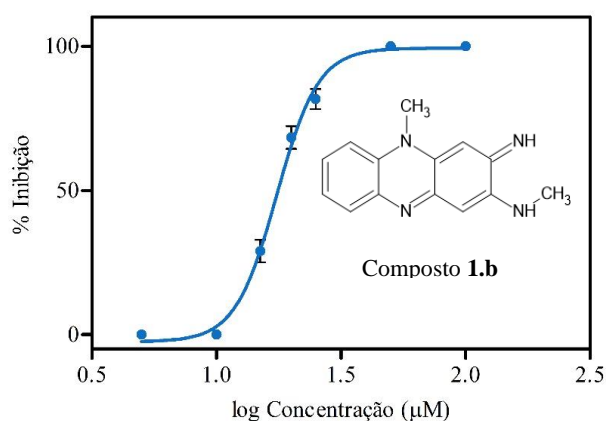


Figura 19 - Curva dose-resposta do composto **1.b** representando o modelo não linear ajustado à percentagem de Inibição da AChE para o logaritmo das diferentes concentrações do composto.

Pela análise dos valores de IC₅₀ compilados na **Tabela 6**, é possível verificar que os erros relativos estão no máximo na casa dos 8%, apresentado uma boa exatidão nos dados. Analisando os limites mínimos calculados, verifica-se que os compostos **1.b** e **2.b** apresentam atividade inibitória a partir de concentrações menores do que o composto **1.c**, apresentando também os

menores valores de IC₅₀, de 17±7 µM e 24±3 µM, respetivamente. Sendo assim, composto **1.b** revelou-se como o composto desta família com maior potencial inibitório para a AChE. Para além disso, o composto **1.b** também apresentou um declive de Hill elevado o que significa que uma pequena variação da sua concentração provoca um aumento acentuado na percentagem de inibição., revelando-se de maior potência. O composto **1.c** foi o que apresentou o valor de declive bastante mais baixo, ou seja, exibe um aumento de percentagem de inibição menos abrupto que os restantes compostos da família, apresentando também o valor mais elevado de IC₅₀, 96±3 µM. Para todos os compostos o limite máximo testado foi os 100 µM, valor a partir do qual ocorre uma inibição de 100%, ficando a enzima incapaz de exercer a sua atividade. Apesar do potencial verificado face aos restantes compostos, os IC₅₀s mais promissores apresentam-se muito mais elevados do que os inibidores comerciais de menor potencia, como é o caso da Rivastigmina, com um IC₅₀ de cerca de 4 µM, sendo este composto duas vezes mais potente que os testados.

De modo a entender a relevância estatística dos valores obtidos, realizou-se uma análise de variância unilateral com um nível de confiança de 95%, *one-way ANOVA*, seguido de um teste de *Tukey, post-hoc* para comparar dois a dois os valores dos IC₅₀, de modo a avaliar se os valores dos IC₅₀ determinados para os compostos são significativamente diferentes. Para realizar esta análise utilizou-se o software on-line StatPages.org. Na **Tabela 7** apresentam-se os resultados desta análise estatística.

Tabela 7 - Valores de *p-value* entre os compostos da família das fenazinas e fenoxazinas testados.

Teste	Compostos	<i>p-value</i>
1	1.b vs 1.c	0,0000
2	1.b vs 2.b	0,5265
3	1.c vs 2.b	0,0000

Ao analisar os resultados dos testes estatísticos (**Tabela 7**) é possível verificar que o *p-value* é bastante baixo na comparação entre os compostos **1.b/1.c** e **1.c/2.b**, demonstrando que o valor do a IC₅₀ para o composto **1.c** é diferente com um grau de confiança superior a 95 % em comparação com os compostos **1.b** e **2.b**. Pelo contrário, o *p-value* entre os compostos **1.b/2.b** é superior a 0,05 o que significa que os compostos **1.b** e **2.b** têm valor de IC₅₀ estatisticamente semelhantes.

Na **Figura 20** apresentam-se os IC₅₀ dos três compostos graficamente.

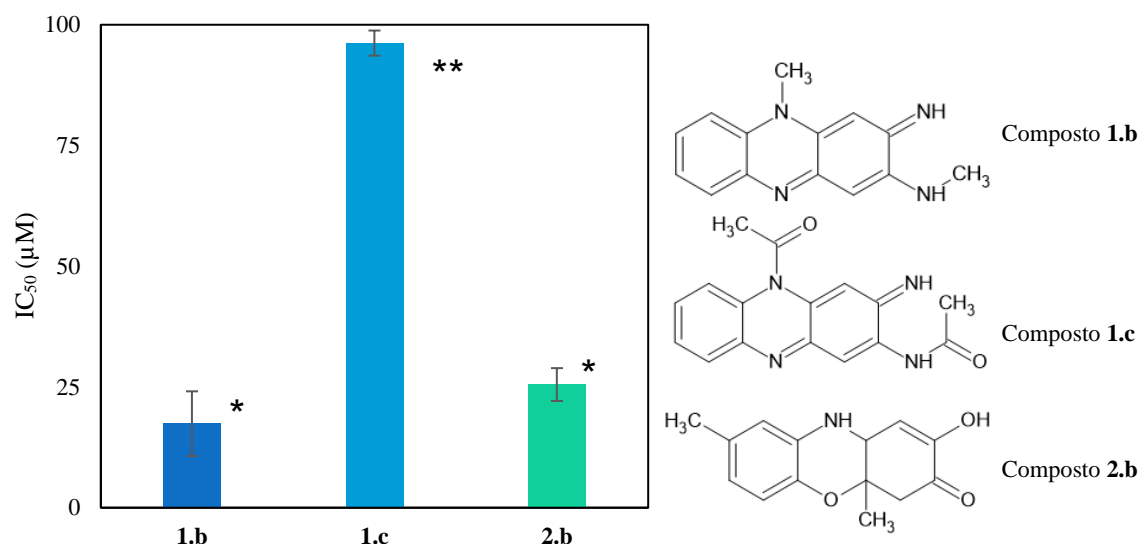


Figura 20 - Comparação dos IC₅₀ para os compostos **1.b**, **1.c** e **2.b** e respectivas estruturas.
* - p-value < 0,5 e ** - p-value > 0,5.

Ao comparar a estrutura dos compostos **1.b**, **1.c** e **2.b**, (**Tabela 7**) verifica-se que esta pode ser a chave para o potencial inibitório destes compostos face aos restantes testados. Verifica-se que estes compostos têm o grupo substituinte -metilo, à semelhança da acetilcolina, o substrato da enzima

Estudos de *docking* molecular, permitem fazer uma previsão da posição e tipos de interações que ocorrem entre a AChE e os compostos em estudo. Esta análise permite prever as interações que ocorrem entre a estrutura da enzima e composto, fornecendo dados como a energia, distância e tipo de ligação, sugerindo vários modelos com vários *scores* de *docking*

Realizaram-se estudos de *docking* molecular, nos quais foram previstas as interações entre a enzima e os compostos **1.b**, **1.c** e **2.b** uma vez que estes apresentaram melhores resultados de inibição da AChE. Os estudos de *docking* molecular foram executados usando o software AutoDock Vina via Chimera 1.16, e visualizados no Discovery Studio Visualizer, de acordo com o protocolo descrito no **Capítulo 4.2.2**. foi selecionada a previsão de interação com *score* absoluto mais alto (o mais negativo), e obteve-se um modelo 3D e 2D das interações, o tipo de interações e a distância entre os átomos do composto e os respetivos resíduos de aminoácidos na proximidade do centro ativo com os quais se prevê que interajam.

Os resultados obtidos para o *docking* molecular dos compostos **1.b**, **1.c** e **2.b** são apresentados nas **Figuras 21-23**, estando as respetivas tabelas com as distâncias das interações em anexos (**Anexo 3-5**).

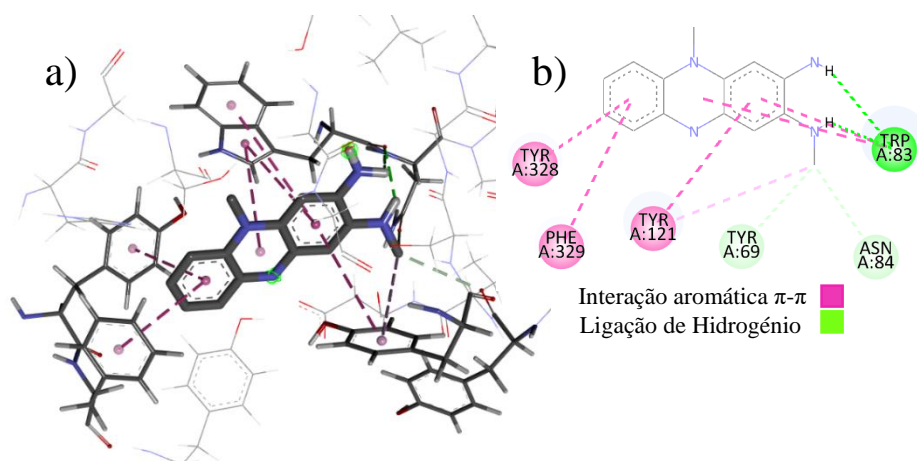


Figura 22 - Interações do composto **1.b** com a AChE, previstas por docking molecular pelo software Autodock Vina, visualizado em Discovery Studio Visualizer. a) modelo de interações em 3D; b) modelo de interações em 2D.

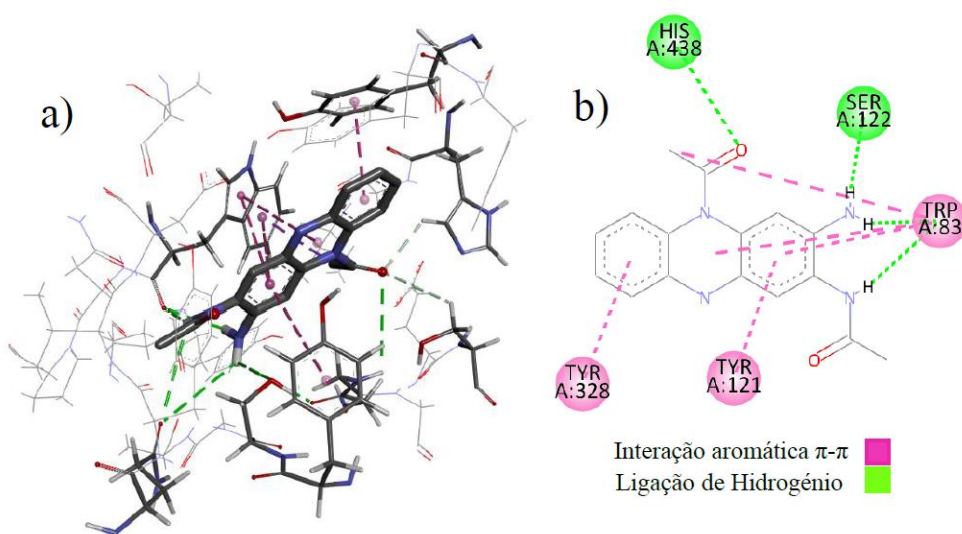


Figura 21 - Interações do composto **1.c** com a AChE, previstas por docking molecular pelo software Autodock Vina, visualizado em Discovery Studio Visualizer. a) modelo de interações em 3D; b) modelo de interações em 2D.

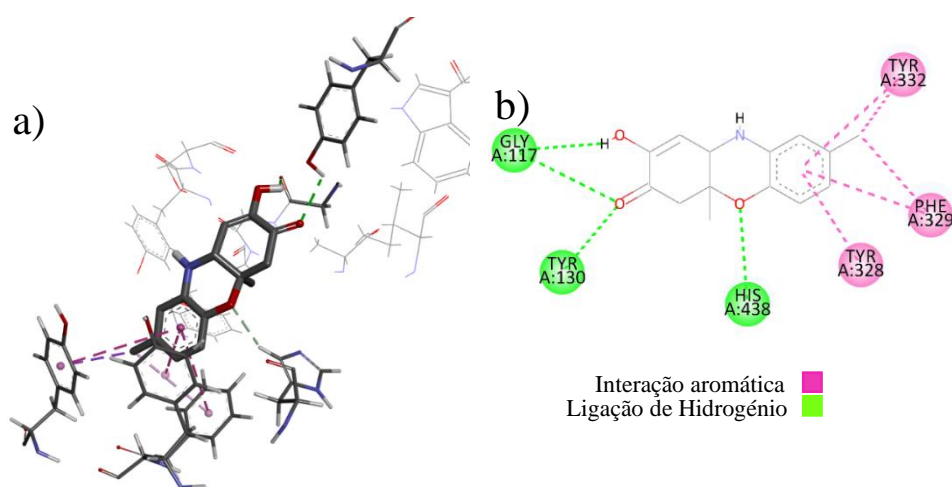


Figura 23 - Interações do composto **2.b** com a AChE, previstas por docking molecular pelo software Autodock Vina, visualizado em Discovery Studio Visualizer. a) modelo de interações em 3D; b) modelo de interações em 2D.

Ao analisar os resultados é possível verificar que com todos os compostos a maioria das interações da enzima ocorre pelos anéis aromáticos e ligações de hidrogênio, sendo esperado que ocorram interações mais fortes e mais estáveis nos compostos cujos anéis apresentam maior densidade eletrônica, o que neste caso, ocorreu para os compostos **1.b**, **1.c** e **2.b** devido ao aumento de densidade nos anéis induzida pelos substituintes (comparativamente com os compostos **1**, **2** e **1.a**). Pela análise dos resultados foi também possível verificar que no modelo apresentado não foram previstas interações com os resíduos aminoacídicos pertencentes à tríada catalítica (Ser200, His400 e Glu327). No entanto, ocorreu a previsão de ocorrerem interações com resíduos aminoacídicos próximos da tríade catalítica, em particular com His438, nomeadamente para o composto **1.c** e **2.b**. No entanto, o composto **1.c** não foi o que apresentou maior atividade inibitória da AChE. Ao analisar os resultados foi também possível verificar que todos os compostos interagem com a AChE através do CAS e PAS. No entanto, é possível verificar que o composto **1.c** realiza interações com estes centros a uma maior distância, sendo que as interações aromáticas que este realiza com os resíduos aminoacídicos do CAS e PAS (Trp83, Try328 e Phe329) apresentam uma distância na ordem dos 5 Å, enquanto os compostos **1.b** e **2.b** apresentam ligações semelhantes e a uma distância na ordem de 2 a 4 Å, podendo esta menor distância de interações ser responsável pelo maior potencial inibitório dos últimos (**Anexo 3-5**). As interações dos compostos nestes centros parece ser responsável por diminuir a atividade da AChE e portanto importantes alvos para o desenho de fármacos inibidores da AChE, à semelhança do reportado na literatura [78][80]. Assim, os resultados obtidos parecem indicar que os compostos **1.b** e **2.b** sendo inibidores da AChE por interação com o CAS e o PAS, revelam potencial para permitir um maior tempo de permanência do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, ocorrendo uma perda de informação menor, revelando-se promissores para a mitigação dos efeitos da doença de Alzheimer.

Realizou-se o mesmo tipo de análise por *docking* da interação da AChE com o composto **1.a**, que revelou baixa capacidade inibitória da enzima, obtendo-se o modelo 3D e comparou-se com o mesmo tipo de análise com o composto **1.b**. Na **Figura 24a** e **24b** encontram-se estes resultados, respetivamente.

Ao analisar os modelos 3D, foi possível verificar que o composto **1.a** não entra na sua totalidade na cavidade catalítica devido ao grande tamanho do substituinte clorado, interagindo apenas com os resíduos da zona de entrada para a cavidade, em oposição ao composto **1.b** com maior efeito inibitório, associada à interação com o CAS e PAS, já referida. Desta forma é possível concluir que para que os compostos da família das fenazinas inibam a atividade da AChE parece ser importante a capacidade de entrar na cavidade catalítica

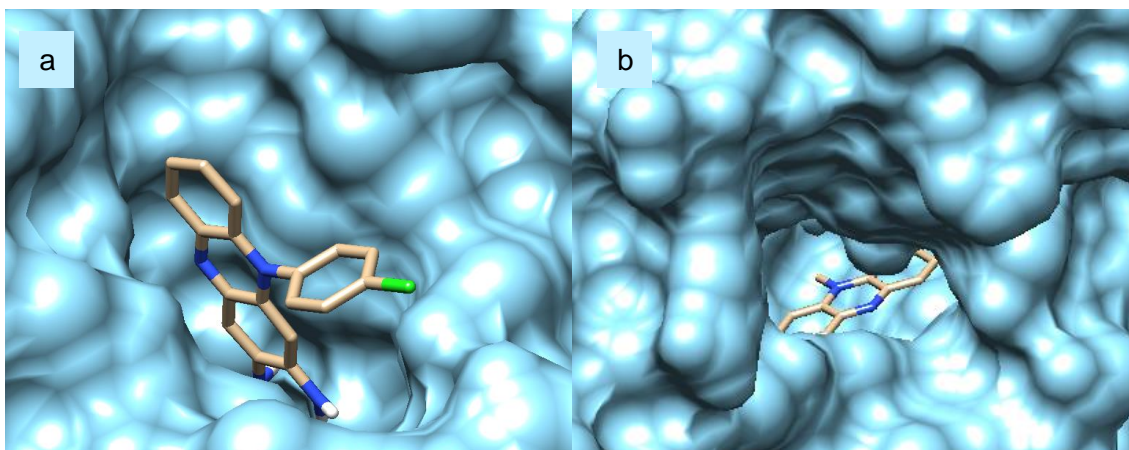


Figura 24 - Posições previstas dos compostos **1.a** a) e **1.b** b) na cavidade catalítica da AChE.

Para estudar mais detalhadamente a capacidade de inibição da AChE pelos compostos em estudo podem realizar-se várias abordagens experimentais [78]. Pode realizar-se um estudo de cinética enzimática de modo a determinar o mecanismo pelo qual os compostos da família das fenazinas inibem a AChE, determinando as constantes de inibição. Em simultâneo, ao realizar-se a determinação da estrutura terciária da AChE por cristalografia de Raios X em contacto com os compostos é possível determinar a posição em que estes interagem com a enzima. Este estudo pode relacionar-se com o estudo da cinética uma vez que o local onde ocorrem as interações enzima-composto está relacionada com o mecanismo de inibição.

2.1.2. Atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos compostos da família das fenazinas e fenoxazinas estudados foi realizado de acordo com o procedimento experimental descrito no ponto 4.3. O método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) permite avaliar a capacidade dos compostos em estudo neutralizarem o radical livre DPPH, reduzindo-o à sua forma DPPH-H, **Figura 25**. Os compostos antioxidantes neutralizam espécies radicais responsáveis pelo stress oxidativo condição que leva deterioração das biomoléculas por vários mecanismos. Os compostos com este tipo de capacidade antioxidante ajudam na manutenção da integridade dos constituintes celulares e tecidos, prevenindo o aparecimento de doenças causadas pela ação das espécies radicais [106].

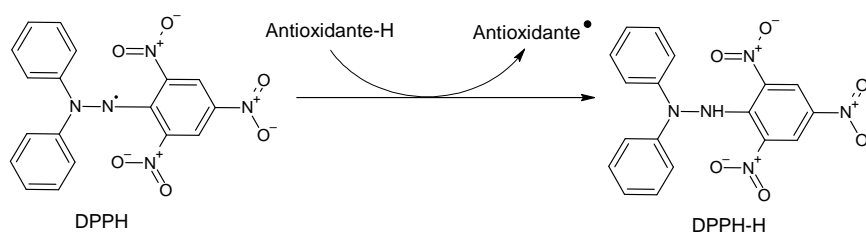


Figura 25 - Reação de eliminação do radical DPPH.

Foram testadas as fenazinas **1**, **1.a**, **1.b** e **2** a uma concentração de 100 μM , apresentando-se os resultados para a percentagem de Atividade Antioxidante (%AA), na **Tabela 8**, e de forma visual na **Figura 27**.

Tabela 8 - Valores obtidos para a %AA e respetivo desvio padrão, a uma concentração de 100 μM para os compostos **1**, **1.a**, **1.b** e **2.b**.

Composto	AA \pm s (%)
1	16 \pm 4
1.a	34 \pm 5
1.b	24 \pm 5
2	80 \pm 1

Ao analisar os resultados da **Tabela 8** é possível verificar que os compostos **1**, **1.a** e **1.b** apresentam valores de atividade antioxidante aproximadamente iguais a uma concentração de 100 μM , destacando-se destes três compostos apenas o composto **2** com uma AA de 80 \pm 1%.

De modo a entender a relevância estatística dos valores obtidos, realizou-se uma análise de variância unilateral com um nível de confiança de 95%, *one-way ANOVA*, seguido de um teste de *Tukey, post-hoc* para comparar dois a dois os valores de %AA, de modo a avaliar se estes são estatisticamente diferentes. Para realizar esta análise utilizou-se o software on-line StatPages.org. Na **Tabela 9** apresentam-se os resultados desta análise estatística.

Tabela 9 - Valores de p-value entre os compostos da família das fenazinas e fenoxazinas testados.

Teste	Compostos	p-value
1	1 vs 2	0,0000
2	1 vs 1.a	0,0954
3	1 vs 1.b	0,9926
4	2 vs 1.a	0,0005
5	2 vs 1.b	0,0000
6	1.a vs 1.b	0,1391

A partir destes resultados é possível afirmar que a AA dos compostos **1**, **1.a** e **1.b** é estatisticamente idêntica, e estatisticamente diferente da AA do composto **2**, sendo possível apresentar os resultados de forma gráfica, **Figura 26**.

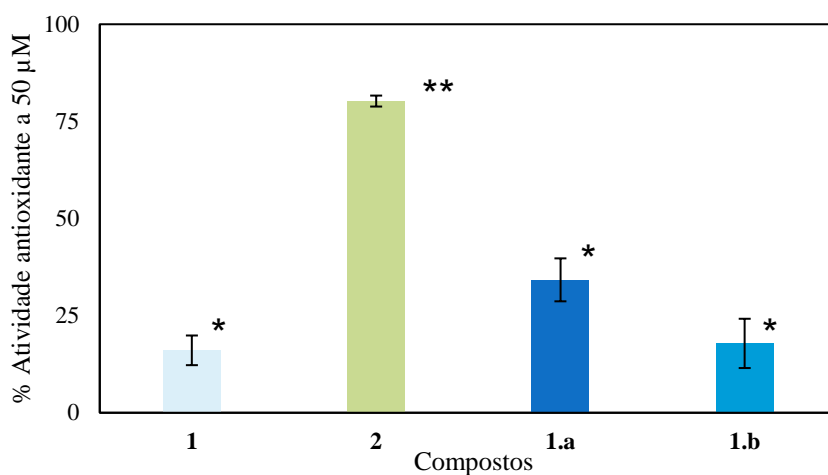


Figura 26 - Atividade antioxidante dos compostos da família das fenazinas a uma concentração de 100 µM. * - p-value < 0,5 e ** - p-value > 0,5.

O composto **2** apresenta para a mesma concentração uma maior atividade antioxidante de cerca de 80%. Resultados semelhantes foram reportados na literatura para outras fenoxazinas de estrutura semelhante, revelando que estes compostos têm potencial de utilização no tratamento de doenças associadas ao stress oxidativo, como por exemplo a esclerose múltipla, uma doença causada por danos do SNC [106][107]. Assim, é possível afirmar que o composto **2** apresenta potencial como estrutura base para a síntese de novos análogos antioxidantes.

2.1.3. Citotoxicidade em linhas celulares Hep G2

O potencial citotóxico dos compostos das fenazinas foi testado pelo método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em linhas celulares Hep G2, como descrito no **Capítulo 4.1.1**. O estudo teve como objetivo determinar os valores de concentração de composto que induz 50 % de morte celular (EC_{50}).

Foram testados os compostos **1**, **1.a**, **1.b**, **1.c** e **2**, sendo que os compostos **1.a**, **1.b** e **1.c**, a partir dos 50 μ M perdiam solubilidade no meio de cultivo celular (DMEM). O composto **2**, a partir dos 60 μ M perdeu também solubilidade no meio de crescimento, e o composto **2.b** não foi possível ser testado à contaminação do meio de cultura por um fungo (**Anexo 6**), inviabilizando todas os frascos usados. A única solução possível teria sido o descongelamento de um novo lote de células Hep G2, mas não podia ser dada a garantia que as células manteriam as mesmas características das células usadas nos ensaios até então.

Na **Figura 27** apresentam-se os valores de citotoxicidade dos compostos **1**, **1.a**, **1.b**, **1.c** e **2** a uma concentração de 50 μ M. Ao estudar os compostos **1**, **1.a**, **1.b**, **1.c** e **2**, verificou-se que grande parte dos compostos não provocou morte celular a 50% da população, tendo apenas sido atingido esse valor para o composto **1**. No **Anexo 7** apresentam-se os dados da **Figura 27**. Desta forma, é possível afirmar que os compostos **1.a**, **1.b**, **1.c** e **2** não apresentam potencial citotóxico.

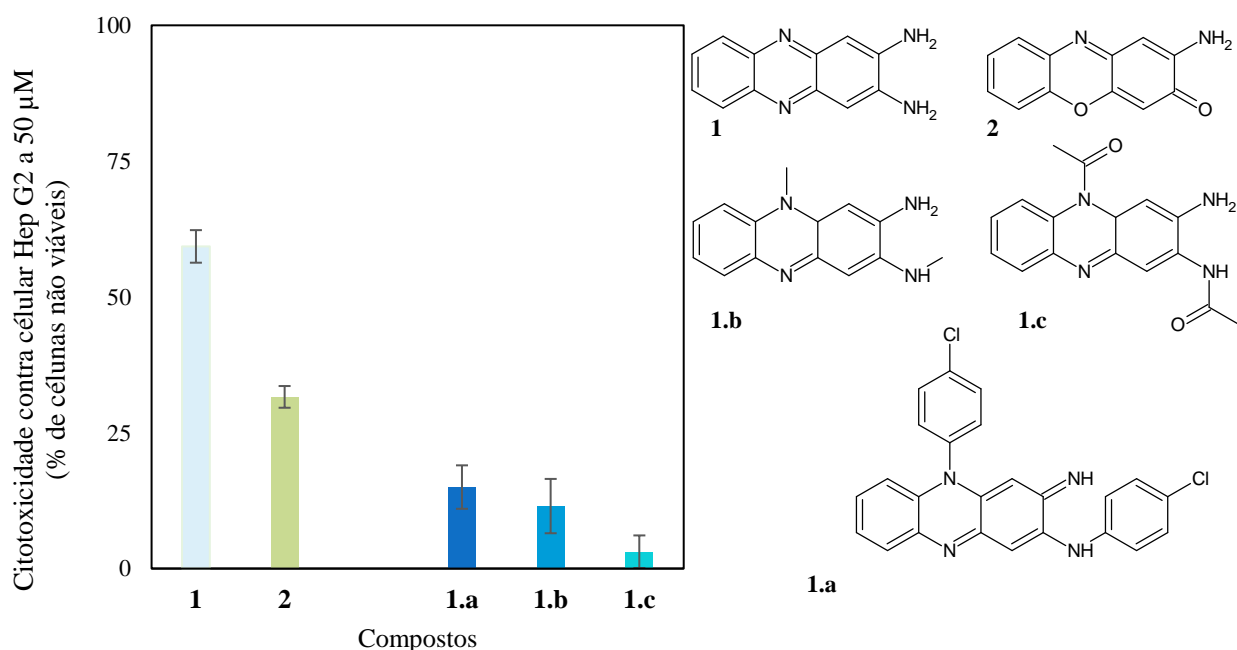


Figura 27 - Citotoxicidade contra células Hep G2 a 50 μ M em percentagem de células não viáveis, determinada pelo método colorimétrico do MTT.

A curva dose-resposta para o composto **1** está representada na **Figura 28** e a partir desta obteve-se um valor de EC₅₀ de 32±3 μM com recurso ao software *GraphPad Prism 5*, apresentando-se no **Anexo 8** os parâmetros (Valores de EC₅₀, limites máximos e mínimos, declive e ER) para os compostos da família das fenazinas e fenoxazinas calculados pelo software. O valor obtido é muito superior ao EC₅₀ da doxorrubicina, fármaco anticancerígeno usado com EC₅₀ de 1,46 μM em células Hep G2 [108], é possível afirmar que o composto **1** apresenta potencial como estrutura de base para novos análogos com potencial anticancerígeno.

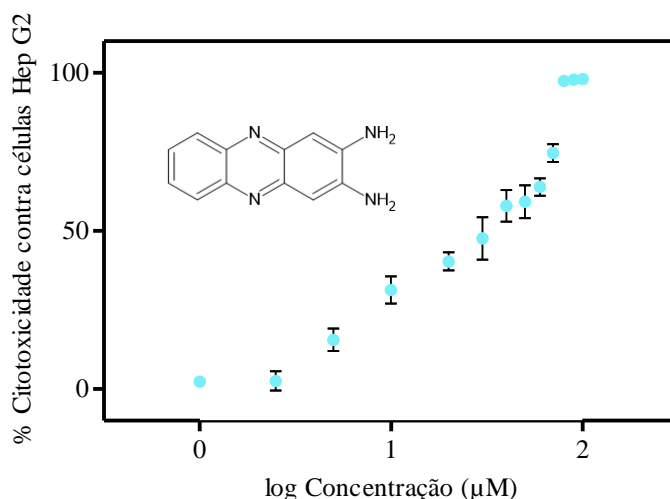


Figura 28 - Curva dose-resposta para o composto **1**.

A partir da **Figura 28** é também possível verificar que os compostos resultantes da adição de substituintes ao composto **1** não resultaram num aumento de citotoxicidade, não se verificando à partida uma tendência que relacione a estrutura com a citotoxicidade dos compostos. Ao aprofundar a pesquisa bibliográfica sobre parâmetros estudados no desenvolvimento de novos fármacos, verificou-se que o coeficiente de partição (log P) é um dos parâmetros mais importantes devido a ser um indicador de permeabilidade membranar e um dos parâmetros pertencentes ao conjunto de propriedades Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET). Este parâmetro pode ser calculado pela equação 1 [109]:

$$\log P = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{Octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{Água}}} \right) \quad (1)$$

Um valor de log P elevado indica que o composto apresenta um caráter lipofílico, logo uma maior afinidade com fases e moléculas apolares, enquanto um log P baixo indica um caráter hidrofílico, ou seja, uma maior afinidade com fases e moléculas polares, sendo que a maioria dos fármacos em comercialização apresentam um log P entre 2 e 4 [110]. A “*Lipinski's Rule of 5*” indica que quatro regras principais para que um fármaco tenha uma boa biodisponibilidade: 1º uma massa molecular inferior a 500 Da; 2ª O número total de doadores de ligações de Hidrogénio

deve ser igual a 5; 3ª O número total de aceitadores de ligações de Hidrogénio deve ser menor que 10; e por fim, 4ª o log P do composto deve ser inferior a 5 [110]. A partir desta regra, que sugere que para uma eficaz absorção oral e intestinal de um fármaco, este deve ter um log P inferior a 5. O log P apresenta-se assim como um parâmetro relevante para o estudo da família das fenazinas.

Os log P para cada fenazina testada foram previstos usando o software Molinspiration, registando-se os valores na seguinte tabela:

Tabela 10 - Valores de log P previstos pelo software Molinspiration para a família das fenazinas e fenoxazinas testadas para citotoxicidade.

Composto	log P previsto
1	2,11
1.a	6,05
1.b	1,29
1.c	0,91
2	2,05

Ao analisar os resultados da previsão é possível verificar que os compostos **1** e **2** encontram-se dentro do intervalo da maioria do log P dos fármacos em comercialização, enquanto os compostos **1.b** e **1.c** estão abaixo deste valor. O único composto que se apresenta acima do intervalo de log P para fármacos comerciais e acima do parâmetro definido pela *Lipinski's Rule of 5*, é o composto **1.a**, que se apresenta muito hidrofóbico.

Para estudar o efeito do log P na citotoxicidade das fenazinas, o seu valor de citotoxicidade dos compostos a 50 µM para a linha celular HepG2 foi representado em função do log P, apresentando-se os resultados na **Figura 29**.

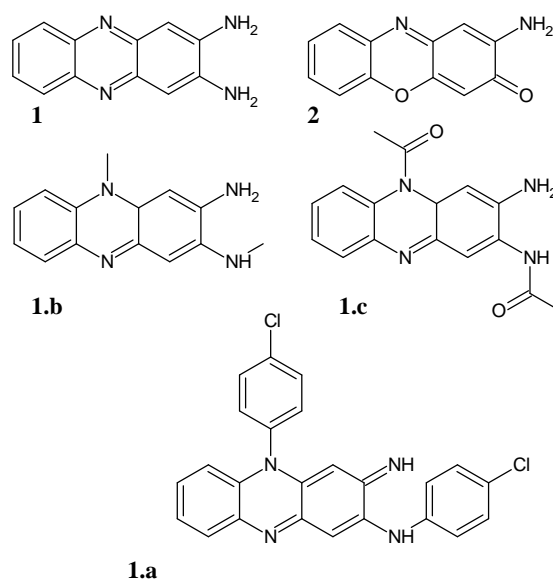
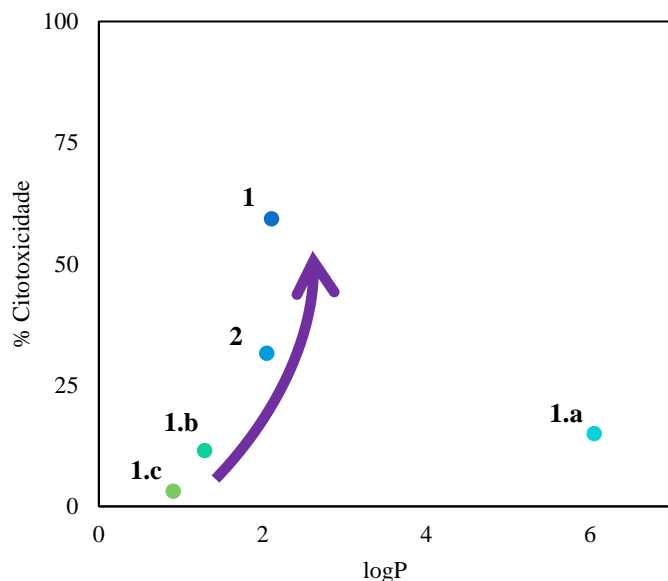


Figura 29 - Influencia de log P na citotoxicidade das fenazinas contra células Hep G2.

Ao analisar os resultados obtidos foi possível verificar que os compostos cujos valores de log P estão próximos de 2 têm maior toxicidade contra as células Hep G2. Foi também evidente que o composto de maior hidrofobicidade, o composto **1.a**, com um log P de 6,05, apresentou a menor citotoxicidade, estando estes dois parâmetros relacionados. É possível concluir que os compostos **1.c**, **1.b**, **2** e **1** apresentam maior capacidade prevista de serem permeáveis pelas células, enquanto que o composto **1.a** apresenta uma menor probabilidade de ser permeável pela membrana das células.

A partir destes resultados pode sugerir-se que as fenazinas com caracter hidrofóbico moderado, apresentam uma maior citotoxicidade contra células cancerígenas Hep G2, revelando uma relação muito interessante e útil para desenho de novos fármacos com base em fenazinas.

De modo a compreender o mecanismo de morte celular das células Hep G2 associado ao efeito dos compostos estudados, estudou-se se os compostos levaram à fragilização da membrana celular, pelo método colorimétrico do lactato desidrogenase (LDH). O estudo das células onde ocorreu a morte celular por destruição da membrana foi realizado de acordo com o protocolo descrito no **Capítulo 4.1.5**, para uma concentração dos compostos **1-1.c** e **2** de 50 µM. Os resultados obtidos apresentam-se na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Citotoxicidade obtida para os compostos da família das fenazinas a 50 µM pelo método do LDH.

Composto	% Citotoxicidade ±s (50 µM)
1	11±5
1.a	4±3
1.b	0
1.c	0
2	0

Ao analisar os resultados, foi possível verificar que os compostos da família das fenazinas não apresentam uma capacidade elevada para fragilizar a membrana celular das células HEPG2, evidenciando valores de citotoxicidade pelo método do LDH bastante reduzidos. Desta forma é possível concluir que estes compostos não apresentam um mecanismo de morte celular relacionado com a fragilização da membrana, não tendo esta fragilização papel citotóxico relevante.

Foi ainda analisada a capacidade destes compostos interagirem com o DNA, de modo a compreender o mecanismo de morte celular.

2.1.4. Interação com o DNA

A doxorubicina tem vários mecanismos propostos de ação para a sua atividade anticancerígena, passando pela indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células e pela interação com o DNA. Apesar do largo uso deste fármaco, este apresenta uma elevada cardiotoxicidade e confere resistência a múltiplos fármacos, *multidrug resistance* (MDR), em células cancerígenas. Estes fatores abrem espaço à procura de fármacos com semelhantes atividades, mas com efeitos secundários reduzidos [111].

Estudou-se a capacidade de interação dos compostos estudados com o DNA (dsDNA de salmão *Oncorhynchus keta*) por espectrofotometria UV-Vis. seguindo o protocolo no **Capítulo 4.4** mencionado na parte experimental, foi possível estudar a interação do DNA com os compostos **1** e **2**, com os quais se verificou com maior citotoxicidade das células Hep G2 e para o composto **1.a**, com o maior log P. Dada a coloração dos restantes compostos não foi possível fazer este tipo de estudo por espectrofotometria. Estes compostos foram testados em meio aquoso com concentrações crescentes de DNA de 2,5 mM até 10 mM, mantendo a concentração de composto a testar constante [112].

Nos resultados obtidos para o espectro UV-Vis do composto **1** (verde), **Figura 30**, é possível verificar que existem três efeitos observáveis com a presença de DNA de 2,5 a 10 mM. É possível verificar o desaparecimento da banda característica do DNA aos 280 nm. É também possível verificar um efeito hipocrômico para a banda característica do composto **1**. Ao analisar os comprimentos de onda a que o pico desta banca ocorre é possível verificar que existe uma movimentação deste pico para comprimentos de onda mais elevados, passando de 250 nm para 259 nm, evidenciando um efeito batocrômico. Desta forma é possível afirmar que o composto **1** tem capacidade de interação com o DNA [112], podendo esta interação estar relacionada com o mecanismo de morte celular que induz nas células.

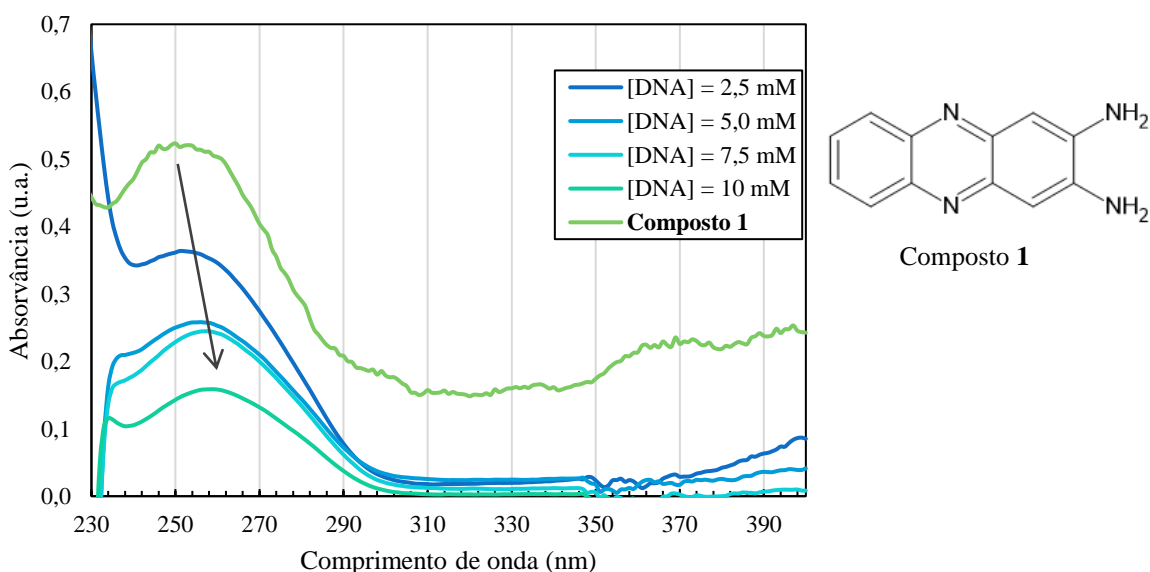


Figura 30 - Espectro de absorção do Composto **1** e DNA em H₂O e 1% DMSO para várias concentrações de DNA.

Realizando a mesma análise para o composto **2**, com resultados apresentados na **Figura 31**, é possível verificar, à semelhança do que foi possível verificar para o composto **1**, um desaparecimento da banda característica do DNA aos 280 nm, e também um desvio batocrômico da banda característica do composto aos 260 nm. É também possível verificar que com o aumento da concentração de DNA existe o desaparecimento da banda característica do composto **2** aos 320 nm. Desta forma é possível afirmar que o composto **2** tem capacidade de interação com o DNA, podendo esta interação estar relacionada com o mecanismo de morte celular que induz nas células.

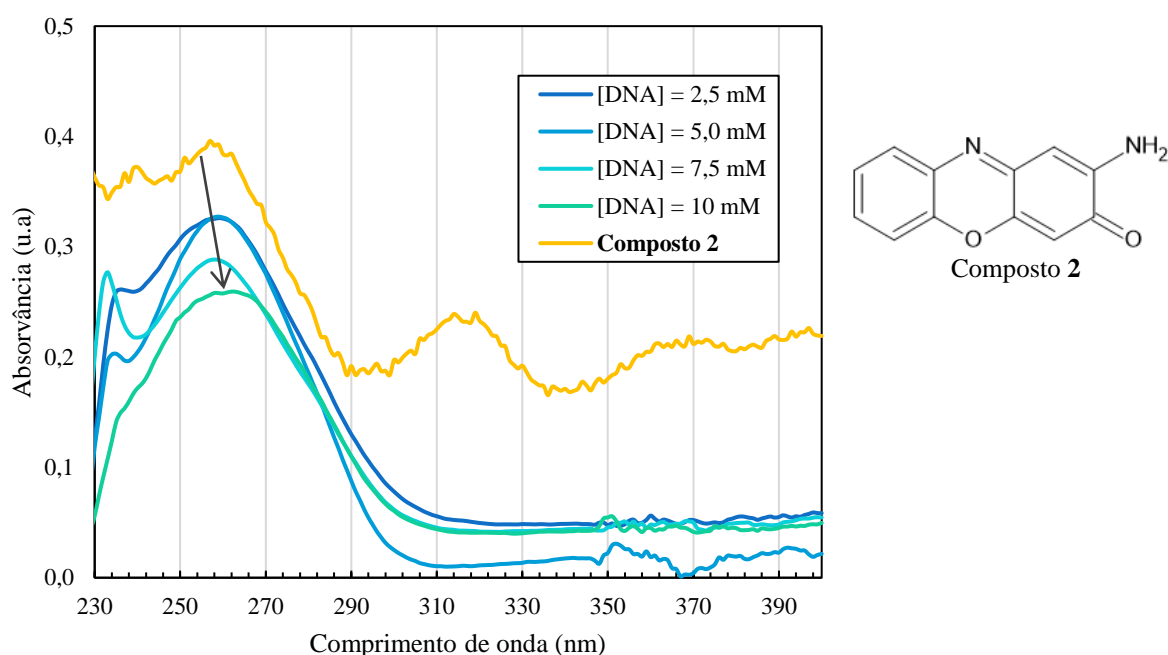


Figura 31 - Espectro de absorção do Composto **2** e DNA em H₂O e 1% DMSO para várias concentrações de DNA.

Realizando a mesma análise para o composto **1.a**, com resultados apresentados na **Figura 32**, é possível verificar, à semelhança do que foi possível verificar para o composto **1** e **2**, um desaparecimento gradual da banda característica do composto aos 230 nm, um desvio batocrômico da banda característica do composto. Desta forma é possível afirmar que o composto **1.a** tem capacidade de interação com o DNA, podendo esta interação estar relacionada com o mecanismo de morte celular que induz nas células. Desta forma é também possível reforçar a hipótese deste composto apresentar um potencial citotóxico apesar de apresentar uma baixa permeabilidade pelas células, facto evidenciado pelo seu valor de log P.

Ao analisar os resultados é possível verificar que no geral existe uma diminuição da intensidade da absorção dos espectros das fenazinas com o aumento da concentração de DNA, ocorrendo também para todos os compostos testados o desaparecimento da banda característica do DNA e um desvio batocrômico do pico de absorvância das bandas características dos compostos. Este desvio batocrômico é reportado em compostos com uma estrutura central

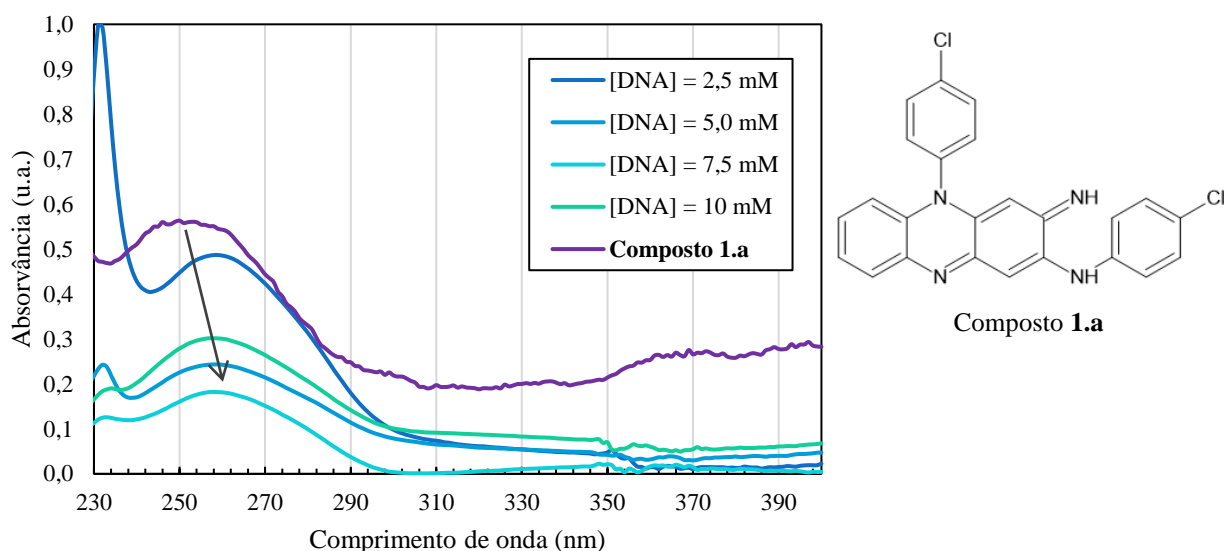


Figura 32 - Espectro de absorção do Composto **1.a** e DNA em H₂O e 1% DMSO para várias concentrações de DNA.

triangular, como acontece para a família das acrinidas [112] e complexos de Níquel com ligandos de Brometo de Etídeo [113]. No caso da doxorrubicina verifica-se num estudo reportado na literatura que ocorre uma diminuição da intensidade dos seus picos de absorvância com o aumento da concentração de DNA o que indica que este comportamento é representativo de interações com o DNA, comportamento este verificado também para os compostos **1**, **2** e **1.a**.

Assim, é possível inferir que as fenazinas interagem com o DNA, apresentando um potencial intercalador. Ao analisar os seus valores de log P é possível inferir também que as fenazinas e em particular o composto **1** e **2** são permeáveis através da membrana celular, tendo estes compostos a capacidade de interação com DNA em simultâneo sendo este um dos mecanismos prováveis da citotoxicidade das fenazinas **1** e **2**, à semelhança da doxorrubicina, que apresenta também capacidade de interação com DNA e permeabilidade pela membrana celular, tendo esta um log P de 1,27 [114].

4.1.5. Citometria de fluxo – Mecanismo de morte celular

De modo a tentar justificar o mecanismo de ação sobre as células Hep G2 do composto que revelou ter maior citotoxicidade, composto **1**, foi feita uma análise das células por citometria de fluxo de acordo com o protocolo presente no **Capítulo 4.1.6**. -Foram usados dois marcadores moleculares, a anexina V (A5) e o iodeto de propídeo (PI), que são frequentemente usados para estudos dos mecanismos de morte celular [115] em contacto com as células Hep G2 que foram expostas ao composto **1** em comparação com células Hep G2 não expostas, designadas por controlo.

A anexina V tem a capacidade de marcar a fosfatidiserina (PS), um dos fosfolípidos da membrana celular. Este fosfolípido está no folheto interno da membrana, **Figura 33a**, contactando apenas com o meio intracelular e não com o meio extracelular. Em situações de morte celular por apoptose, em que ocorre uma inversão do posicionamento da PS na membrana celular ou o rebentamento da membrana celular, passando assim a PS para o folheto externo, contactando com o meio extracelular, **Figura 33b**, sendo possível detetá-la por ensaios moleculares usando a Anexina V [115].

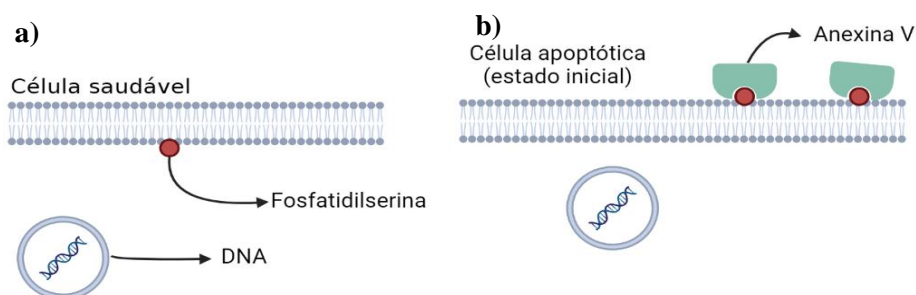


Figura 33 - Comparação entre a localização da fosfatidiserina (PS) em células saudáveis e em células em estado inicial de apoptose. **a)** Célula saudável, **b)** Célula em apoptose no estado inicial.

O iodeto de propídeo (PI) tem a capacidade de intercalar o DNA marcá-lo, uma propriedade que pode ser usada para detetar a acessibilidade do DNA celular, em situações de apoptose em estado avançado ou fase tardia, **Figura 34**, uma vez que nesta fase a membrana celular está fragilizada e permite a entrada de marcadores moleculares que não eram permeáveis pela membrana celular, como é o caso do iodeto de propídeo.

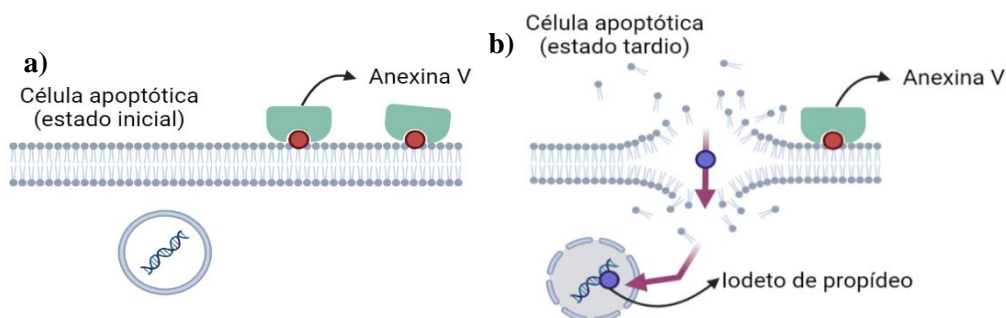





Figura 34 - Comparação da acessibilidade do DNA em células apoptóticas em estado inicial e em células em estado tardio de apoptose. **a)** Célula apoptóticas em estado inicial, **b)** Célula em apoptose no estado tardio.

A utilização do PI em conjunto com a anexina V para marcação possibilita a visualização por citometria de fluxo, usando os canais de deteção de Ficoeritrina Cianina 5.5 (PC5.5) e de Isotiocianato de fluoresceína (FITC), respetivamente, de populações distintas de células consoante o seu estado metabólico. Desta forma é possível construir uma tabela com os resultados expectados para o uso destes marcadores, **Tabela 12**

Tabela 12 - Resultados da marcação e canais de deteção para diferentes estados celulares.

	 Célula saudável	 Célula apoptótica (estado inicial)	 Célula apoptótica (estado tardio)
Anexina V (Canal FITC)	-	+	+
Iodeto de propídeo (Canal PC5.5)	-	-	+

Para estudar o estado das células Hep G2 controlo em comparação com células em contacto com o composto **1** de maior citotoxicidade foram então usados o iodeto de propídeo e a anexina V como marcadores em citometria de fluxo.

Inicialmente realizou-se uma aquisição geral das células Hep G2 controlo não marcadas após o seu crescimento em microplacas de 12 poços por 48h e de modo a calibrar o método e verificar o estado inicial destas células para ser possível comparar o seu estado com o os ensaios com aplicação de marcadores e composto **1**. Realizou-se uma aquisição contínua das células, sendo possível a identificação de três populações distintas, por análise sem marcadores, nos canais SSC-A e FSC-A (que permitem determinar o diâmetro celular e esfericidade das células, respetivamente), como demonstrado na **Figura 35**. A população a verde de menor dimensão foi identificada como “**restos celulares**” devido ao seu pequeno tamanho. É possível verificar também uma população de pequenas dimensões que apresenta uma maior tendência para valores mais elevados no canal FSC-A. Esta zona é característica para células individualizadas (não

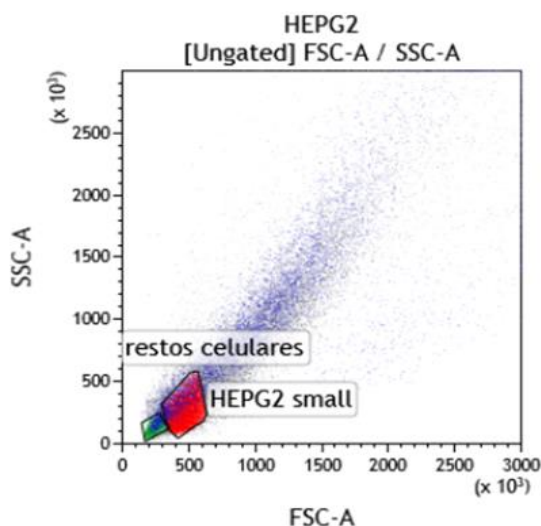


Figura 35 - Identificação das células Hep G2 usadas nos detetores SSC-A e FSC-A sem marcação.

aglomeradas), esféricas e de pequenas dimensões, atribuindo-se a esta população o título de “HEPG2 small”. À população marcada a azul atribui-se o título de “K” correspondendo a células de maior dimensão e potenciais aglomerados celulares”.

Utilizou-se uma amostra de células controlo (**Figura 36**), para estudar o estado das células realizou-se a marcação com PI, com recurso ao detetor de PC5.5 e A5, no detetor FTIC-A. Foi possível verificar uma população de grande dimensão positiva para A5 (Aglomerado K marcados a azul-escuro), significando que se está na presença de células em início de estado apoptótico. Este resultado positivo para A5 pode dever-se a alguma autofluorescência das células Hep G2, não significando que as células estejam no estado inicial de apoptose [116] [117] e também ao método de cultivo e transferência das células para as microplacas de crescimento, um processo que tem recurso à tripsina, uma enzima que pode fragilizar a membrana celular. É também possível verificar uma pequena população a vermelho na zona característica de PI positivo, marcada a vermelho, sendo também detetada na zona de PI negativo. Esta população marcada a vermelho aparenta ser característica de células pequenas, estando ligeiramente sobreposta com a população Aglomerado K, podendo existir alguns eventos detetados como células pequenas, mas que aparentam ser restos celulares resultantes de algumas células mortas após a transferência das células ao longo do processo. Sendo restos celulares, como DNA e RNA, estes podem ser marcados pelo PI, aparecendo detetadas na zona de PI positivo.

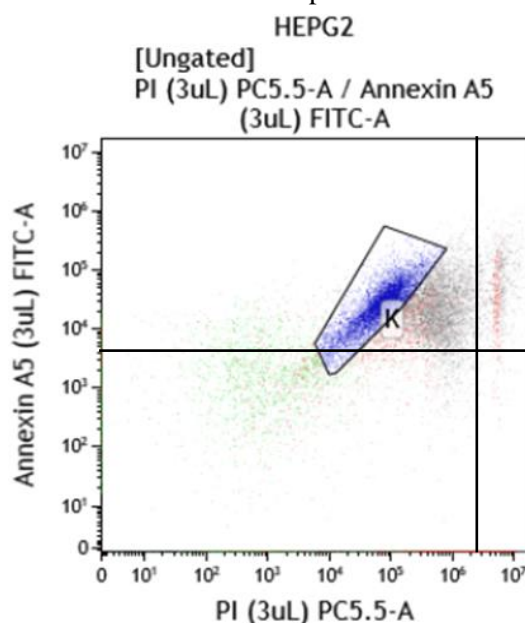


Figura 36 - Identificação das células HepG2 para marcação com A5 no canal FITC-A e PI no canal PC5.5-A.

A análise das células Hep G2 expostas ao composto **1** na sua concentração de IC_{50} está apresentada na **Figura 37**. Pela análise dos resultados foi possível verificar que existe uma população A5 negativa, sendo a restante população, a vermelho e cinzento, A5 positivas, e também PI positivas. A população I, marcada a verde, corresponde a células viáveis, sendo negativas tanto para A5 e PI. As restantes populações representadas a vermelho e cinzento são

positivas para A5 e PI, evidenciando morte celular. Ao comparar estas populações com resultados obtidos para uma medição sem marcação, é possível verificar que as células representadas a verde e viáveis correspondem a células de pequenas dimensões, enquanto as células marcadas a vermelho e cinzento, não viáveis, correspondem a células de maior dimensão e também a grandes aglomerados celulares, bem como a restos celulares.

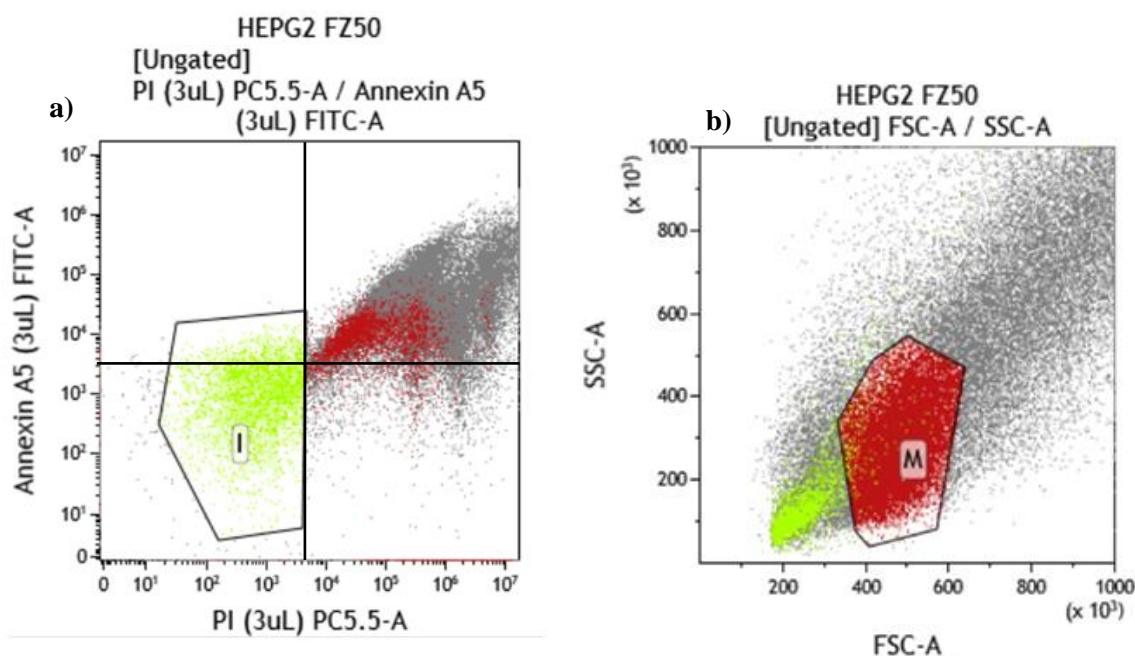


Figura 37 - Identificação das células Hep G2 após contacto com o composto **1** durante 24h, **a)** marcação com A5 no canal FITC-A e PI no canal PC5.5-A, e **b)** sem marcação com deteção no canal FSC-A e SSC-A.

Por fim apresentam-se os gráficos que representam a frequência de deteção de eventos marcados com ambos os marcadores, representando CTR- as células sem contacto com o composto **1**, CTR+ as células após choque térmico e HEPG2 as células em contacto com o composto **1** por 24h.

Pela análise da **Figura 38** é possível verificar que após a aplicação do composto **1** (**HEPG2 FZ50**), e comparativamente com o controlo positivo (CTR-), as células em estudo marcam PI e A5 com uma intensidade bastante elevada, apresentando-se assim em estado apoptótico tardio. Desta forma é possível concluir que o composto **1** induz a morte das células HepG2 por apoptose.

Apesar disso estes são resultados preliminares uma vez que foi possível verificar que a análise das células por deteção diferencial nos canais SSC e FSC não foi nitidamente eficaz em identificar as populações correspondentes a cada marcação dado a existência de populações de células muito heterogéneas e que sem marcação tinha autofluorescência, necessitando de ser desenvolvido com mais tempo de um novo método para a coleta das células para análise.

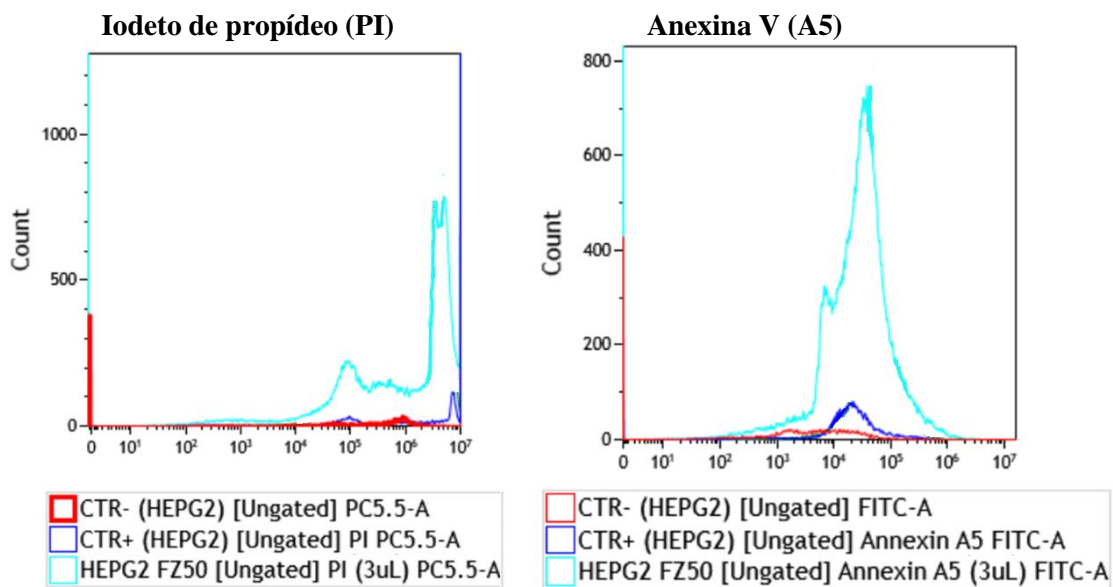
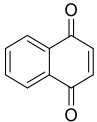
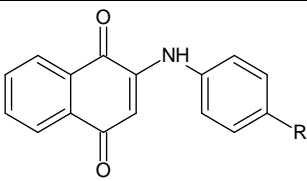
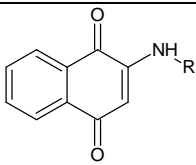
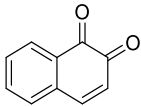
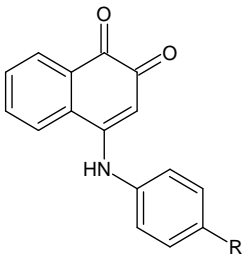


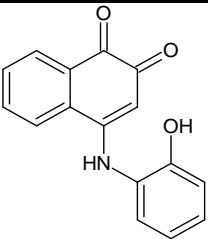
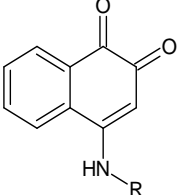
Figura 38 - Contagem de células Hep G2 marcadas com PI e A5 no ensaio CTR-, CTR+ e em contacto com o composto **1**.

2.2. Naftoquinonas

De forma a avaliar a potencialidade das estruturas de naftoquinonas no que se refere à sua capacidade para inibir a acetilcolinesterase e potencial citotóxico contra células Hep G2 de carcinoma humano foram estudadas as naftoquinonas derivadas da 1,4-naftoquinona (**3-3.1**) e da 1,2-naftoquinona (**4-4.1**), obtidas por diferentes métodos de síntese no grupo de investigação, cujas estruturas se apresentam na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Naftoquinonas estudadas.

Composto	Ref.	Substituintes
	3	
	3.a-3.d	.a – OH .b – NH ₂ .c – OCH ₃ .d – CN
	3.k-3.l	.k – 2(CH ₃ CH ₃) .l – CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
	4	-
	4.a-4.i	.a – OH .b – NH ₂ .c – OCH ₃ .d – CN .e – NO ₂ .f – N(CH ₃) ₂ .g – N-Phe .h – COOH .i – NCOOH

Composto	Ref.	
	4.j	-
	4.k-4.l	.k – 2(CH ₃ CH ₃) .l – CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃

2.2.1 Atividade inibitória da AChE

A atividade inibitória da AChE foi estudada para a família das naftoquinonas apresentadas na **Tabela 14**, seguindo o procedimento experimental descrito no **Capítulo 4.1.2** dos procedimentos experimentais. O estudo teve início com a avaliação das estruturas **3** e **4**, de modo a entender a capacidade inibitória das estruturas nucleares (**Tabela 14**) e posteriormente os respectivos derivados. Para a família das naftoquinonas foram estudadas as concentrações de alguns compostos apenas até 50 µM uma vez que a partir de valores superiores a este, alguns dos compostos em estudo deixavam de ser solúveis no meio aquoso usado no estudo.

Tabela 14 - Percentagem de inibição da AChE pela 1,4- e 1,2-NQ, determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).

Composto	Inibição±s (50 µM) (%)
3	51±2
4	35±5

Ao analisar os resultados, é possível verificar que o composto **3** apresenta uma maior capacidade inibitória do que o composto **4**, ou seja, a 1,4-naftoquinona tem um maior potencial inibitório do que a 1,2-naftoquinona.

Tendo em conta os resultados obtidos, foram estudados vários derivados do composto **3** de modo a estudar o efeito da adição de substituintes à estrutura principal na posição 2. Foram inicialmente estudados os compostos **3.a-3.d**, que têm como substituintes aminas aromáticas, seguindo um protocolo idêntico aos anteriores.

Na **Tabela 15** apresentam-se os resultados de inibição da família das 1,4-naftoquinonas com substituintes aromáticos.

Tabela 15 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,4-naftoquinonas à concentração de 50 μ M, determinadas pelo método de Ellman's e respetivos desvios padrão (s).

Composto	Inibição \pm s (50 μ M) (%)
3	51 \pm 2
3.a	16 \pm 2
3.b	23 \pm 3
3.c	26 \pm 3
3.d	26 \pm 3

Ao analisar os resultados é possível verificar que a adição das aminas aromáticas como substituintes na posição 2 da 1,4-naftoquinona não resultou num aumento de capacidade inibitória da AChE. Ao contrário do esperado, o composto **3.a** não causou um aumento da capacidade inibitória da AChE ainda que estivesse substituído com um grupo doador. Os compostos **3.b**, **3.c** e **3.d** apresentaram o mesmo potencial inibitório ainda que o composto **3.d** tivesse na sua estrutura um substituinte atrator de eletrões. Devido a este comportamento, é esperado que os modos de ligação dos derivados da 1,4-naftoquinona sejam distintos dos compostos da família das fenazinas.

Para estudar o potencial inibitório a concentrações mais elevadas foi repetido o mesmo procedimento. Ao estudar os compostos **3.c** e **3.d**, verifica-se que estes não são solúveis no meio aquoso de estudo, contendo apenas 1% de DMSO.

Para obter mais dados de modo a estabelecer uma relação entre o tipo de substituinte e o potencial de inibição, foram estudados mais dois compostos nesta família. Neste novo estudo foram analisados os compostos com aminas alifáticas na posição 2, correspondendo ao composto **3.k-3.l**, usando o mesmo protocolo experimental referido anteriormente. Na **Tabela 16** apresentam-se os resultados dos ensaios para estes compostos.

Tabela 16 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,4-naftoquinonas à concentração de 50 μ M, determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).

Composto	Inibição \pm s (50 μ M) (%)
3	51 \pm 2
3.k	48 \pm 5
3.l	48 \pm 2

Ao analisar os resultados, é possível verificar que este tipo de substituintes também não aumentou a capacidade inibitória face à estrutura principal da 1,4-naftoquinona. Verifica-se

também que a ramificação dos substituintes não influenciou o seu potencial inibitório, sendo que o composto **3.k**, substituído com dietilamina, uma amina ramificada, não apresentou uma percentagem de inibição diferente face à butilamina, uma amina linear, correspondente ao composto **3.l**. Ao não se verificar uma diferença na inibição destes compostos, é possível inferir que as interações entre os compostos **3.k** e **3.l** e a AChE, não ocorrem pelos grupos substituintes, mas sim por outra estrutura, possivelmente os anéis aromáticos. Assim, é possível concluir que dependendo da natureza do substituinte, as 1,4-naftoquinonas podem interagir com a AChE por diferentes locais, levando a possíveis diferentes mecanismos de inibição.

Na **Figura 39** apresentam-se os resultados obtidos para a inibição dos compostos **3.a-3.l** de forma gráfica.

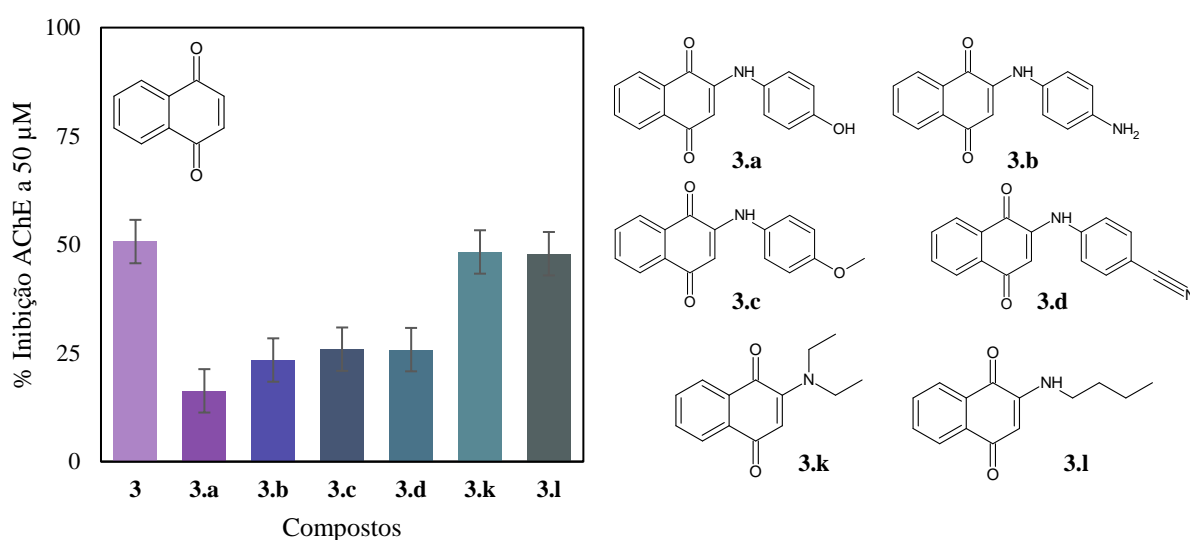


Figura 39 - Comparação da percentagem de inibição dos derivados da 1,4-naftoquinonas e respectivas estruturas.

Após o estudos da família das 1,4-naftoquinonas, efetuou-se o mesmo estudo para a família das 1,2-naftoquinonas, os compostos **4.a-4.l**. Foram inicialmente testados os compostos com os mesmos substituintes aminados que foram testados para a família das 1,4-naftoquinonas, sendo testados os compostos **4.a-4.d** homólogos da família dos compostos **3**. As condições de teste foram idênticas, tendo sido os quatro compostos testados a uma concentração de 50 µM de modo a efetuar uma comparação com os compostos da família **3**.

Na **Tabela 17** apresentam-se os resultados dos ensaios de inibição da AChE para os compostos **4.a-4.d**.

Tabela 17 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,2-naftoquinonas à concentração de 50 μM , determinadas pelo método de Ellman's e respectivo desvio padrão (s).

Composto	Inibição \pm s (50 μM) (%)
4	35 \pm 5
4.a	74 \pm 2
4.b	52 \pm 2
4.c	46 \pm 3
4.d	42 \pm 2

Ao analisar os resultados da **Tabela 17** é possível verificar de imediato que neste caso, a adição de substituintes ao composto **4** levou a um aumento do potencial inibitório deste composto, havendo uma subida desta propriedade em quase 40 pontos percentuais. Para o caso do composto **4.a**. Este resultado é o oposto relativamente ao obtido para a família das 1,4-naftoquinonas, revelando que as duas famílias de compostos reagem de forma diferente à adição de substituintes. Assim, é possível prever que o modo de interação dos compostos **4.a-4.d** é diferente dos seus homólogos **3.a-3.d**, podendo concluir que a diferença de posição das ligações C=O na estrutura principal **4** e as interações resultantes da adição dos substituintes **.a-d** levam a interações mais favoráveis com a AChE. Para além destas observações, é também possível inferir que a eletronegatividade dos substituintes influenciou o potencial inibitório. Os compostos **4.a** e **4.b** foram substituídos com aminas aromáticas que tem presentes na sua estrutura grupos doadores de elétrões, sendo que a sua adição ao composto **4** leva a uma deslocalização dos elétrões para os anéis aromáticos. Esta deslocalização aumenta a densidade eletrónica nos anéis, tornando-os mais prováveis de interagir com centros compatíveis, como é o caso dos centros CAS e PAS da AChE. Este fenómeno de deslocalização que ocorre nos compostos **4.a** e **4.b** pode estar na origem do seu potencial de inibição mais elevado, surgindo a hipótese de que os compostos da família das 1,2-naftoquinonas interagem por via de interações hidrofóbicas. A hipótese torna-se mais viável analisando os resultados dos compostos **4.c** e **4.d**, compostos estes que têm na sua constituição aminas aromáticas substituídas com grupos aceitadores de elétrões, substituintes estes que diminuem a densidade eletrónica nos anéis da estrutura principal. Assim verifica-se que as 1,2-naftoquinonas substituídas com aminas aromáticas doadoras, aumentam a capacidade de inibição, enquanto que a substituição com aminas aromáticas aceitadores diminuir a capacidade de inibição da AChE.

Tendo em conta os resultados obtidos, foram testados três novos compostos, **4.e**, **4.g** e **4.j**. Os compostos **4.e** e **4.g** foram testados com o objetivo de verificar o efeito da eletronegatividade dos substituintes, sendo o substituinte **.e** um substituinte aceitador, e o **.g** doador. O composto **4.j** foi estudado de modo a verificar se a mudança de posição do grupo substituinte altera os resultados

por introduzir variações na distribuição da densidade eletrónica. Este composto, **4.j**, é um isómero do composto **4.a**, aquele que apresentou o maior potencial de inibição. Na **Tabela 18** apresentam-se os resultados para o estudo dos compostos **4.e**, **4.g** e **4.j**.

Tabela 18 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,2-naftoquinonas à concentração de 50 μM , determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).

Composto	Inibição \pm s (50 μM) (%)
4	35 \pm 5
4.e	80 \pm 2
4.g	75 \pm 3
4.j	85 \pm 4

Ao analisar os resultados dos compostos **4.e** e **4.g** é possível verificar que apresentam uma capacidade de inibição semelhante tendo em conta o desvio da amostra. Desta forma verifica-se que a adição do grupo doador ou aceitador aumentou a capacidade de inibição face à estrutura inicial, mas não se verificou uma capacidade de inibição superior por parte do composto **4.g**, doador, face ao aceitador, **4.e**. Assim, estes substituintes podem ter modos de interações diferentes dos testados anterior, possibilidade que pode ser estudada por docking molecular.

Para comparar o potencial inibitório das famílias da 1,2-naftoquinona e da 1,4-naftoquinona foram testados para o composto **4** os substituintes **.k** e **.l**.

Na **Tabela 19** apresentam-se os resultados dos ensaios de inibição para os compostos **4.k** e **4.l**.

Tabela 19 - Percentagem de inibição da AChE pela família das 1,2-naftoquinonas à concentração de 50 μM , determinadas pelo método de Ellman's e respetivo desvio padrão (s).

Composto	Inibição \pm s (50 μM) (%)
4	35 \pm 5
4.k	62 \pm 5
4.l	55 \pm 2

Ao analisar os resultados do estudo dos compostos **4.k** e **4.l**, é possível verificar que a substituição com as aminas alifáticas aumenta o potencial de inibição em comparação com o composto **4**. Comparando os dois compostos, é possível verificar que a amina linear **4.k** leva a uma maior inibição do que a amina ramificada **4.l**, facto que pode ser explicado por impedimento estérico causado pela ramificação.

Na **Figura 40** apresentam-se os resultados compilados para todos os compostos da família **4** obtidos.

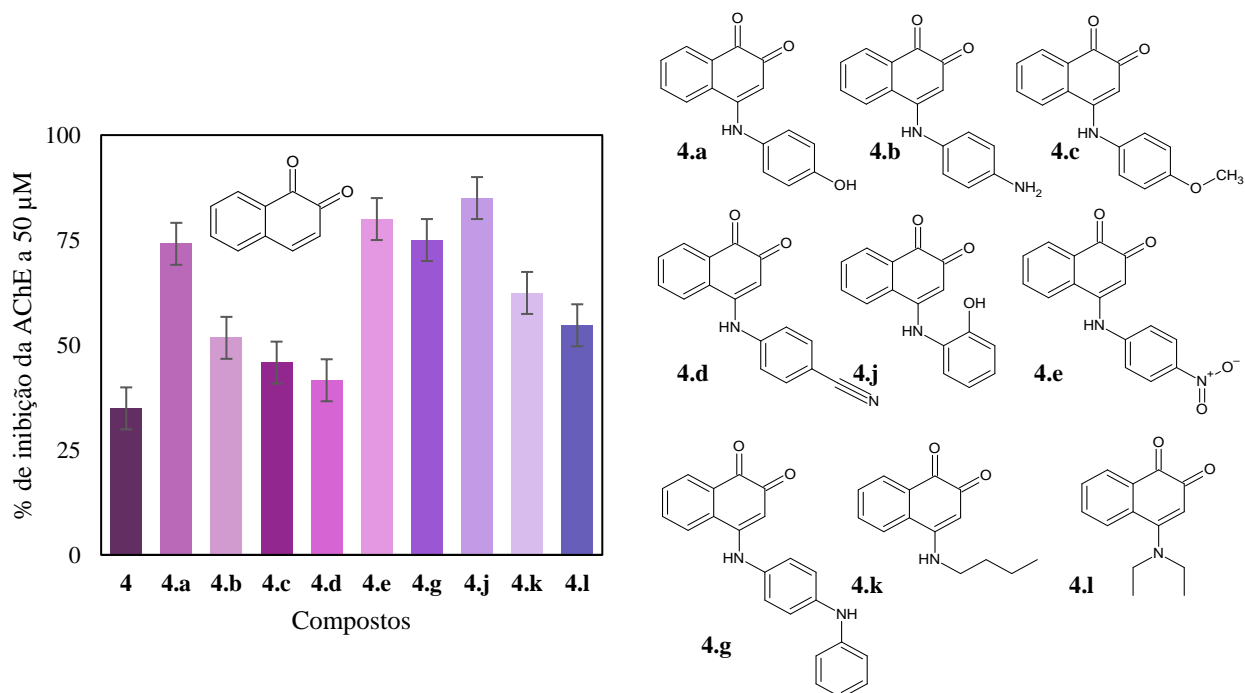


Figura 40 - Comparação da percentagem de inibição dos derivados da 1,2-naftoquinonas e respetivas estruturas.

Para comparar e entender as interações entre os compostos das famílias **3** e **4** realizou-se, à semelhança do que se realizou para as famílias **1** e **2**, docking molecular. Inicialmente comparou-se os modos de interação previstos para os compostos **3.a** e **3.b** com os compostos **4.a** e **4.b** de modo a entender o impacto da posição da substituição no anel das naftoquinonas. Nas **Figuras 41-42** são apresentados os resultados obtidos para o docking molecular dos compostos **3.a**, **3.b**, **4.a** e **4.b**.

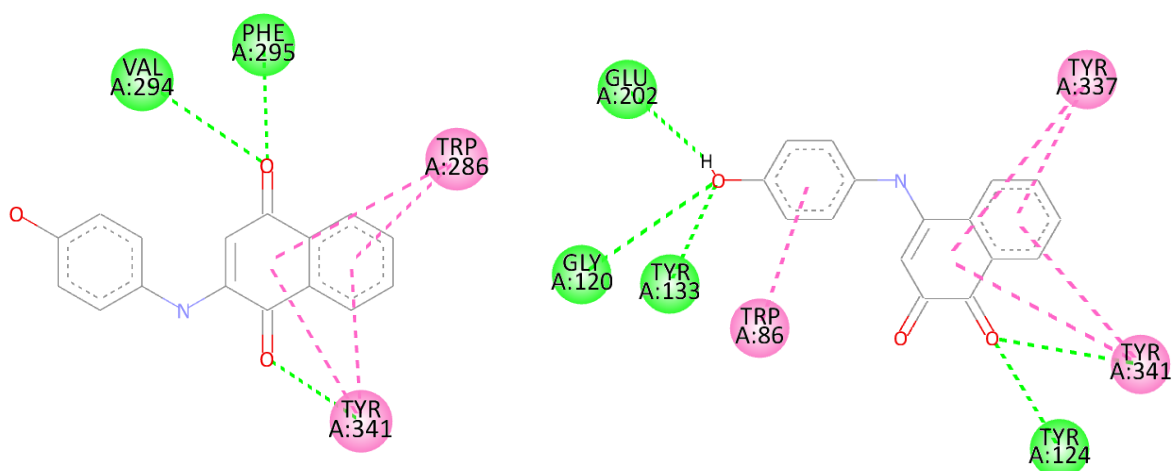


Figura 41 - Comparação das interações dos compostos **3.a** e **4.a** com a cavidade catalítica da AChE, previstos por Chimera e visualizados no software BioVia.

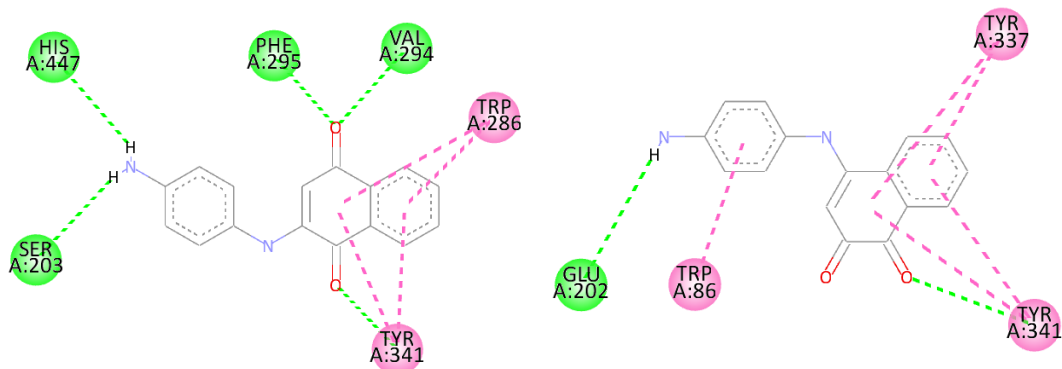


Figura 42 - Comparação das interações dos compostos **3.b** e **4.b** com a cavidade catalítica da AChE, previstos por Chimera e visualizados por BioVia.

Analisando os resultados obtidos pelo docking molecular, é possível verificar mais uma vez que tanto nos compostos da família das 1,2-NQ e 1,4-NQ, os sistemas aromáticos são os mais importantes para interações com os resíduos aminoacídicos da cavidade catalítica da AChE. Ao comparar as interações dos compostos **3.a** e **4.a**, verifica-se que o composto **3.a** interage com os resíduos TYR341 e TRP286 via interações π - π com os anéis aromáticos da NQ, sendo estes resíduos parte do centro PAS. Em comparação com o composto **4.a**, este realiza também interações com resíduos do centro PAS, TYR341, GLY120, mas também com resíduos do centro CAS, como os TRP86, TYR337 e TYR133, na sua maioria por interações π - π . Ao realizar a mesma análise para os compostos **3.b** e **4.b**, verifica-se da mesma forma que o composto **3.b**, da família das 1,4-NQ interage apenas com o centro PAS nos resíduos TRP286 e TYR341, enquanto que o composto **4.b**, da família das 1,2-NQ, interage com resíduos do centro PAS e CAS, TYR341 e TYR 337+TRP86, respetivamente. Desta forma é possível concluir que nas naftoquinonas, uma interação em simultânea com os centros CAS e PAS leva a uma maior capacidade inibitória face a apenas interação com um dos centros. Esta interação adicional pode provocar uma interação mais forte e assim um maior tempo de permanência do composto na cavidade catalítica, bloqueando a entrada do substrato da AChE e o seu consequente funcionamento normal.

Para entender o efeito da densidade eletrónica nas interações, que ocorrem maioritariamente pelos anéis aromáticos das NQs, realizou-se o mesmo estudo de docking para os compostos **4.e-4.j** de modo a estudar as interações previstas destes compostos com maior densidade eletrónica. É expectável que se verifiquem interações semelhantes aos compostos **4.a** e **4.b** uma vez que estes compostos têm na sua constituição substituintes que aumentam a densidade eletrónica nos anéis. Os resultados do docking apresentam-se na **Figura 43**.

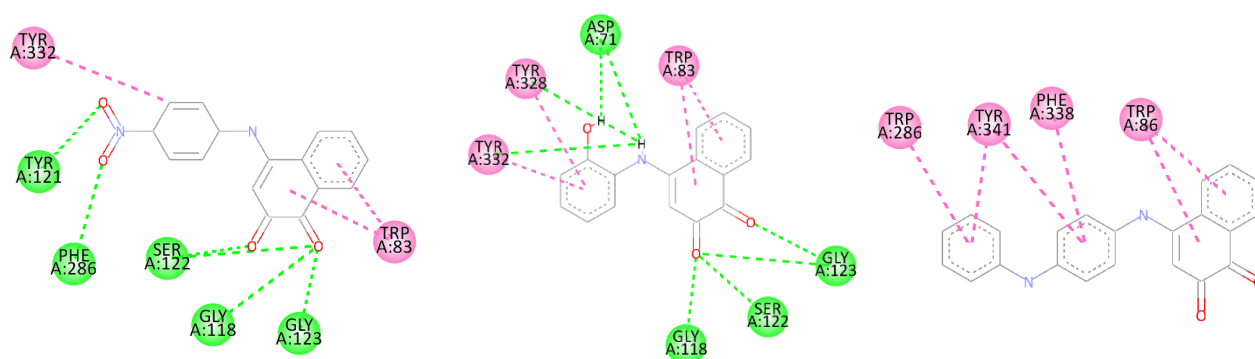


Figura 43 - Comparação das interações dos compostos **4.e**, **4.g** e **4.j** com a cavidade catalítica da AChE, previstos por Chimera e visualizados por BioVia.

Ao analisar os resultados é possível verificar que à semelhança dos compostos da família das 1,2-NQ, ocorrem interações com os centros PAS e CAS em simultâneo, confirmando que esta dupla interação com os centros de ligação aniônicos e aromáticos é o fator crucial para uma maior inibição da AChE, concluindo-se assim que no desenho de fármacos que tenham como alvo a inibição da AChE, é prioritário que se inibam em simultâneo os dois centros de ligação CAS e PAS.

Ao comparar o docking molecular dos compostos **4.a** e **4.j**, compostos estes que variam apenas na posição do substituinte OH no anel do ligando, verifica-se que não existem interações relevantes que justifiquem a maior capacidade inibitória aparente do composto **4.j** face ao composto **4.a**, levando mais uma vez à conclusão que o fator mais importante para uma inibição mais potente é a interação dos compostos com o centro CAS e PAS em simultâneo.

2.2.2 Atividade antioxidante

O potencial de atividade antioxidante dos compostos da família das naftoquinonas foi testado com recurso ao método colorimétrico do DPPH. Este método encontra-se descrito no **Capítulo 4.3**.

Para a família das naftoquinonas foram apenas testados os compostos, **4.k** e **4.l**, tendo-se obtido uma atividade antioxidante de $9\pm 1\%$ e $5\pm 2\%$, respetivamente.

Ao analisar os resultados é possível verificar que os compostos **4.k** e **4.l** não apresentam potencial antioxidante, ou seja, neste caso, não têm capacidade de eliminar o radical livre DPPH, reduzindo-o à sua forma DPPH-H. Estes resultados eram esperados devido à ausência de grupos OH nos compostos, sendo estes característicos de antioxidantes.

2.2.3. Citotoxicidade em linhas celulares Hep G2

A citotoxicidade foi testada para os compostos da família das naftoquinonas pelo método colorimétrico do MTT, procedimento descrito no **Capítulo 4.1.4**.

Inicialmente foram testadas as estruturas base das 1,4-NQ e 1,2-NQ, os compostos **3** e **4** respetivamente. Os EC₅₀ obtidos e os parâmetros relacionados estão apresentados na **Tabela 20**, estando também representados de forma gráfica a **Figura 44**.

Tabela 20 - Valores de EC₅₀, limites máximos e mínimos, declive e ER para os compostos **3** e **4**.

Composto	EC ₅₀ ±s (µM)	Limite mínimo (µM)	Limite máximo (µM)	Declive	ER _{EC50} (%)
3	32±1	1,1	89,1	0,1	3,5
4	26±1	1,3	91,1	0,2	2,3

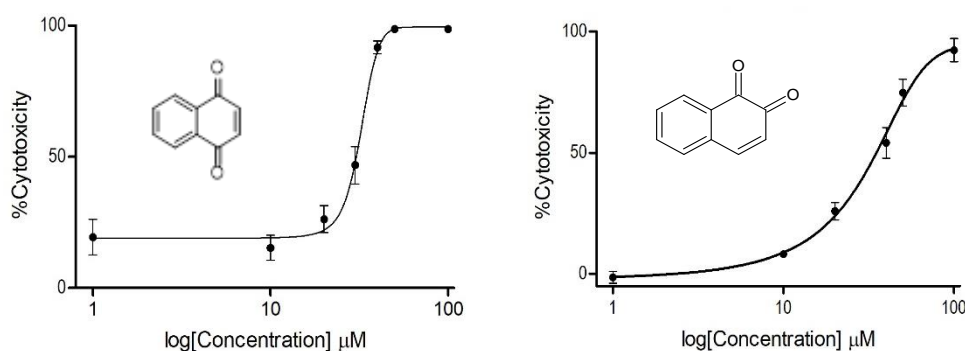


Figura 44 - Curvas dose-resposta para os compostos **3** e **4**.

Ao analisar os resultados obtidos, é possível verificar que o composto **4** apresenta um EC₅₀ inferior ao do composto **3**, conseqüentemente necessita de uma quantidade inferior de modo a causar a inviabilidade celular do que o composto **3**, tornando-o potencialmente mais eficaz.

De forma semelhante foram estudados os derivados de cada família, começando-se o estudo pela família das 1,4-naftoquinonas. Para esta família foram testados os compostos **3.a-3.l**. Na **Tabela 21** encontram-se compilados os resultados para os compostos em questão, estando as curvas dose-resposta nos **Anexos 9-14**.

Tabela 21 - Valores de EC₅₀, limites máximos e mínimos, declive e ER para os compostos da família **3**.

Composto	EC ₅₀ ±s (µM)	Limite mínimo (µM)	Limite máximo (µM)	Declive	ER _{EC50} (%)
3	32±1	1,1	89,1	0,1	3,5
3.a	21±4	1,0	29,8	0,5	2,1
3.b	9±1	1,0	11,2	0,1	4,5
3.c	13±2	1,2	34,1	0,1	3,3

Composto	EC ₅₀ ±s (μM)	Limite mínimo (μM)	Limite máximo (μM)	Declive	ER _{EC50} (%)
3.d	79±4	-	-	-	6,2
3.k	36±2	1,0	41,3	14,3	5,0
3.l	65±3	-	-	-	5,6

Ao analisar os resultados obtidos é possível observar a variação de citotoxicidade após a adição dos substituintes. Na generalidade, todos os compostos levaram à diminuição do EC₅₀, aumentando assim a possibilidade de serem usados como fármacos, com a exceção dos compostos **3.d**, **3.k** e **3.l**, que aumentaram o EC₅₀. Analisando os declives obtidos, é possível verificar que não ocorrem aumentos de citotoxicidade muito acentuados, mostrando uma resposta não abrupta. Os limites máximos testados foram definidos de acordo com a solubilidade e disponibilidade dos compostos. No caso dos compostos **3.d** e **3.l**, o valor de EC₅₀ foi extrapolado a partir da curva obtida até 50 μM, uma vez que a partir desta concentração a solubilidade do composto no meio não era possível. As concentrações testadas até 20 e 40 μM para os compostos **3.a** e **3.b** devem-se à inexistência de viabilidade celular a partir dessas concentrações.

Dos compostos testados, o que apresenta um EC₅₀ mais baixo é o composto **3.b**, sendo substituído com um grupo NH₂. Este grupo revelou-se então o que levava a um maior aumento de potencial citotóxico a partir da estrutura principal da 1,4-naftoquinona. Os grupos OH (**3.a**) e OCH₃ (**3.c**) apresentaram também um aumento significativo no potencial citotóxico, estando ainda abaixo dos valores obtidos para o composto **3.a**.

Na **Figura 45** apresentam-se os gráficos de dose-resposta obtidos para os compostos **3.a-3.l**, e também os EC₅₀ de forma gráfica de modo a facilitar a compreensão dos dados para a família.

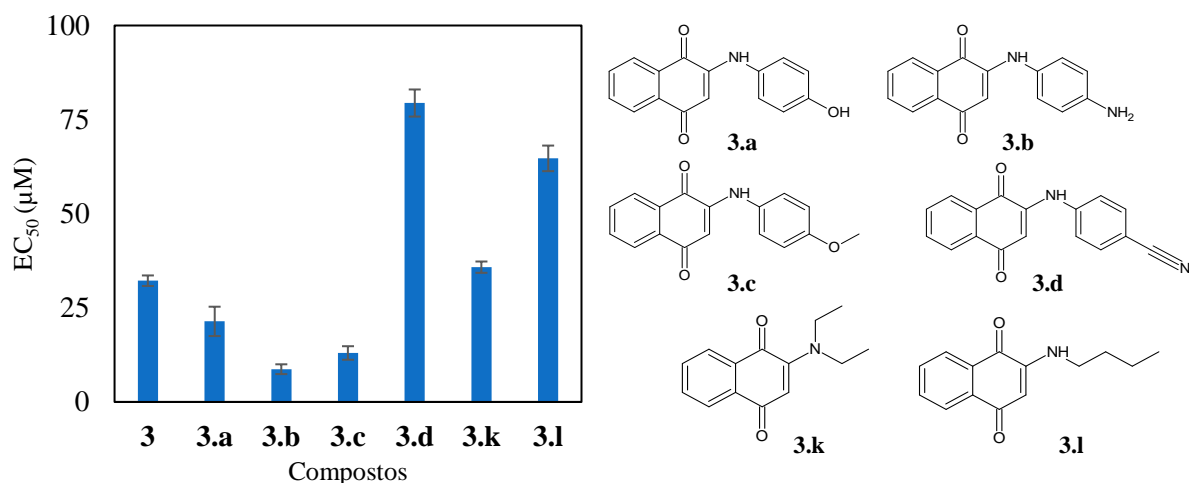
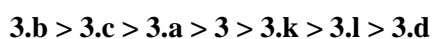


Figura 45 - Comparação do valor de EC₅₀ dos derivados da 1,4-naftoquinonas e respetivas estruturas.

Assim, é possível organizar os compostos da família por ordem de citotoxicidade, obtendo a seguinte ordem:



Após o estudo da família das 1,4-naftoquinonas, foi estudada a família das 1,2-naftoquinonas, o composto **4**. O estudo foi realizado de forma idêntica ao descrito para a família **3**. Na **Tabela 22** estão compilados os resultados obtidos para estes compostos.

Tabela 22 - Valores de EC₅₀, limites máximos e mínimos, declive e S para os compostos da família **4**.

Composto	EC ₅₀ ±s (µM)	Limite mínimo (µM)	Limite máximo (µM)	Declive	ER _{EC50} (%)
4	26±1	1,3	89,1	0,2	4,9
4.a	7±2	1	11,4	0,7	3,0
4.b	3±1	1	8,1	0,2	1,8
4.c	7±2	1	9,2	5,6	8,9
4.d	27±1	1	49,5	0,1	5,7
4.e	24±2	5	29,8	0,2	10,8
4.f	-	-	-	-	-
4.g	9±2	5	9,8	0,5	5,6
4.h	-	-	-	-	-
4.i	-	-	-	-	-
4.j	9±3	5	11,1	0,3	9,1
4.k	23±1	5	28,9	0,1	3,1
4.l	23±2	5	27,9	0,2	1,0

Ao analisar os resultados obtidos para a família das 1,2-naftoquinonas, é possível verificar que na generalidade todos os compostos levam a uma diminuição do EC₅₀, com exceção do composto **4.d**, que apresenta uma citotoxicidade semelhante ao composto **4** tendo em conta o erro que apresenta. De ponto de vista estatístico, os compostos **4.e**, **4.k** e **4.l** não têm alteração de citotoxicidade em relação ao composto **4** devido aos seus desvios em relativos. A citotoxicidade aumentou, relativamente ao composto **4**, nos compostos **4.a**, **4.b**, **4.c**, **4.g**, **4.j**, revelando-se estes derivados promissores como fármacos. Para o composto **4.f** não foi possível calcular o EC₅₀ uma vez que o composto perde solubilidade aos 50 µM, precipitando no meio. Neste caso não foi possível extrapolar o valor de EC₅₀ uma vez que a citotoxicidade estabilizou em cerca de 30% a partir dos 20 µM, como se pode verificar na **Figura 46**, onde está representada a curva obtida e o composto **4.f** precipitado nos poços da microplaca.

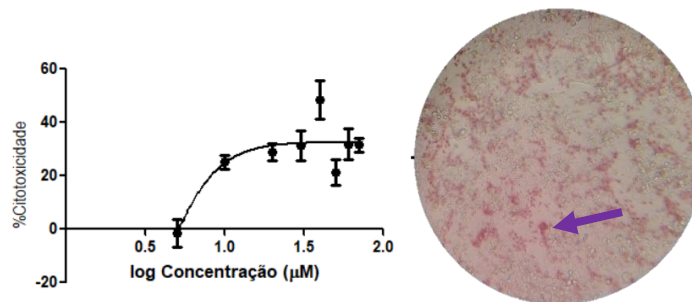


Figura 46 - Curva dose-resposta incompleta para o composto **4.f** após precipitação a partir de uma concentração a 20 μM .

Não foi também possível obter os EC_{50} dos compostos **4.i** e **4.h** devido à contaminação de todas as células, sendo necessário o descongelamento de novas células que poderiam não ser semelhantes às usadas até ao momento (**Anexo 6**). Ainda assim, estes compostos foram testados até uma concentração máxima de 90 μM , apresentado no máximo no máximo capacidade de inviabilizar 40% da população de células Hep G2, para o composto **4.i**, e 30% para o composto **4.h**, verificando-se que estes compostos tinham um reduzido potencial citotóxico em comparação com os restantes compostos testados. Estes compostos introduziam um novo grupo de substituintes nas 1,2-NQ, o grupo carbonilo, revelando por estes ensaios preliminares, que este grupo de substituintes não apresenta relevância no potencial citotóxico das naftoquinonas. Para os compostos **4.d** e **4.e**, com aminas aromáticas substituídas com grupos aceitadores de elétrons, não se verifica um aumento de citotoxicidade. O mesmo se verifica para os compostos **4.k** e **4.l**, substituídos com grupos alifáticos. Os compostos **4.h** e **4.i**, semelhantes estruturalmente, não têm também melhorias de citotoxicidade face à estrutura inicial do composto **4**. Todos estes compostos, e também os que evidenciaram melhorias, são muito heterogêneos entre si, não se verificando uma tendência para explicar as variações de citotoxicidade obtidas. Na **Figura 47** apresentam-se os EC_{50} de forma gráfica os EC_{50} dos compostos **4-4.l**.

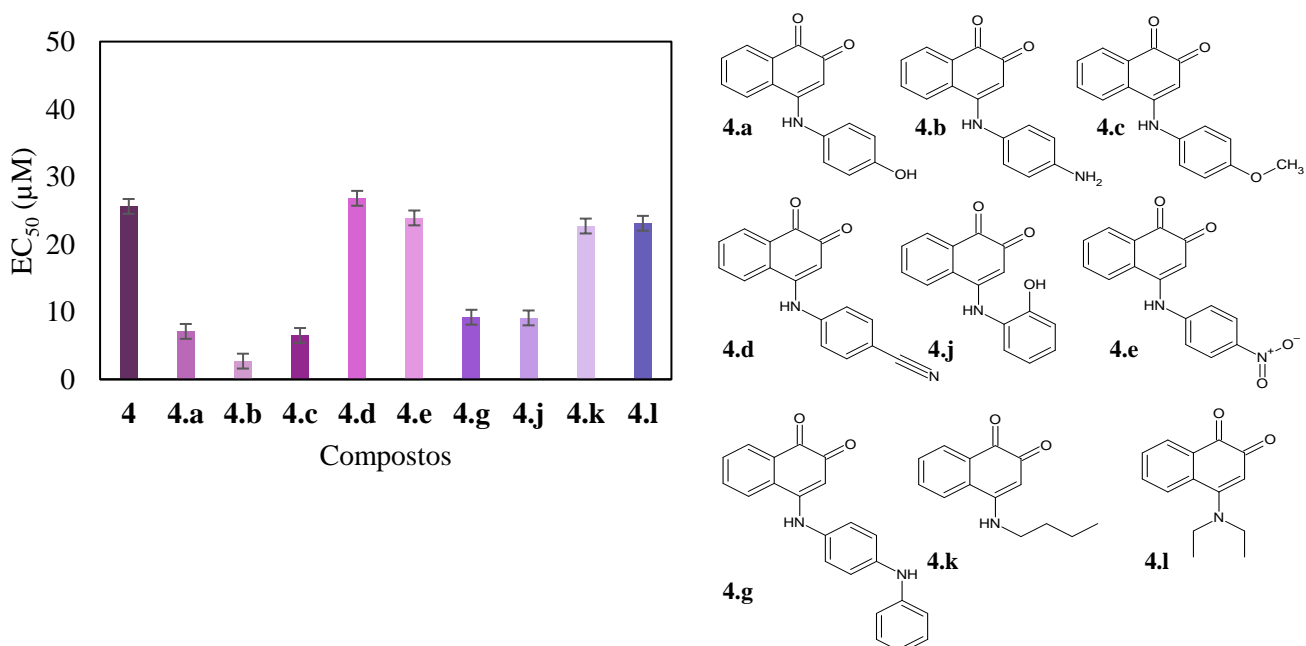


Figura 47 - Comparação do valor de EC_{50} dos derivados da 1,2-naftoquinonas e respetivas estruturas.

Nos **Anexos 15-23** apresentam-se as curvas dose-resposta dos compostos **4-4.1**.

Assim, é possível organizar os compostos da família por ordem de citotoxicidade, obtendo a seguinte ordem:

$$4.b > 4.c > 4.a > 4.j > 4.g > 4.k > 4.l > 4.e > 4 > 4.d$$

Ao analisar os resultados finais de citotoxicidade dos compostos da família das naftoquinonas é possível concluir que a maior citotoxicidade está associada a compostos com substituintes dadores eletrônicos, ou seja, substituintes que aumentem a densidade eletrônica no anel do substituinte. Destes compostos é possível salientar os compostos **3.b** e **4.b** com maior potencial citotóxico.

2.2.4. Citometria de fluxo – Mecanismo de morte celular

Do mesmo modo que foi executado para a família das fenazinas, foi usada citometria de fluxo de modo a estudar com maior detalhe e tentar evidenciar o mecanismo de morte celular induzido pelas naftoquinonas nas células Hep G2. Para tal foi realizado o mesmo estudo, nas mesmas condições, usando um protocolo idêntico e as mesmas células, provenientes da mesma cultura mãe. Deste modo, todos os resultados obtidos para o estudo inicial da população celular apresentados e discutidos no Capítulo **2.4.1**.

Para o estudo das naftoquinonas foi usado o composto **3.d**, o composto com menor EC_{50} , ou seja, o composto com maior potencial citotóxico. Os resultados destes ensaios estão apresentados nas **Figuras 48**. Ao analisar os resultados é possível verificar que não é observada uma população evidente de células marcadas como A5 e PI negativas, estando todas a grande maioria das células pelo menos no estado inicial de morte celular, ou seja, marcadas como A5 positivas, tendo assim a sua membrana celular fragilizada. É também possível verificar que existe uma população, representada a cinzento, marcada como PI e A5 positiva (quadrante superior direito). Ao cruzar estes dados com a aquisição sem a utilização de marcadores, onde apenas é estudado o tamanho celular, é possível concluir que esta população corresponde a agregados celulares e células de maior dimensão, agregados esses podem ter sido formados devido ao stress químico provocado pela tripsina na ação de desagregação para transferência das células.

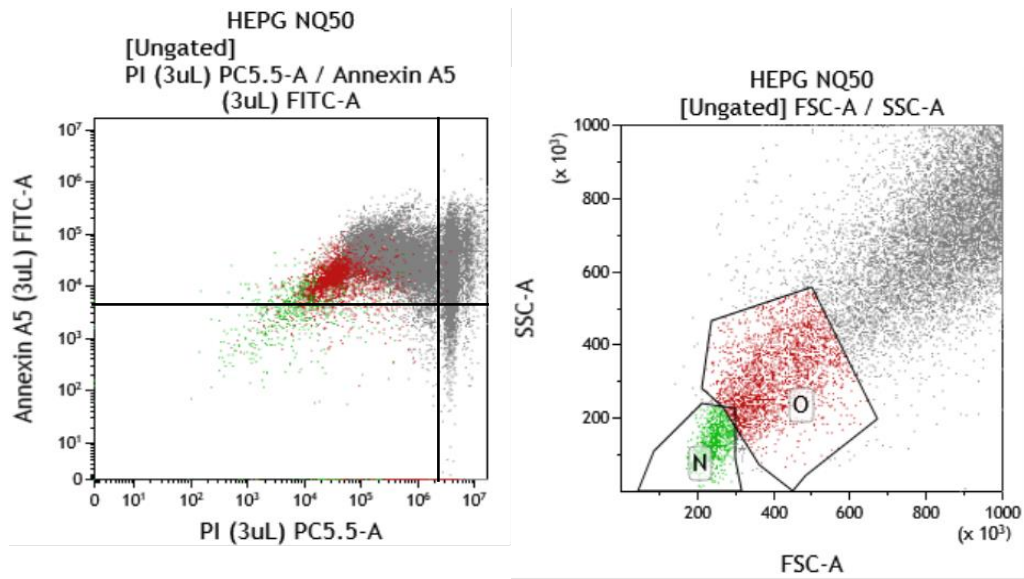


Figura 48 - Identificação das células HepG2 após contacto com o composto **3.d** durante 24h, **a)** marcação com A5 no canal FITC-A e PI no canal PC5.5-A, e **b)** sem marcação com deteção no canal FSC-A e SSC-A.

Por fim apresentam-se os gráficos representantes da frequência de deteção de eventos com ambos os marcadores. Em ambos é possível verificar uma grande frequência para marcação positiva tanto para A5 e PI, evidenciando em comparação com os controlos realizados, que a população de célula estudada, após o efeito do composto **3.d**, se apresenta na sua maioria em estado tardio de apoptose. Apesar destas observações, não é possível excluir, à semelhança do mencionado para o estudo das fenazinas, uma interferência causada pela autofluorescência das células HepG2.

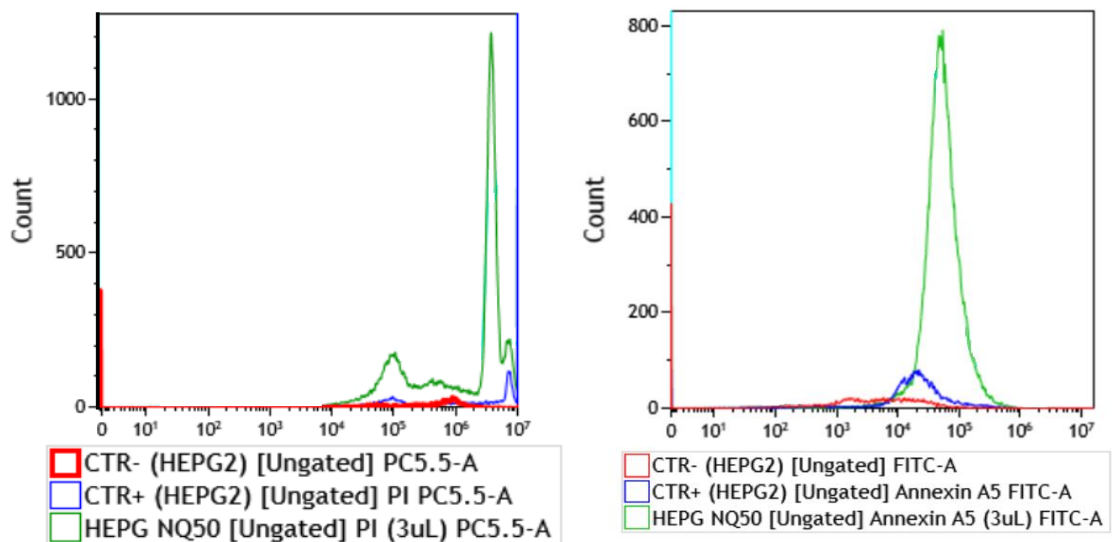


Figura 49 - Contagem de células HepG2 marcadas com PI e A5 no ensaio CTR-, CTR+ e em contacto com o composto **3.d**.

Capítulo 3 – Conclusões e perspetivas futuras

3. Discussão, Conclusões e perspectivas futuras

Com o trabalho experimental realizado na presente tese de mestrado, foi possível estudar a citotoxicidade de diferentes derivados de naftoquinonas, fenazinas e fenoxazinonas contra a linha celular do fígado Hep G2, e estabelecer relações entre a estrutura e o potencial citotóxico, bem como outras propriedades. Foi possível estudar a atividade inibitória da acetilcolinesterase, relacionando a atividade com a estrutura dos compostos em estudo e, prevendo os seus modos de interação com a cavidade catalítica da enzima, relacionando estes modos com a atividade obtida. Por fim, foi ainda possível estudar o mecanismo de morte celular induzido pela ação dos compostos testados, estudando-se também o efeito que o modo de cultura e recolha das células tinha na viabilidade celular e na expressão de determinados marcadores apoptóticos.

O estudo da atividade inibitória da AChE para a família das fenazinas e fenoxazinonas foi concluído com sucesso, tendo-se verificado que a adição de substituintes eletrofílicos ao esqueleto principal, conduziu a um aumento da atividade inibitória. A atividade inibitória dos compostos substituídos com estes grupos revelou-se mais elevada que os restantes compostos testados, obtendo-se IC_{50} s de 17 ± 6 , 96 ± 3 e 24 ± 3 μM , respetivamente para os compostos **1.b**, **1.c** e **2.b**. Os anéis da estrutura principal são responsáveis pela interação com os resíduos aminoacídicos da AChE nos locais de ligação CAS e PAS, centros estes constituídos por um canal de resíduos aminoacídicos aromáticos. Assim, é possível concluir que os compostos da família das fenazinas e fenoxazinonas interagem com estes centros de ligação e não com o centro ativo. Apesar dos IC_{50} s relativamente baixos, o fármaco mais usado no tratamento da doença de Alzheimer apresenta um IC_{50} de 6,7 nM, um valor mil vezes inferior ao destes compostos. Para detalhar o estudo destes compostos seria interessante realizar um estudo de cristalografia de modo a identificar o local exato de ligação dos compostos na enzima, complementando o estudo com a determinação do mecanismo enzimático. Seria também interessante testar novos substituintes eletrofílicos e com uma estrutura aromática, de modo a entender que mais locais de interação podem ser identificados, e qual o impacto dessas interações na atividade inibitória da AChE.

O estudo da atividade inibitória da AChE para a família das naftoquinonas foi também concluído com sucesso, tendo-se obtido contributos para o entendimento da relação entre a estrutura e a atividade inibitória destes compostos. A partir destes estudos foi possível concluir que os compostos derivados da 1,2-naftoquinona têm uma maior atividade inibitória do que os compostos derivados da 1,4-naftoquinona. Os derivados da 1,4-naftoquinona tinham um potencial de inibição baixo comparativamente com os derivados da 1,2-naftoquinona que, a concentrações iguais, provocavam uma inibição da AChE muito mais acentuada. Foi também possível concluir que substituintes doadores de eletrões causam uma maior inibição da AChE, obtendo-se para estes os valores mais elevados de inibição, sendo as suas percentagens de inibição a uma concentração de 50 μM , 74 ± 2 , 80 ± 2 , 75 ± 3 e $85\pm 4\%$, para os compostos **4.a**, **4.e**, **4.g** e **4.j** respetivamente. Estes valores encontram-se muito acima dos valores obtidos para os restantes compostos e também para

os compostos homólogos da família das 1,4-naftoquinonas. Ao complementar os estudos com estudos de docking molecular, é possível concluir que as naftoquinonas interagem maioritariamente com os centros de ligação CAS e PAS à semelhança das fenazinas e fenoxazinas. Nestes estudos foi possível verificar que os compostos com maior potencial inibitório tinham interações previstas com os centros CAS e PAS pelos anéis do esqueleto principal da naftoquinonas, enquanto os compostos com menor potencial inibitório apresentavam interações previstas pelos anéis dos substituintes aromáticos. Desta forma, é possível ligar o facto de substituintes doadores induzirem uma maior atividade inibitória, uma vez que ao doarem eletrões aumentam a densidade eletrónica no esqueleto aromático das naftoquinonas, levando a interações mais intensas com os resíduos aminoacídicos dos centros de ligação CAS e PAS. Para detalhar o estudo destes compostos seria interessante realizar um estudo de cristalografia de modo a identificar o local exato de ligação dos compostos na enzima, complementando o estudo com a determinação do mecanismo enzimático, à semelhança do que foi mencionado para a família das fenazinas e fenoxazinas.

O estudo da atividade antioxidante para ambas as famílias das fenazinas/fenoxazinas e naftoquinonas revelou que estas não tinham potencial de captura de radicais livres pelo método testado, resultado esperado tendo em conta as estruturas dos compostos.

Os estudos de toxicidade dos compostos considerados para a presente tese foram realizados por diversos métodos, de modo a destacar propriedades relevantes para os respetivos potenciais citotóxicos.

Os estudos de citotoxicidade para a família das fenazinas e fenoxazinas foram realizados pelo método do MTT e LDH, onde se verificou que, na generalidade, estes compostos não apresentavam uma citotoxicidade relevante, tendo-se verificado que o EC₅₀ mais baixo, do composto **1**, era de aproximadamente 30 µM, um valor elevado comparando com os fármacos utilizados para o mesmo fim atualmente. Ao estudar a hidrofobicidade destes compostos verificou-se que o seu teor lipofílico está diretamente relacionado com a sua baixa citotoxicidade, concluindo-se que estes compostos não são totalmente permeáveis pelas células Hep G2 usadas para os ensaios de citotoxicidade. Para esta família de compostos foi também estudada a interação com o DNA, devido às semelhanças estruturais com fármacos que têm a capacidade de intercalar o DNA. Por estes estudos foi possível concluir que as fenazinas têm uma capacidade de interação com o DNA, logo podem apresentar uma capacidade citotóxica se entrarem em contacto com este. Uma vez que os compostos apresentam pouca permeabilidade face às células Hep G2 e que apresentam um potencial de intercalação do DNA, os resultados de baixa citotoxicidade estão concordantes pois ao não serem permeados pela célula, não podem interagir com o seu DNA e causar um efeito que ative mecanismos de morte celular. Como próximos passos deste estudo, seria interessante estudar as interações das fenazinas e fenoxazinas com proteínas membranas bacterianas, estudando possíveis mecanismos de entrada nas células. Seria também interessante

estudar um eventual sistema de transporte das fenazinas e fenoxazinas para o interior da célula de modo a verificar se estes compostos exibem ou não um potencial citotóxico se entrassem nas células. Uma eventual entrada nas células e com sucesso de citotoxicidade, tornaria as fenazinas potenciais fármacos devido à possibilidade de funcionalização dos sistemas de entrega celular de modo a torná-los seletivos para células cancerígenas.

Os estudos de citotoxicidade para os compostos da família das naftoquinonas foram concluídos com sucesso, possibilitando a formação de uma conexão lógica entre a citotoxicidade destes compostos e as suas propriedades. Os potenciais citotóxicos verificaram-se mais elevados para os compostos derivados das 1,2-naftoquinonas em comparação com os derivados das 1,4-naftoquinonas, à semelhança do que já verificado para a atividade inibitória da AChE, evidenciando assim uma maior relevância biológica das 1,2-naftoquinonas face às 1,4-naftoquinonas. As naftoquinonas apresentaram uma maior citotoxicidade do que os derivados das fenazinas e fenoxazinas, apresentando o valor mais alto citotoxicidade com um EC_{50} de 2,66 μ M, para o composto **4.b**, um valor de citotoxicidade muito próximo do EC_{50} da doxorubicina, um fármaco usado no tratamento do cancro. Assim, este composto demonstra-se com elevado potencial para ser usado no tratamento de cancro. Como próximos passos seria interessante estudar os mecanismos de morte celular e relacioná-los com o poder oxidante dos derivados em estudo, sendo também interessante estudar o perfil de proteínas expressas antes e depois do contacto com o composto, de modo a estudar alterações metabólicas causadas pelas naftoquinonas.

Após o estudo de citotoxicidade realizou-se o estudo dos mecanismos de morte celular, tentando descobrir qual a razão para a inviabilidade das células em estudo. Estes estudos foram apenas preliminares, não tendo sido possível chegar a conclusões sobre o modo de ação das naftoquinonas, nem das fenazinas e fenoxazinas. Apesar disso foi possível tirar algumas conclusões sobre as células que se cresceram e sobre o método de cultivo e recolha. A partir dos resultados é possível concluir sobre a presença de células apoptóticas marcadas com anexina e iodeto de propídeo, evidenciando que o composto **4.b** e **1** causam a apoptose das células Hep G2. Conclui-se também que o método de cultivo e recolha de células leve à autofluorescência das células Hep G2, uma vez que os controlos negativos apresentam alguma expressão de marcadores apoptóticos. O uso de tripsina para destacar as células da sua superfície de crescimento leva a que haja fragilização da membrana celular, algo que pode explicar a marcação das células controlo negativo com anexina. Esta marcação revela-se então inespecífica, uma vez que o iodeto de propídeo pode marcar também RNA que é libertado pela fragilização das células, um fenómeno que se suspeita ter acontecido. Para além disso, é possível verificar uma grande heterogeneidade na população celular, existindo populações de agregados de grandes dimensões, mas também de células pequenas e esféricas, marcando de igual forma estas duas populações. Para além disso, é possível identificar uma população de grande densidade, população esta correspondente a restos

celulares, muito provavelmente resultantes do uso de tripsina. Uma boa prática seria a repetição dos ensaios de modo a confirmar todos os resultados. Se os mesmos resultados fossem obtidos, seria necessário alterar o processo de cultivo, recolha de células e também o modo de preparação das amostras. Ao cultivar e recolher as células seria necessário suplementar o meio de tripsinização com EDTA de modo a evitar a formação de agregados celulares, e ao preparar as amostras, seria necessário usar uma RNase de modo a eliminar as contaminações das alíquotas com RNA proveniente de restos celulares. Após a otimização da técnica, sugere-se que sejam testados marcadores celulares que permitam a deteção do ciclo celular das células Hep G2 de modo a procurar um padrão de morte característico das famílias em estudo, sendo também útil e interessante o estudo do metaboloma das células de forma a comparar eventuais alterações a nível metabolómico causado pela presença dos compostos.

A presente dissertação permitiu com sucesso estabelecer ligações entre a estrutura molecular e a atividade biológica dos compostos da família das naftoquinonas, fenazinas e fenoxazinas, permitindo construir e expandir a biblioteca de compostos e a sua respetiva atividade biológica face a um determinado alvo. Este estudo conclui-se como um elemento de literatura útil para o desenvolvimento de novas moléculas para aplicações medicinais e farmacêuticas devido a apresentar resultados claros face à relação entre estrutura e atividade biológica.

O trabalho desenvolvido na presente dissertação permitiu a publicação de um artigo científico e duas apresentações em póster, numa conferência nacional (CQE Days 2022) e numa internacional (CHEMEET Conference 2022), tendo nesta última ganho o prémio de melhor apresentação

Artigo:

Cabral, R. G., Viegas, G., Pacheco, R., Sousa, A.C., Robalo, M. P. (2023). Sustainable Synthesis, Antiproliferative and Acetylcholinesterase Inhibition of 1,4- and 1,2-Naphthoquinone Derivatives. *Molecules*, 28, 1232. <https://doi.org/10.3390/molecules28031232>.

Comunicações em póster:

Gonçalo Viegas; Rafaela G. Cabral; Rita Pacheco Maria P. Robalo; Ana Catarina Sousa. "Understanding the potential of 1,4- and 1,2-naphthoquinone derivatives as acetylcholinesterase enzyme inhibitors".

A apresentação do póster foi vencedora do prémio de melhor comunicação em póster no encontro "International Chemistry Conference, June 27-29th, 2022, Online Event":

Capítulo 4 – Parte experimental

4. Parte experimental

4.1 Crescimento e manutenção de linhas celulares Hep G2 e ensaios de viabilidade celular

Todo o manuseamento das linhas celulares é executado na sala limpa. Antes de cada utilização as superfícies da sala são limpas com etanol a 70% e a sala, juntamente com todo o material a usar (à exceção de material sensível à luz), é esterilizada com recurso a luz ultravioleta durante 15 minutos. A abertura dos frascos-T, placas de crescimento, frascos de meio, tripsina e soluções tampão necessárias é realizada apenas dentro da câmara de fluxo laminar, estando todo o material previamente esterilizado de fábrica. O material descartável usado, como pipetas, pontas de pipetas, frascos-T, microplacas estão previamente esterilizadas em autoclave ou vêm esterilizados de fábrica, e são apenas abertos dentro da câmara de fluxo laminar.

É realizada uma limpeza geral mensal à sala limpa e todos os seus equipamentos. As superfícies metálicas são limpas com etanol a 70%. O chão, puxadores, e locais de maior manuseamento são limpos com lixívia. A incubadora e câmara de fluxo laminar são limpas também com etanol a 70%. Após a limpeza de todas as superfícies, a sala é esterilizada com recurso a luz ultravioleta durante 30 minutos.

4.1.1 Crescimento e manutenção das células Hep G2

As células da linha celular HepG2 são células derivadas de células hepáticas alteradas devido a um carcinoma hepatocelular. As células são crescidas e mantidas em frascos-T, crescendo em aderência à superfície do frasco. O meio de cultura usado para o crescimento das células Hep G2 é o meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Biowest, suplementado com soro fetal bovino (FBS), Biowest a 10%, glutamina (Gln), Sigma Aldrich, a 2 mM, antibiótico e antimicótico combinado, de penicilina, estreptomicina e anfotericina B, Sigma Aldrich, a 2 mM. O meio de cultura das células é trocado de 48h em 48h de modo a manter as células em meio fresco e com capacidade de manter o crescimento das células à velocidade ótima. As células crescem na incubadora a 37°C com arejamento de CO₂ a 5%, de modo a que este entre em contacto com o meio e pela ação do H₂CO₃ presente neste, o pH se mantenha estável na zona ótima de crescimento, cerca de pH 7. O ambiente da incubadora é também humidificado com recurso a água estéril, preparada por adição de sulfato de cobre até à saturação, e esterilizada em autoclave.

Após cada expansão de um frasco-T, ou uma vez por mês, as células em aderência são removidas do frasco-T, seguindo o protocolo descrito no próximo tópico, e são transferidas para um frasco novo idêntico, de modo a minimizar o desgaste celular e o risco de crescimento de contaminações.

4.1.2 Expansão células Hep G2

A expansão da cultura ocorre para frascos-T de 75 mL quando se verifica uma confluência de cerca de 90% das células em aderência nos T-25. Para realizar a expansão das culturas e a transferência das células para o novo frasco, é necessário destacar as células da sua superfície de aderência. Para tal é usada uma solução de tripsina, Biowhittaker Lonza, em tampão fosfato-salino (PBS), Corning. Primeiro é retirado todo o meio de crescimento, e as células são lavadas com PBS, Corning, de modo a remover todo o meio uma vez que este inativa a tripsina. Nos frascos de 25 mL é colocado apenas 0,5 mL de tripsina 1x de modo a não provocar a lise celular. Todo o líquido deve cobrir as células em aderência. Após a adição da tripsina o frasco é colocado na incubadora por 5 minutos de modo a ativar a tripsina. Após os 5 minutos o frasco é retirado da incubadora e são aplicados embates mecânicos leves nas paredes laterais de modo a destacar as células. As células são lavadas com a tripsina ativada de modo a arrastar todas as células destacadas, permitindo o destacamento de mais células. Realiza-se também *up-and-down* em movimentos rápidos por toda a área do frasco de modo a destacar o máximo de células possível e evitar a formação de aglomerados celulares promovidos pela ação da tripsina. Para inativar a tripsina adiciona-se ao frasco meio DMEM, arrastando para este todas as células que foram removidas. Com o meio realiza-se mais uma lavagem ao frasco, e o meio com as células em suspensão é transferido para um Falcon de 50 mL, a partir de onde as células em suspensão serão transferidas para os novos frascos de crescimento T-75 ou T-25.

4.1.3 Crescimento de células em microplaca

Quando o crescimento das células no T-75 atinge os 90% de confluência e se verifica uma densidade celular de 50×10^3 células por mL, as células do respectivo frasco são transferidas para uma microplaca de 96 poços, onde crescem até um preenchimento do fundo de cada poço, em meio DMEM completo. Inicia-se o processo por destacar as células de forma semelhante ao processo descrito no ponto anterior, adicionado 1 mL de tripsina por cada frasco de 75 mL. O volume de meio DMEM completo para onde são removidas as células deve ser o mínimo possível de modo a permitir que se realizem diluições de modo a obter uma dispersão com a densidade celular pretendida para cada utilização. As células são contadas na camara *Neubauer improved* de modo a confirmar a densidade celular pretendida. Após a contagem as células são transferidas para as microplacas em uso. Para uma microplaca de 96 poços não são usados os poços nas bordas de modo a evitar contaminações, e as células são transferidas com recurso a uma micropipeta multicanal P200. Para uma microplaca de 12 poços, as células são transferidas com recurso a uma micropipeta P1000.

4.1.4 Ensaio de viabilidade celular – MTT

O método do MTT usa o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico, Sigma Aldrich. Este reagente é permeável pelas células, onde é reduzido pela ação de oxirredutases, desidrogenases e outras enzimas doadoras de elétrons, presentes na mitocôndria, havendo evidências de que outras enzimas semelhantes em membranas intracelulares. Alguns compostos como ácido ascórbico, cisteína e ácido di-hidrolipólico têm também a capacidade de reduzir o MTT. O MTT tem uma coloração amarelada e é reduzido

O Formazan é formado intracelularmente, sendo necessário que a membrana celular seja rebentada para que este se solubilize de modo a ser quantificado.

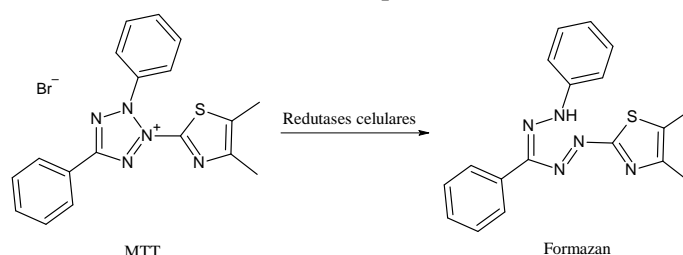


Figura 50 - Redução do MTT em Formazan pela ação de redutases celulares.

As células crescem em microplacas de 96 poços, sendo preparadas de acordo com o procedimento anterior, usando-se uma densidade de células inicial de 2×10^4 células/cm², crescendo 200 μ L da suspensão preparada em cada poço. As células crescem em meio DMEM completo e nas condições indicadas em 4.1.1., durante 48h até preencherem fundo de cada poço. Após o crescimento, é removido o meio e as células são lavadas com PBS. São por fim aplicados os compostos dissolvidos em meio DMEM sem FBS, contendo no máximo 1% de DMSO. São aplicados 200 μ L a cada poço de solução de cada composto a uma determinada concentração por coluna, de modo a obter os resultados em sextuplicado. Em cada placa são reservadas duas colunas para o controlo negativo, onde se aplica apenas meio DMEM sem FBS e com 1% de DMSO. As microplacas com os compostos são incubadas por 24h. Após a incubação, é removido o meio com composto e as células são lavadas com PBS. É adicionada uma solução de MTT, em meio DMEM sem FBS a $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, preparado num Falcon embrulhado em papel de alumínio de modo a proteger o MTT da luz. A solução é aplicada nos poços e as microplacas são incubadas por 2 a 4h até as células controlo negativo ganharem uma coloração azul-escura/roxa. Quando a condição se verificar é removida a solução da microplaca e adiciona-se a cada poço 100 μ L de metanol, realizando *up-and-down* deste, raspando o fundo dos poços de modo a rebentar as membranas celulares para solubilizar o Formazan formado pela conversão do MTT. Após se verificar uma dissolução uniforme, é lida a absorvância no leitor de microplacas de duplo feixe a 595 nm com referência a 630 nm. Se o valor de absorvância for muito elevado dilui-se cada poço com 100 μ L de metanol. O valor de citotoxicidade é calculado pela seguinte expressão:

$$\% \text{Citotoxicidade}_{\text{MTT}} = \left(100 - \left(\frac{\text{Abs}_{595 \text{ nm}} (\text{Composto})}{\text{Abs}_{595 \text{ nm}} (\text{Controlo})} \times 100 \right) \right) \quad (2)$$

4.1.5 Ensaio de viabilidade celular – LDH

O método da lactato desidrogenase (LDH) mede a fragilização da membrana celular, por onde é permeada a LDH, uma enzima responsável pela oxidação do lactato em piruvato. Pela amostragem do meio de cultivo das células é possível quantificar a morte celular tendo em conta a quantidade de LDH libertada em comparação com células normais. Com a oxidação do lactato ocorre a redução do NAD⁺ a NADH, permitindo a sua consecutiva oxidação pela enzima diaforase, que se for adicionada ao meio reacional em conjunto com iodonitrotetrazólico (INT) permite a sua redução em formazan. A quantificação deste composto permite então o estudo de citotoxicidade, estudando a estabilidade da membrana.

Os reagentes e protocolo usados seguem o kit *CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay*, ThermoFisher. As células crescem em microplacas de 96 poços de forma idêntica ao ponto 4.1.3., usando-se apenas três poços para cada concentração, obtendo-se os resultados em triplicado. Neste caso não se realizam duas colunas de poços para controlo negativo, apenas 6 poços. Em 3 destes são adicionados 10 µL de tampão de lise (Atividade máxima) e nos 3 restantes adiciona-se apenas meio DMEM sem soro com 1% DMSO (Atividade espontânea). As células crescem por 24h em contacto com os compostos. Após o crescimento são transferidos 50 µL de meio de cada poço para uma nova microplaca estéril, adicionando a cada poço de ensaio 50 µL da mistura reacional. A microplaca é protegida da luz e é incubada às condições ambientes por 30 minutos. Após a incubação adicionam-se 50 µL da solução STOP de modo a terminar a reação, realizando up-aand-down em cada poço de forma cuidada de modo a não formar muita espuma. A absorvância é lida no leitor de microplacas de feixe duplo a 490 nm com referência a 630 nm. O valor da citotoxicidade é calculado pela expressão seguinte:

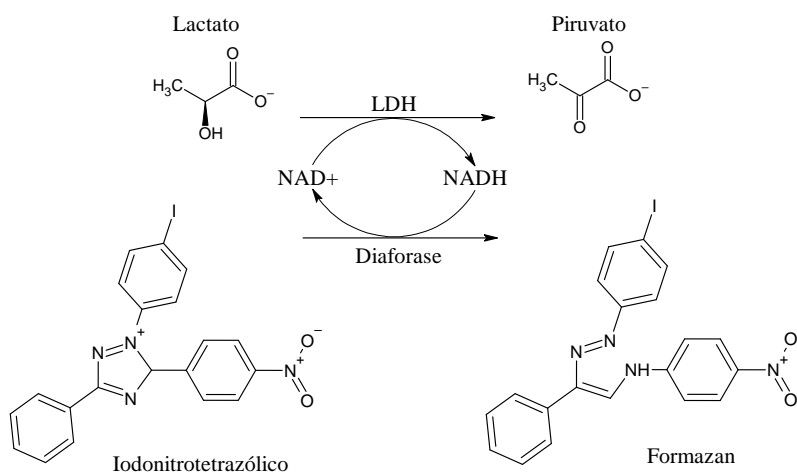


Figura 51 - Redução do INT a Formazan pelo mecanismo do LDH na oxidação do lactato a piruvato.

$$\% \text{Citotoxicidade}_{\text{LDH}} = \left(\frac{\text{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{Composto}) - \text{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{Espontânea})}{\text{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{Máxima}) - \text{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{Espontânea})} \right) \times 100 \quad (3)$$

4.1.6 Ensaios de citometria de fluxo – Estudo dos mecanismos de morte celular

O estudo de mecanismo de morte celular é realizado por citometria de fluxo com recurso ao citómetro CytoFLEX (Beckman Coulter) e aos marcadores celulares anexina A5 e iodeto de propídeo (Beckman Coulter), obtidos em conjunto com os restantes reagentes no kit ANNEXIN A5-FITC KIT-Apoptosis Detection Kit. Prepara-se o tampão de ligação por diluição da solução concentrada fornecida em água destilada. Dissolve-se 250 µg iodeto de propídeo em 1 mL de tampão de ligação diluído. As células para análise são crescidas com uma densidade celular inicial de 50×10^3 células por mL, numa microplaca de 12 poços, seguindo as condições do ponto 4.1.3.. São usados quatro poços para condição, sendo que uma placa contém poços para testar uma concentração de composto, poços para o controlo negativo com solvente e sem solvente. As células são removidas mecanicamente dos poços e lavadas com PBS e centrifugadas por 5 minutos a $500 \times g$ e 4°C de modo a concentrar a suspensão até aproximadamente 5×10^5 células por mL de tampão de ligação. A suspensão é separada em alíquotas de 100 µL. A cada alíquota são adicionados 1 µL de solução de anexina A5-FITC e 5 µL de solução de iodeto de propídeo-PC5.5, e a mistura é agitada levemente e incubada durante 15 minutos na ausência de luz. De forma semelhante são preparados dois controlos positivos, um por choque mecânico e outro por choque químico. Para a preparação do controlo positivo por choque mecânico é colocada uma alíquota de células em suspensão no banho ultrassónico por 15 minutos sem aquecimento. Para a preparação do controlo positivo por choque químico, uma alíquota é incubada com formaldeído a 3% em PBS durante 30 minutos. Após a preparação das amostras, estas devem ser analisadas até 30 minutos após a preparação.

A análise das amostras é realizada no citómetro CytoFLEX. Antes de iniciar é necessário verificar se os fluidos de lavagem, FlowClean Cleaning Agent (Beckman Coulter) e transporte (sheath fluid) (Beckman Coulter), estão nos níveis adequados. Inicia-se a calibração do equipamento pelo controlo de qualidade após a executar o programa de “*Daily clean*”. O controlo de qualidade é realizado com nanoesferas fluorescentes, e o equipamento encontra-se programado para realizar o procedimento de controlo de qualidade de forma automática, “*QC Standardisation*” para o lote de nanoesferas disponível, neste caso o CytoFLEX Daily IR QC Fluorospheres (Beckman Coulter). Se ocorrer uma falha do controlo de qualidade, é necessário realizar de novo o programa de “*Daily clean*” de seguida com o programa “*Prime*”, programa que injeta ar em contracorrente ao fluxo do citómetro, limpando restos celulares e impurezas que impeçam o bom funcionamento do citómetro. Após realizar o procedimento de “*Prime*”, realiza-se de novo o controlo de qualidade. É necessário repetir o processo até ocorrer a passagem no controlo de qualidade. Se o mesmo erro permanecer pode ser necessária uma intervenção no

equipamento. Após a aprovação do controlo de qualidade, realiza-se de novo o programa “Daily clean” e iniciam-se os estudos das amostras preparadas.

Os canais a serem adquiridos são o SSC-A, FSC-A, FSC-H, analisando a presença dos marcadores iodeto de propídeo (marcador PC5.5-A e PE-A) e da anexina-A5 (marcador FITC-A) e tempo de análise (permite verificar eventuais entupimentos e falhas nas bombas, que podem influenciar os resultados). As definições de aquisição são definidas automaticamente para as sugeridas pelo software, ajustando-se um limiar de deteção para os marcadores de fluorescência entre 100 e 500 eventos, e ajustando o ganho para entre 0 e 3×10^6 eventos. Estes limiares são ajustados com cada aquisição de modo a definir os quadrantes para cada marcador.

Os eventos são adquiridos até haver uma boa visibilidade das regiões formadas, tendo também em atenção o volume da amostra, sendo necessário preservar parte desta para eventuais repetições.

4.2 Estudo da atividade inibitória da AChE

4.2.1 Determinação da atividade inibitória da AChE – Método de Ellman’s

A determinação da inibição da atividade enzimática da AChE, induzida pelos compostos em estudo, é realizada pelo método colorimétrico de Ellman alterado. O método consiste na medição da velocidade inicial da reação entre a AChE, Sigma, e AChI, Sigma. Para tal, numa cuvette, é feito contactar 25 μL de AChE com 100 μL do inibidor em estudo (em DMSO a 1%), em 325 μL de tampão Tris com sais a pH 8 durante 15 minutos de modo a promover a ligação entre a enzima e o inibidor. A reação inicia-se pela adição de 75 μL de AChI e 475 μL de reagente de Ellman, Thermo Scientific™, em tampão Tris com sais a pH 8. A variação de velocidade inicial é medida durante 3 minutos a 405 nm no espectrofotómetro de feixe simples. Para calculo da percentagem de inibição realiza-se um ensaio em branco, substituindo o inibidor por uma solução aquosa de DMSO a 1%, considerando-se um ensaio válido com uma atividade AChE de $0,1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para determinar o IC_{50} realiza-se a mesma determinação de inibição para diferentes concentrações de inibidor de modo que seja possível, de forma analítica ou gráfica, determinar a concentração que leva a uma inibição da atividade AChE de 50%.

4.2.2 Docking molecular

Os estudos de docking molecular foram realizados no software AutoDock Vina tool via Chimera 1.16, e visualizados no Discovery Studio Visualizer.

Para realizar o docking molecular é necessário um modelo .pdb da AChE, sendo o modelo escolhido 4EY7.pdb, desenvolvido para estudos de docking molecular com o fármaco donepezilo. Todos os compostos a testar devem também estar representados estruturalmente em ficheiros .pdb, obtidos pelo software ChemDraw e Chimera (por conversão de estruturas em formato SMILES strings). Os vários compostos a testar são denominados de ligandos em estudos de docking molecular.

Para realizar o docking é necessário considerar apenas um dos domínios da AChE devido à sua simetria, sendo um deles descartados pelas ferramentas de edição molecular no software Chimera. É realizada a preparação para docking pela ferramenta Dockprep, seguindo as seguintes definições:

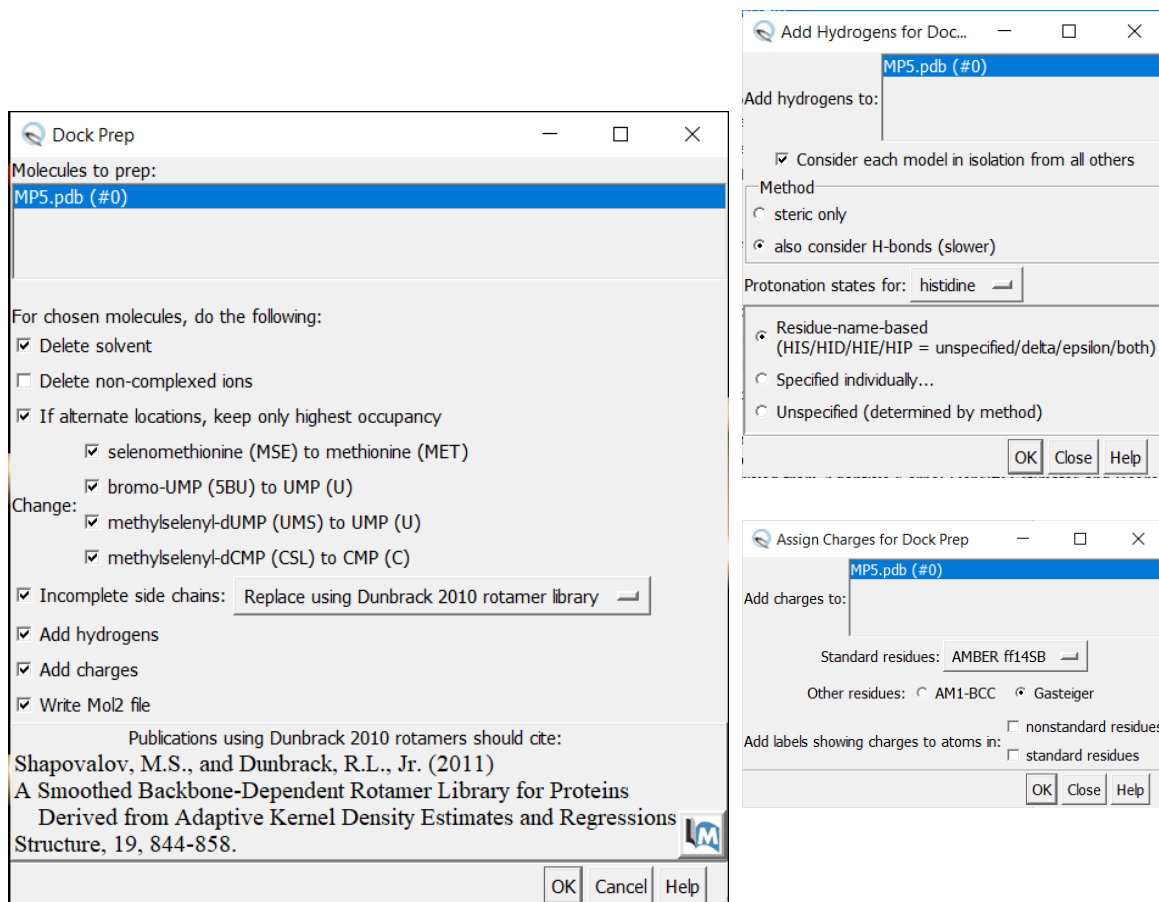


Figura 52 - Definições da preparação dos ficheiros .pdb para docking.

O mesmo procedimento é realizado para os ligandos, obtendo-se um ficheiro .mol2 para cada ligando e para a enzima editada para docking.

Após a obtenção dos ficheiros .mol2 inicia-se o docking molecular, usando-se as seguintes definições da **Figura 53**.

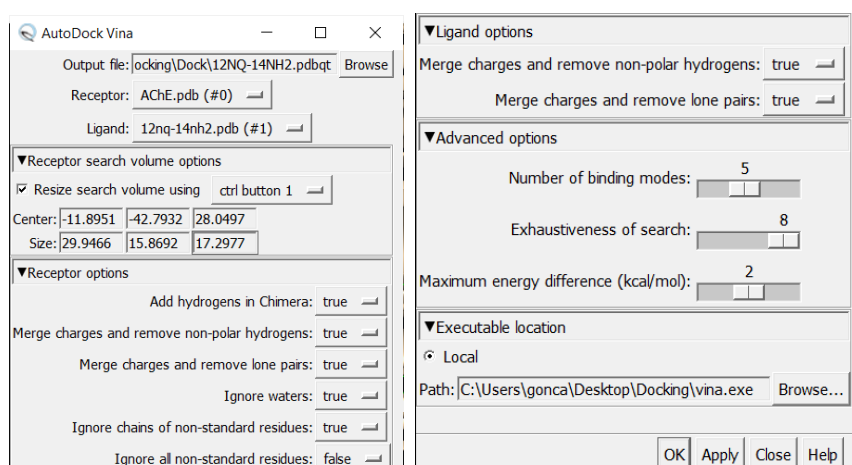


Figura 53 - Definições de docking usados na extensão Autodock Vina.

O volume de docking é definido para o centro ativo da enzima, estudando as interações dos compostos com os resíduos aminoacídicos que fazem parte deste. O volume está demonstrado na **Figura 54**.

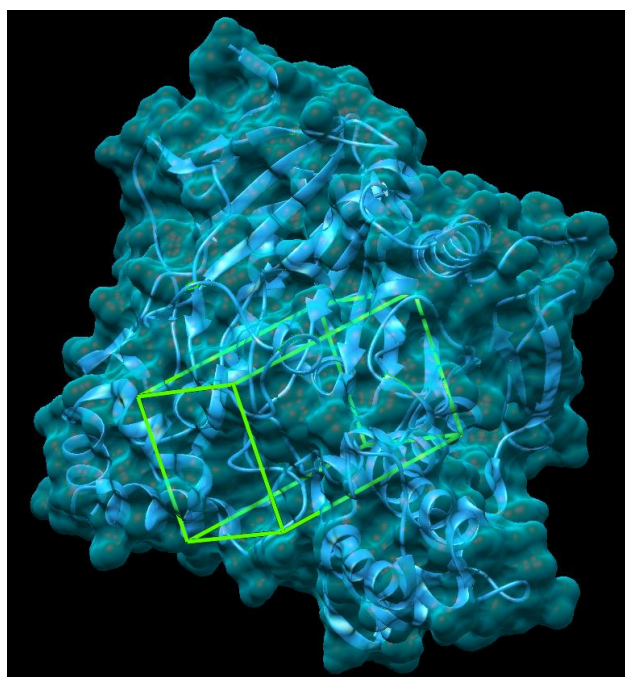


Figura 54 - Volume de docking usado.

Após realizar o docking, o software devolve os modelos previstos e gerados por ordem de score RMSD, calculado com base nas energias livres. Na **Figura 55a** apresentam-se exemplos dos modelos gerados e na **Figura 55b** exemplos de score obtidos.

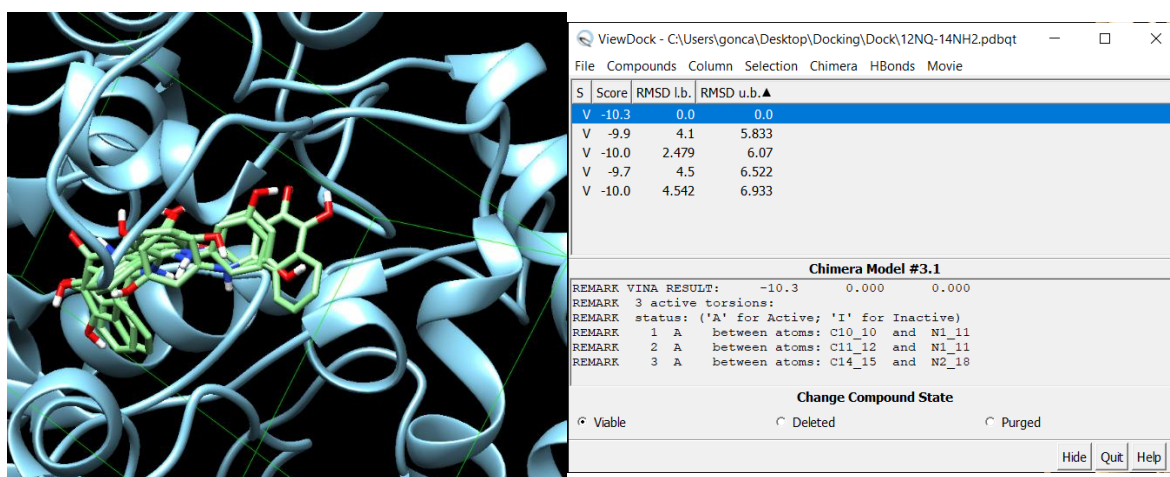


Figura 55 - Exemplo de resultados obtidos no docking molecular

A partir do modelo recetor+ligando (enzima+composto a testar) é gerado um ficheiro .pdb de modo a ser analisado no software Discovery Studio Visualizer. A visualização neste software é simples, sendo necessário apenas escolher o diagrama 3D de modo a obter uma representação 3D

das interações, e o modelo 2D, de modo a visualizar as mesmas interações no plano. As definições de visualização definidas estão apresentadas na **Figura 56**.

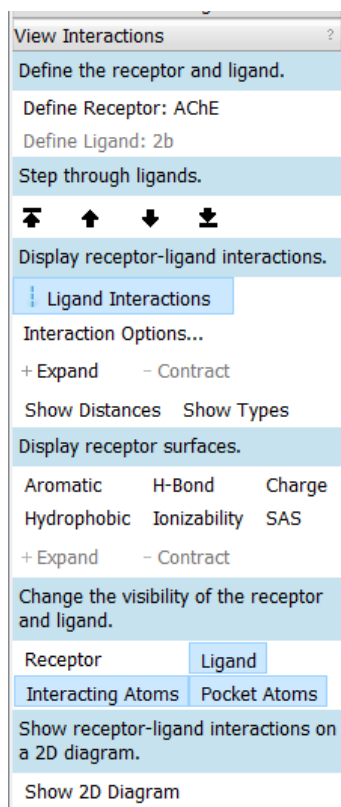


Figura 56 - Definições de visualização dos resultados do docking no software BioVia Discovery Studio.

A partir da informação obtida pelo diagrama 2D e a tabela de informações fornecidas são geradas as tabelas de interações onde são compiladas as distâncias entre os átomos que interagem e o tipo de interação que ocorre.

4.3 Estudo de atividade antioxidante

É preparada uma solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), Sigma, de modo a que a sua absorvância a 520 nm seja 0,700 u.a. As soluções de compostos, em água e DMSO (a 1%) são colocadas em contacto com a solução de DPPH por 30 minutos, sendo lida a sua absorvância a 520 nm. O ensaio em branco é realizado substituindo a solução de composto a testar por DMSO a 1% A atividade antioxidante é determinada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{Atividade antioxidante}_{\text{DPPH}} = \left(\frac{\text{Abs}_{520 \text{ nm}}(\text{Branco}) - \text{Abs}_{520 \text{ nm}}(\text{Composto})}{\text{Abs}_{520 \text{ nm}}(\text{Branco})} \right) \times 100 \quad (4)$$

4.4 Estudo de interação com o DNA

É preparada uma solução de DNA de salmão, dsDNA de salmão *Oncorhynchus keta*, Sigma, em cloreto de sódio a 2,5 µM. As misturas de análise são realizadas diretamente na cuvette de

análise, sendo usadas cuvettes de quartzo e com 1 cm de espessura. Neste estudo ocorre a variação da concentração de DNA, mantendo-se a concentração de composto a testar fixa e volume total de 1000 μL . São adicionados 50 μL de água destilada e 50 μL de solução de composto a testar em água e DMSO (a 1%). O volume conjunto de DNA e tampão Binding Buffer, é 900 μL . São realizados ensaios em branco (onde se utiliza DMSO a 1% a substituir o composto a testar) para o DNA e para o composto. Os compostos são postos em contacto com os restantes reagentes por 5 minutos à temperatura ambiente e é obtido o seu espectro UV-Vis por um varrimento entre os 200 e 700 nm.

Capítulo 5 – Bibliografía

5. Bibliografia

- [1] - Nakada, M., 2022. Research on the Efficient Enantioselective Total Synthesis of Useful Bioactive Polycyclic Compounds. *BCSJ* 95, 1117–1147. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20210329>
- [2] - Insanu, M., Kusmardiyani, S., Hartati, R., 2014. Recent Studies on Phytochemicals and Pharmacological Effects of *Eleutherine Americana* Merr. *Procedia Chemistry* 13, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.032>
- [3] - Paramapojn, S., Ganzera, M., Gritsanapan, W., Stuppner, H., 2008. Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant *Eleutherine americana* by RP-HPLC and LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 990–993. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.005>
- [4] - Guttenberger, N., Blankenfeldt, W., Breinbauer, R., 2017. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25, 6149–6166. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.002>
- [5] - Wu, C., Medema, M.H., Läkamp, R.M., Zhang, L., Dorrestein, P.C., Choi, Y.H., van Wezel, G.P., 2016. Leucanicidin and Endophenazines Result from Methyl-Rhamnosylation by the Same Tailoring Enzymes in *Kitasatospora* sp. MBT66. *ACS Chem. Biol.* 11, 478–490. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00801>
- [6] - Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T., Cho, A.K., 2012. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 221–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517>
- [7] - Widhalm, J.R., Rhodes, D., 2016. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Hortic Res* 3, 16046. <https://doi.org/10.1038/hortres.2016.46>
- [8] - Babula, P., Adam, V., Havel, L., Kizek, R., 2009. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones – their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *CPA* 5, 47–68. <https://doi.org/10.2174/157341209787314936>
- [9] - Gomes, C.L., de Albuquerque Wanderley Sales, V., Gomes de Melo, C., Ferreira da Silva, R.M., Vicente Nishimura, R.H., Rolim, L.A., Rolim Neto, P.J., 2021. Beta-lapachone: Natural occurrence, physicochemical properties, biological activities, toxicity and synthesis. *Phytochemistry* 186, 112713. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112713>
- [10] - Walther, B., Karl, J.P., Booth, S.L., Boyaval, P., 2013. Menaquinones, Bacteria, and the Food Supply: The Relevance of Dairy and Fermented Food Products to Vitamin K Requirements. *Advances in Nutrition* 4, 463–473. <https://doi.org/10.3945/an.113.003855>
- [11] - Medentsev, A.G., Akimenko, V.K., 1998. Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry* 47, 935–959. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)80053-8)
- [12] - Liu, H., Yan, C., Li, C., You, T., She, Z., 2020. Naphthoquinone Derivatives with Anti-Inflammatory Activity from Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Talaromyces* sp. SK-S009. *Molecules* 25, 576. <https://doi.org/10.3390/molecules25030576>
- [13] - Perry, N.B., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., 1991. A Cytotoxic and Antifungal 1,4-Naphthoquinone and Related Compounds from a New Zealand Brown Alga, *Landsburgia quercifolia*. *J. Nat. Prod.* 54, 978–985. <https://doi.org/10.1021/np50076a009>
- [14] - Sunassee, S.N., Davies-Coleman, M.T., 2012. Cytotoxic and antioxidant marine prenylated quinones and hydroquinones. *Nat. Prod. Rep.* 29, 513. <https://doi.org/10.1039/c2np00086e>
- [15] - Wellington, K.W., Nyoka, N.B.P., McGaw, L.J., 2019. Investigation of the antibacterial and antifungal activity of thiolated naphthoquinones. *Drug Dev Res* 80, 386–394. <https://doi.org/10.1002/ddr.21512>

- [16] - Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T., Cho, A.K., 2012. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 221–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517>
- [17] - Otsuka, M., Kato, N., Ichimura, T., Abe, S., Tanaka, Y., Taniguchi, H., Hoshida, Y., Moriyama, M., Wang, Y., Shao, R.-X., Narayan, D., Muroyama, R., Kanai, F., Kawabe, T., Isobe, T., Omata, M., 2005. Vitamin K2 binds 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 4 and modulates estrogen metabolism. *Life Sciences* 76, 2473–2482. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.020>
- [18] - Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, K.P., Grabley, S., Küllertz, G., Fischer, G., 1998. Selective Inactivation of Parvulin-Like Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases by Juglone. *Biochemistry* 37, 5953–5960. <https://doi.org/10.1021/bi973162p>
- [19] - Iwamoto, N., Sumi, D., Ishii, T., Uchida, K., Cho, A.K., Froines, J.R., Kumagai, Y., 2007. Chemical Knockdown of Protein-tyrosine Phosphatase 1B by 1,2-Naphthoquinone through Covalent Modification Causes Persistent Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 282, 33396–33404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705224200>
- [20] - Ohsaki, Y., Shirakawa, H., Miura, A., Giriwono, P.E., Sato, S., Ohashi, A., Iribe, M., Goto, T., Komai, M., 2010. Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor κ B through the repression of IKK α/β phosphorylation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21, 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.09.011>
- [21] - Higa, M., Takashima, Y., Yokaryo, H., Harie, Y., Suzuka, T., Ogihara, K., 2017. Naphthoquinone Derivatives from *Diospyros maritima*. *Chem. Pharm. Bull.* 65, 739–745. <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00178>
- [22] - Samant, B.S., Chakaingesu, C., 2013. Novel naphthoquinone derivatives: Synthesis and activity against human African trypanosomiasis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, 1420–1423. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.075>
- [23] - Ibis, C., Tuyun, A.F., Bahar, H., Ayla, S.S., Stasevych, M.V., Musyanovych, R.Ya., Komarovska-Porokhnyavets, O., Novikov, V., 2013. Synthesis of novel 1,4-naphthoquinone derivatives: antibacterial and antifungal agents. *Med Chem Res* 22, 2879–2888. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0300-y>
- [24] - Leyva, E., Loredó-Carrillo, S.E., López, L.I., 2021. Catalytic, ultrasonic, and microwave-assisted synthesis of naphthoquinone derivatives by intermolecular and intramolecular N-arylation reactions, in: *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*. Elsevier, pp. 231–264. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819848-3.00004-9>
- [25] - Wu, W., Wang, S., Zhang, H., Guo, W., Lu, H., Xu, H., Zhan, R., Fidan, O., Sun, L., 2021. Biosynthesis of Novel Naphthoquinone Derivatives in the Commonly-used Chassis Cells *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Appl Biochem Microbiol* 57, S11–S26. <https://doi.org/10.1134/S0003683821100124>
- [26] - Eyong, K.O., Kumar, P.S., Kuete, V., Folefoc, G.N., Nkengfack, E.A., Baskaran, S., 2008. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 5387–5390. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.053>
- [27] - Che, Y.-X., Qi, X.-N., Lin, Q., Yao, H., Qu, W.-J., Shi, B., Zhang, Y.-M., Wei, T.-B., 2022. Design strategies and applications of novel functionalized phenazine derivatives: a review. *J. Mater. Chem. C* 10, 11119–11174. <https://doi.org/10.1039/D2TC02085H>
- [28] - Pierson, L.S., Pierson, E.A., 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2509-3>

- [29] - Yan, J., Liu, W., Cai, J., Wang, Y., Li, D., Hua, H., Cao, H., 2021. Advances in Phenazines over the Past Decade: Review of Their Pharmacological Activities, Mechanisms of Action, Biosynthetic Pathways and Synthetic Strategies. *Marine Drugs* 19, 610. <https://doi.org/10.3390/md19110610>
- [30] - S. Hifnawy, M., Hassan, H.M., Mohammed, R., M. Fouda, M., Sayed, A.M., A. Hamed, A., F. AbouZid, S., Rateb, M.E., Alhadrami, H.A., Abdelmohsen, U.R., 2020. Induction of Antibacterial Metabolites by Co-Cultivation of Two Red-Sea-Sponge-Associated Actinomycetes *Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinespora* sp. EG49. *Marine Drugs* 18, 243. <https://doi.org/10.3390/md18050243>
- [31] - Deng, R.-X., Zhang, Z., Li, H.-L., Wang, W., Hu, H.-B., Zhang, X.-H., 2021. Identification of a Novel Bioactive Phenazine Derivative and Regulation of *phoP* on Its Production in *Streptomyces lomondensis* S015. *J. Agric. Food Chem.* 69, 974–981. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06498>
- [32] - Wang, X., Abbas, M., Zhang, Y., Elshahawi, S.I., Ponomareva, L.V., Cui, Z., Van Lanen, S.G., Sajid, I., Voss, S.R., Shaaban, K.A., Thorson, J.S., 2019. Baraphenazines A–G, Divergent Fused Phenazine-Based Metabolites from a Himalayan *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.* 82, 1686–1693. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00289>
- [33] - Chincholkar, S., Thomashow, L. (Eds.), 2013. *Microbial Phenazines*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40573-0>
- [34] - O'Brien, S., Fothergill, J.L., 2017. The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiology Letters* 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx128>
- [35] - Dharni, S., Sanchita, Samad, A., Sharma, A., Patra, D.D., 2014. The Interaction Pattern between a Homology Model of 40S Ribosomal S9 Protein of *Rhizoctonia solani* and 1-Hydroxyphenazine by Docking Study. *BioMed Research International* 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/682946>
- [36] - Cruz, L.R., Spangenberg, T., Lacerda, M.V., Wells, T.N., 2013. Malaria in South America: a drug discovery perspective. *Malar J* 12, 168. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-168>
- [37] - Bilal, M., Wang, S., Iqbal, H.M.N., Zhao, Y., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., 2018. Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 7759–7773. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9222-z>
- [38] - Elhady, H.A., El-Mekawy, R.E., Fadda, A.A., 2022. Valuable Chemistry of Phenazine Derivatives: Synthesis, Reactions and, Applications. *Polycyclic Aromatic Compounds* 42, 2894–2926. <https://doi.org/10.1080/10406638.2020.1833051>
- [39] - Rada, B., Leto, T.L., 2009. Redox warfare between airway epithelial cells and *Pseudomonas*: dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol Res* 43, 198–209. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8071-8>
- [40] - Ran, H., Hassett, D.J., Lau, G.W., 2003. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14315–14320. <https://doi.org/10.1073/pnas.2332354100>
- [41] - Tupe, S.G., Kulkarni, R.R., Shirazi, F., Sant, D.G., Joshi, S.P., Deshpande, M.V., 2015. Possible mechanism of antifungal phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas* sp. against dimorphic fungi *Benjaminiella poitrasii* and human pathogen *Candida albicans*. *J Appl Microbiol* 118, 39–48. <https://doi.org/10.1111/jam.12675>
- [42] - Myhren, L., Nygaard, G., Gausdal, G., Sletta, H., Teigen, K., Degnes, K., Zahlsen, K., Brunsvik, A., Bruserud, Ø., Døskeland, S., Selheim, F., Herfindal, L., 2013. Iodinin (1,6-Dihydroxyphenazine 5,10-Dioxide) from *Streptosporangium* sp. Induces Apoptosis Selectively in Myeloid Leukemia Cell Lines and Patient Cells. *Marine Drugs* 11, 332–349. <https://doi.org/10.3390/md11020332>
- [43] - Sletta, H., Degnes, K.F., Herfindal, L., Klinkenberg, G., Fjærvik, E., Zahlsen, K., Brunsvik, A., Nygaard, G., Aachmann, F.L., Ellingsen, T.E., Døskeland, S.O., Zotchev, S.B., 2014. Anti-microbial and cytotoxic 1,6-dihydroxyphenazine-5,10-dioxide (iodinin) produced by *Streptosporangium* sp. DSM 45942 isolated from the fjord sediment. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 603–610. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5320-0>

- [44] - Mateo Alonso, A., Horcajada, R., Groombridge, H.J., Chudasama (née Mandalia), R., Motevalli, M., Utley, J.H.P., Wyatt, P.B., 2005. Synthesis of phenazine derivatives for use as precursors to electrochemically generated bases. *Org. Biomol. Chem.* 3, 2832. <https://doi.org/10.1039/b506295k>
- [45] - Sousa, A.C., Conceição Oliveira, M., Martins, L.O., Robalo, M.P., 2018. A Sustainable Synthesis of Asymmetric Phenazines and Phenoxazinones Mediated by CotA-Laccase. *Adv. Synth. Catal.* 360, 575–583. <https://doi.org/10.1002/adsc.201701228>
- [46] - Che, Y., Qi, X., Qu, W., Shi, B., Lin, Q., Yao, H., Zhang, Y., Wei, T., 2022. Synthetic strategies of phenazine derivatives: A review. *Journal of Heterocyclic Chem* 59, 969–996. <https://doi.org/10.1002/jhet.4434>
- [47] - Sousa, A.C., Oliveira, M.C., Martins, L.O., Robalo, M.P., 2014. Towards the rational biosynthesis of substituted phenazines and phenoxazinones by laccases. *Green Chem.* 16, 4127–4136. <https://doi.org/10.1039/C4GC00901K>
- [48] - Cheluvappa, R., 2014. Standardized chemical synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *MethodsX* 1, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.07.001>
- [49] - Shapira, M.A., Verameyenka, K.G., Liavonchyk, K.V., Dobysh, A.A., Yantsevich, A.V., Maksimova, N.P., 2021. Novel approach of phenazine derivatives isolation from *Pseudomonas* culture medium. *Process Biochemistry* 111, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.004>
- [50] - Wan, Y., Liu, H., Xian, M., Huang, W., 2021. Biosynthesis and metabolic engineering of 1-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* H18. *Microb Cell Fact* 20, 235. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01731-y>
- [51] - M. Araújo, C.R., L. A. Santos, V., A. Gonsalves, A., 2016. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. *Rev. Virtual Quim.* 8, 1818–1834. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>
- [52] - Colovic, M.B., Krstic, D.Z., Lazarevic-Pasti, T.D., Bondzic, A.M., Vasic, V.M., 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *CN* 11, 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- [53] - Arredondo, J., Lara, M., Ng, F., Gochez, D.A., Lee, D.C., Logia, S.P., Nguyen, J., Maselli, R.A., 2014. COOH-terminal collagen Q (COLQ) mutants causing human deficiency of endplate acetylcholinesterase impair the interaction of ColQ with proteins of the basal lamina. *Hum Genet* 133, 599–616. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1391-3>
- [54] - A Doença de Alzheimer - Associação Alzheimer Portugal, n.d. URL <https://alzheimerportugal.org/a-doenca-de-alzheimer/> (accessed 9.12.22).
- [55] - Alzheimer Disease | University Hospitals [WWW Document], n.d. URL <https://www.uhhospitals.org/health-information/health-and-wellness-library/article/diseases-and-conditions/alzheimers-disease> (accessed 9.12.22).
- [56] - Zhou, S., Huang, G., 2021. Synthesis and activities of acetylcholinesterase inhibitors. *Chem Biol Drug Des* 98, 997–1006. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13958>
- [57] - Carvajal, F.J., Inestrosa, N.C., 2011. Interactions of AChE with A β Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. *Front. Mol. Neurosci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00019>
- [58] - Li, X.-T., 2022. Alzheimer's disease therapy based on acetylcholinesterase inhibitor/blocker effects on voltage-gated potassium channels. *Metab Brain Dis* 37, 581–587. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-00921-w>
- [59] - Mohsin, N. ul A., Ahmad, M., 2020. Donepezil: A review of the recent structural modifications and their impact on anti-Alzheimer activity. *Braz. J. Pharm. Sci.* 56, e18325. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000418325>

- [60] - Velloso, A., Lima, V., Soares, B., Nascimento-Júnior, N., 2022. ATIVIDADE ANTI-ALZHEIMER DE SUBSTÂNCIAS ORIUNDAS DE PRODUTOS NATURAIS E DE ORIGEM SINTÉTICA: ALGUNS EXEMPLOS IMPORTANTES DOS ÚLTIMOS 20 ANOS. *Quím. Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170860>
- [61] - Jiang, Y., Gao, H., Turdu, G., 2017. Traditional Chinese medicinal herbs as potential AChE inhibitors for anti-Alzheimer's disease: A review. *Bioorganic Chemistry* 75, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.09.004>
- [62] - Marucci, G., Buccioni, M., Ben, D.D., Lambertucci, C., Volpini, R., Amenta, F., 2021. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 190, 108352. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>
- [63] - Vecchio, I., Sorrentino, L., Paoletti, A., Marra, R., Arbitrio, M., 2021. The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Cent Nerv Syst Dis* 13, 117957352110291. <https://doi.org/10.1177/11795735211029113>
- [64] - Kotra, L.P., Park, J., 2017. Therapeutic Approaches to MS and Other Neurodegenerative Diseases, in: *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. Elsevier, pp. 439–473. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13766-7>
- [65] - Makarian, M., Gonzalez, M., Salvador, S.M., Lorzadeh, S., Hudson, P.K., Pecic, S., 2022. Synthesis, kinetic evaluation and molecular docking studies of donepezil-based acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Structure* 1247, 131425. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131425>
- [66] - Santos, T.C. dos, Gomes, T.M., Pinto, B.A.S., Camara, A.L., Paes, A.M. de A., 2018. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Front. Pharmacol.* 9, 1192. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01192>
- [67] - Nachmansohn, D., Rothenberg, M.A., 1945. STUDIES ON CHOLINESTERASE. *Journal of Biological Chemistry* 158, 653–666. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)51342-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)51342-4)
- [68] - Ahmed, M., Schetinger, M.R.C., Rocha, J.B.T., Morsch, V.M., Khan, G.M., 2009. Toxicological effects of N , N , N ' , N '-tetramethylethylenediamine on electric eel (*Electrophorus electricus*) acetylcholinesterase and human serum butyrylcholinesterase. *Toxicological & Environmental Chemistry* 91, 1149–1157. <https://doi.org/10.1080/02772240802553366>
- [69] - Kasteel, E.E.J., Nijmeijer, S.M., Darney, K., Lautz, L.S., Dorne, J.L.C.M., Kramer, N.I., Westerink, R.H.S., 2020. Acetylcholinesterase inhibition in electric eel and human donor blood: an in vitro approach to investigate interspecies differences and human variability in toxicodynamics. *Arch Toxicol* 94, 4055–4065. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02927-8>
- [70] - Huggins, C., Lapidus, J., 1947. CHROMOGENIC SUBSTRATES. *Journal of Biological Chemistry* 170, 467–482. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30829-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30829-3)
- [71] - Guilbault, G.G., Kramer, D.N., 1965. Resorufin Butyrate and Indoxyl Acetate as Fluorogenic Substrates for Cholinesterase. *Anal. Chem.* 37, 120–123. <https://doi.org/10.1021/ac60220a031>
- [72] - Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- [73] - Worek, F., Eyer, P., Thiermann, H., 2012. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning: Acetylcholinesterase assays for in vitro OP antidote research. *Drug Test. Analysis* 4, 282–291. <https://doi.org/10.1002/dta.337>
- [74] - Silva, A.F.C., Haris, P.I., Serralheiro, M.L., Pacheco, R., 2020. Mechanism of action and the biological activities of *Nigella sativa* oil components. *Food Bioscience* 38, 100783. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100783>

- [75] - de Ruyck, J., Brysbaert, G., Blossey, R., Lensink, M., 2016. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *AABC Volume 9*, 1–11. <https://doi.org/10.2147/AABC.S105289>
- [76] - Prieto-Martínez, F.D., Arciniega, M., Medina-Franco, J.L., 2018. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP RECQB 21*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
- [77] - Salmaso, V., Moro, S., 2018. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front. Pharmacol.* 9, 923. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
- [78] - Jiao, X., Jin, X., Ma, Y., Yang, Y., Li, J., Liang, L., Liu, R., Li, Z., 2021. A comprehensive application: Molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine. *Computational Biology and Chemistry* 90, 107402. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107402>
- [79] - Aniceto, N., Albuquerque, T.S., Bonifácio, V.D.B., Guedes, R.C., Martinho, N., 2023. Using Machine Learning and Molecular Docking to Leverage Urease Inhibition Data for Virtual Screening. *IJMS* 24, 8180. <https://doi.org/10.3390/ijms24098180>
- [80] - Mo, J., Chen, T., Yang, H., Guo, Y., Li, Q., Qiao, Y., Lin, H., Feng, F., Liu, W., Chen, Y., Liu, Z., Sun, H., 2020. Design, synthesis, in vitro and in vivo evaluation of benzylpiperidine-linked 1,3-dimethylbenzimidazolones as cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35, 330–343. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1699553>
- [81] - Hassanpour, S.H., Dehghani, M., 2017. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice* 4, 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>
- [82] - National Cancer Institute, 2021. What is cancer?. National Cancer Institute. URL <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [83] - World Health Organization, 2021. Cancer. World Health Organization. URL https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_2
- [84] - Baba, A.I., Cătoi, C., 2007. Tumor Cell Morphology. *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy, Capítulo 1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9561/>
- [85] - Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [86] - Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- [87] - Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- [88] - Schafer, K.A., 1998. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol* 35, 461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- [89] - Valastyan, S., Weinberg, R.A., 2011. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147, 275–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- [90] - Gupte, M., Tuck, A.N., Sharma, V.P., Williams, K.J., 2013. Major Differences between Tumor and Normal Human Cell Fates after Exposure to Chemotherapeutic Monofunctional Alkylator. *PLoS ONE* 8, e74071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074071>
- [91] - Hochegger, H., Takeda, S., Hunt, T., 2008. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 910–916. <https://doi.org/10.1038/nrm2510>
- [92] - Lodish, H.F., 2016. *Molecular cell biology*, Eighth edition. ed. W.H. Freeman-Macmillan Learning, New York.

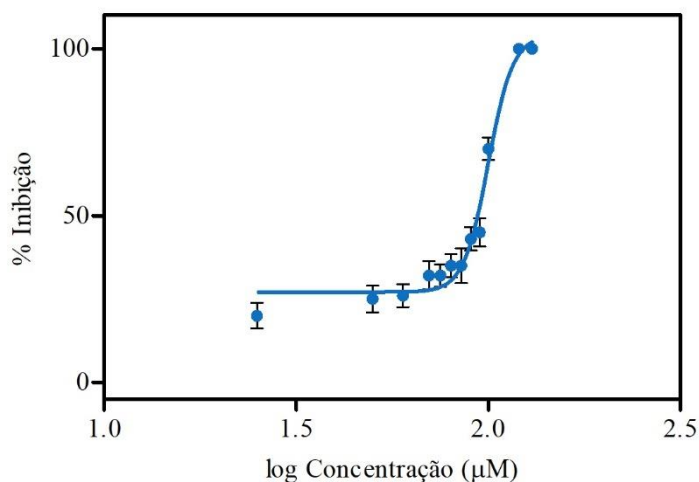
- [93] - Mantovani, F., Collavin, L., Del Sal, G., 2019. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ* 26, 199–212. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>
- [94] - Wilkinson, A. N., 2021. Cancer diagnosis in primary care. *Oncology Briefs* 67, 265-268. <https://doi.org/10.46747%2Fcfp.6704265>
- [95] - Bidram, E., Esmaeili, Y., Ranji-Burachaloo, H., Al-Zaubai, N., Zarrabi, A., Stewart, A., Dunstan, D.E., 2019. A concise review on cancer treatment methods and delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 54, 101350. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101350>
- [96] - Debela, D. T., Muzazu, S. GY, Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., Manyazewal, T., 2021. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* 9, 20503121211034366. <https://doi.org/10.1177%2F20503121211034366>
- [97] - Cancer cases and deaths on the rise in the EU, 2023. . EU Science Hub. URL https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news-and-updates/cancer-cases-and-deaths-rise-eu-2023-10-02_en (accessed 10.15.23).
- [98] - Tunissiolli, N.M., Castanhole-Nunes, M.M.U., Biselli-Chicote, P.M., Pavarino, E.C., da Silva, R.F., da Silva, R.C.M.A., Goloni-Bertollo, E.M., 2018. Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 18, 863.872. <https://doi.org/10.22034%2FAPJCP.2017.18.4.863>
- [99] - Olsen, S.K., Brown, R.S., Siegel, A.B., 2010. Review: Hepatocellular carcinoma: review of current treatment with a focus on targeted molecular therapies. *Therap Adv Gastroenterol* 3, 55–66. <https://doi.org/10.1177/1756283X09346669>
- [100] - Marisi, G., Cucchetti, A., Ulivi, P., Canale, M., Cabibbo, G., Solaini, L., Foschi, F.G., Matteis, S.D., Ercolani, G., Valgiusti, M., Frassinetti, G.L., Scartozzi, M., Gardini, A.C., 2018. Ten years of sorafenib in hepatocellular carcinoma: Are there any predictive and/or prognostic markers? *WJG* 24, 4152–4163. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i36.4152>
- [101] - Mousa, A., 2008. Sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Saudi J Gastroenterol* 14, 40. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.37808>
- [102] - Psilopatis, I., Damaskos, C., Garmpi, A., Sarantis, P., Koustas, E., Antoniou, E.A., Dimitroulis, D., Kouraklis, G., Karamouzis, M.V., Vrettou, K., Marinos, G., Kontzoglou, K., Garmpis, N., 2023. FDA-Approved Monoclonal Antibodies for Unresectable Hepatocellular Carcinoma: What Do We Know So Far? *IJMS* 24, 2685. <https://doi.org/10.3390/ijms24032685>
- [103] - Arzumanyan, V.A., Kiseleva, O.I., Poverennaya, E.V., 2021. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *IJMS* 22, 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
- [104] - Jablonská, E., Horkavcová, D., Rohanová, D., Brauer, D.S., 2020. A review of in vitro cell culture testing methods for bioactive glasses and other biomaterials for hard tissue regeneration. *J. Mater. Chem. B* 8, 10941–10953. <https://doi.org/10.1039/D0TB01493A>
- [105] - Paiva Barbosa, V., Bastos Silveira, B., Amorim dos Santos, J., Monteiro, M.M., Coletta, R.D., De Luca Canto, G., Stefani, C.M., Guerra, E.N.S., 2023. Critical appraisal tools used in systematic reviews of in vitro cell culture studies: A methodological study. *Research Synthesis Methods* jrsm.1657. <https://doi.org/10.1002/jrsm.1657>
- [106] - Dontsov, A.E., Ushakova, N.A., Sadykova, V.S., Bastrakov, A.I., 2020. Ommochromes from *Hermetia illucens*: Isolation and Study of Antioxidant Characteristics and Antimicrobial Activity. *Appl Biochem Microbiol* 56, 91–95. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010044>
- [107] - Marino, A., Battaglini, M., Moles, N., Ciofani, G., 2022. Natural Antioxidant Compounds as Potential Pharmaceutical Tools against Neurodegenerative Diseases. *ACS Omega* 7, 25974–25990. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03291>

- [108] - Al-Shafie, T.A., Mahrous, E.A., Shukry, M., Alshahrani, M.Y., Ibrahim, S.F., Fericean, L., Abdelkader, A., Ali, M.A., 2023. A Proposed Association between Improving Energy Metabolism of HepG2 Cells by Plant Extracts and Increasing Their Sensitivity to Doxorubicin. *Toxics* 11, 182. <https://doi.org/10.3390/toxics11020182>
- [109] - Dai, J., Jin, L., Yao, S., Wang, L., 2001. Prediction of partition coefficient and toxicity for benzaldehyde compounds by their capacity factors and various molecular descriptors. *Chemosphere* 42, 899–907. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00181-8)
- [110] - Dalafave, D.S., 2010. Design of Druglike Small Molecules for Possible Inhibition of Antiapoptotic BCL-2, BCL-W, and BFL-1 Proteins. *Biomed Eng Comput Biol* 2, BECB.S5575. <https://doi.org/10.4137/BECB.S5575>
- [111] - Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E., Altman, R.B., 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics* 21, 440–446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
- [112] - de Almeida, S., Lafayette, E., da Silva, L., Amorim, C., de Oliveira, T., Ruiz, A., de Carvalho, J., de Moura, R., Beltrão, E., de Lima, M., Júnior, L., 2015. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. *IJMS* 16, 13023–13042. <https://doi.org/10.3390/ijms160613023>
- [113] - Sohrabi, N., 2015. Binding and UV/Vis spectral investigation of interaction of Ni(II) piroxicam complex with calf thymus deoxyribonucleic acid (Ct-DNA): A thermodynamic approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7, 533-537.
- [114] - Zhitomirsky, B., Assaraf, Y.G., 2017. Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget* 8, 45117–45132. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15155>
- [115] - Lakshmanan, I., Batra, S., 2013. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *BIO-PROTOCOL* 3. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.374>
- [116] - Rajwa, B., Bernas, T., Acker, H., Dobrucki, J., Robinson, J.P., 2007. Single- and two-photon spectral imaging of intrinsic fluorescence of transformed human hepatocytes. *Microsc. Res. Tech.* 70, 869–879. <https://doi.org/10.1002/jemt.20497>
- [117] - Saitou, T., Takanezawa, S., Ninomiya, H., Watanabe, T., Yamamoto, S., Hiasa, Y., Imamura, T., 2018. Tissue Intrinsic Fluorescence Spectra-Based Digital Pathology of Liver Fibrosis by Marker-Controlled Segmentation. *Front. Med.* 5, 350. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00350>

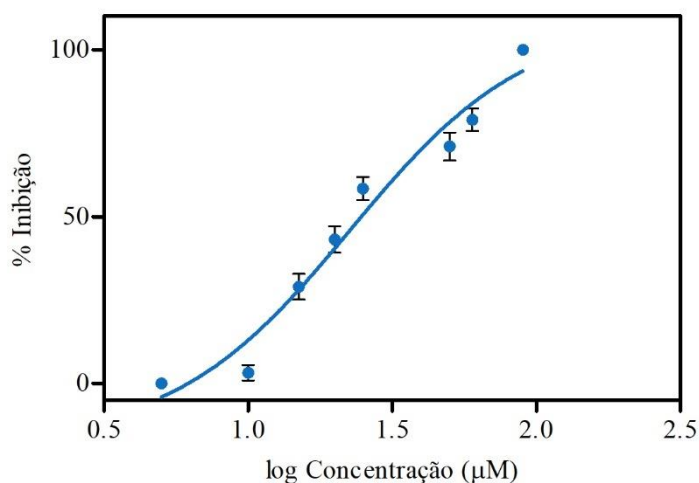
Capítulo 6 – Anexos

6. Anexos

Anexo 1 – Curva dose-resposta do composto **1.c** face à inibição da AChE.



Anexo 2 – Curva dose-resposta do composto **2.b** face à inibição da AChE.



Anexo 3 – Distâncias de interações entre composto **1.b** e cavidade catalítica da AChE.

Resultados de docking molecular para o composto **1.b**.

-	AA	Estrutura	Tipo de interação	Distância (Å)
1	TYR 69	CH3 (Ligando)	Ligação de Hidrogénio convencional	2,12
2	ASN 84	NH2	Ligação de Hidrogénio convencional	3,63
3	TRP 83	NH2	Ligação de Hidrogénio convencional	4,12
4	TRP 83	NH2	Ligação de Hidrogénio convencional	2,35
5	TRP 83	Ar (Anel fenazina)	Interação aromática π - π	4,02
6	TRP 83	CH3 (Fenazina)	Interação CH- π	3,03
7	TYR 121	Ar (Anel Fenazina)	Interação aromática π - π	3,52
8	TYR 121	CH3 (Fenazina)	Interação CH- π	4,21
9	PHE 329	Ar (Anel Fenazina)	Interação aromática π - π	3,41
	TYR 328	Ar (Anel Fenazina)	Interação aromática π - π	3,40

Anexo 4 – Distâncias de interações entre composto **1.c** e cavidade catalítica da AChE.

Resultados de docking molecular para o composto **1.c**.

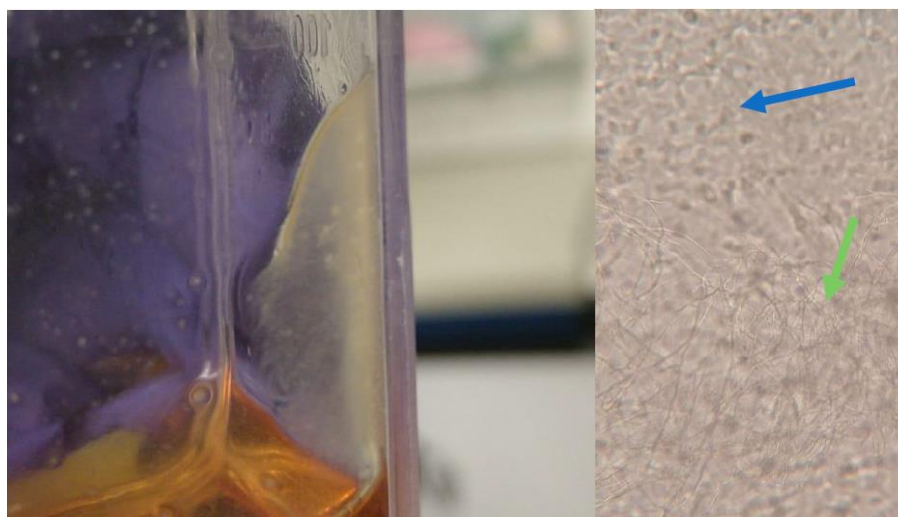
-	AA	Estrutura	Tipo de interação	Distância (Å)
1	HIS 438	O=C (Ligando)	Ligação de Hidrogénio convencional	2,61
2	SER 122	NH2	Ligação de Hidrogénio convencional	2,75
3	TRP 83	NH2	Ligação de Hidrogénio convencional	2,10
4	TRP 83	NH2	Ligação de Hidrogénio convencional	2,61
5	TRP 83	Ar (Anel Fenazina)	Interação aromática π - π	5,71
6	TRP 83	CH3 (Fenazina)	Interação CH- π	5,03
7	TRP 83	O=C (Ligando)	Interação CH- π	5,83
8	TYR 328	O=C (Fenazina)	Interação aromática π - π	5,15
9	GLY 117	H-O (Fenazina)	Interação aromática π - π	5,73

Anexo 5 – Distâncias de interações entre composto **2.b** e cavidade catalítica da AChE.

Resultados de docking molecular para o composto **2.b**.

-	AA	Estrutura	Tipo de interação	Distância (Å)
1	TYR 332	Ar (Anel fenazina)	Interação aromática π - π	5,80
2	TYR 332	CH3	Interação CH- π	3,51
3	PHE 329	Ar (Anel fenazina)	Interação aromática π - π	4,70
4	PHE 329	CH3	Interação CH- π	4,58
5	TRP 83	Ar (Anel fenazina)	Interação aromática π - π	4,01
6	HIS 438	O (Anel fenazina)	Ligação de Hidrogénio convencional	2,54
7	TYR 130	O=C (Fenazina)	Ligação de Hidrogénio convencional	2,48
8	GLY 117	O=C (Fenazina)	Ligação de Hidrogénio convencional	3,44
9	GLY 117	H-O (Fenazina)	Ligação de Hidrogénio convencional	2,38

Anexo 6 – Contaminantes fúngicos no meio de cultura nos fracos T50 usados para crescimento das células Hep G2.



Anexo 7 – Percentagem de citotoxicidade para células Hep G2 dos compostos **1**, **1.a**, **1.b**, **1.c** e **2** e respetivo desvio padrão (s).

Citotoxicidade dos compostos **1**, **1.a**, **1.b**, **1.c** e **2** para células Hep G2 em percentagem de células não viáveis e respetivo desvio padrão

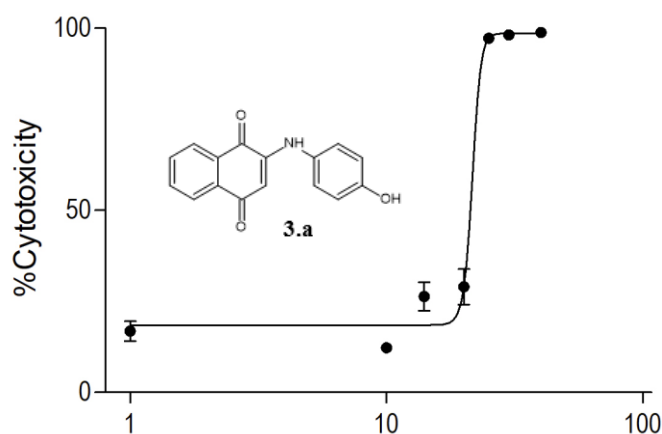
Composto	Citotoxicidade anti-Hep G2 \pm s (%)
1	59,3 \pm 4,1
1.a	15,0 \pm 5,1
1.b	11,5 \pm 4,8
1.c	3,1 \pm 1,2
2	31,6 \pm 1,5

Anexo 8 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto **1**.

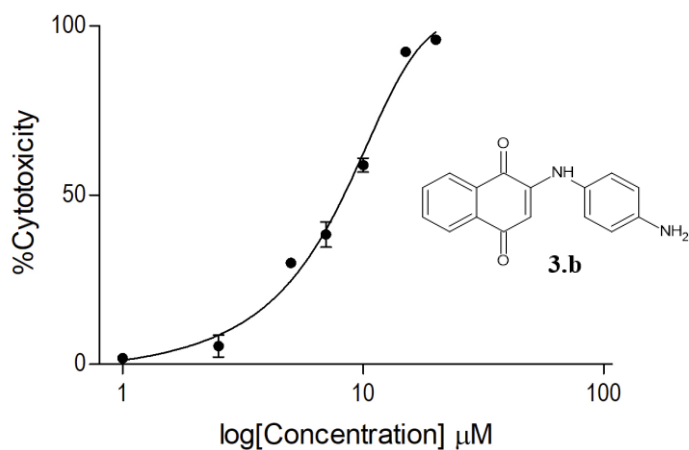
Valores de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) do composto **1**

Composto	EC ₅₀ \pm s (μ M)	Limite mínimo (μ M)	Limite máximo (μ M)	Declive	ER (%)
1	32 \pm 3	1,33	98,1	3,92	2,31

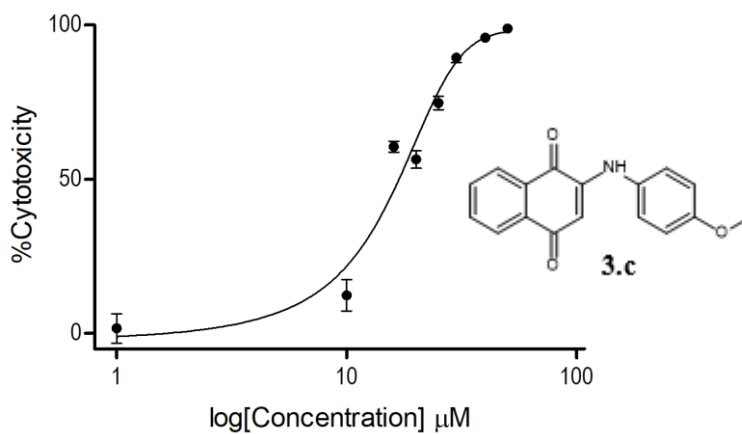
Anexo 9 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **3.a**.



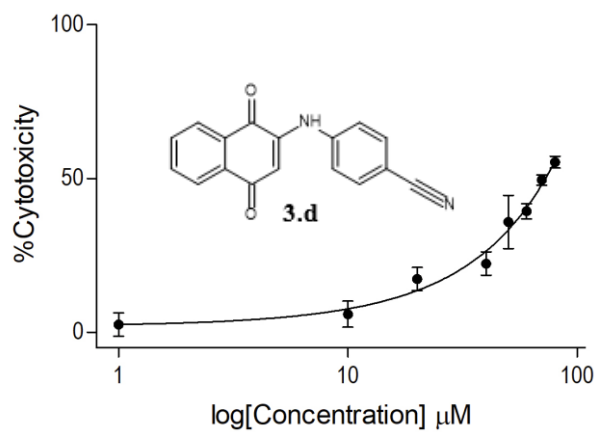
Anexo 10 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **3.b**.



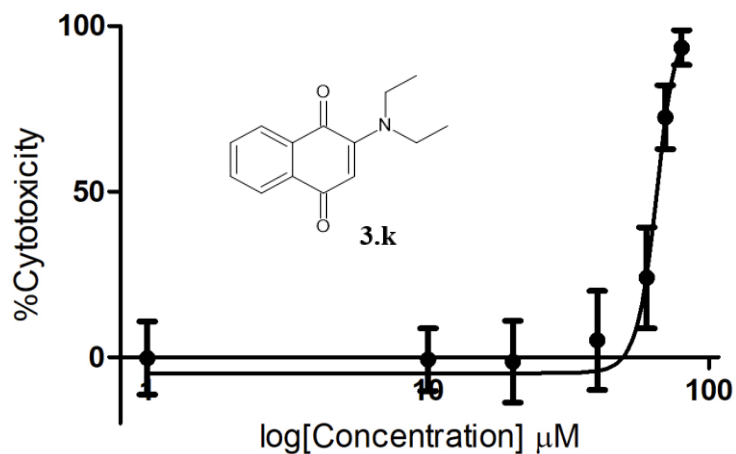
Anexo 11 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **3.c**.



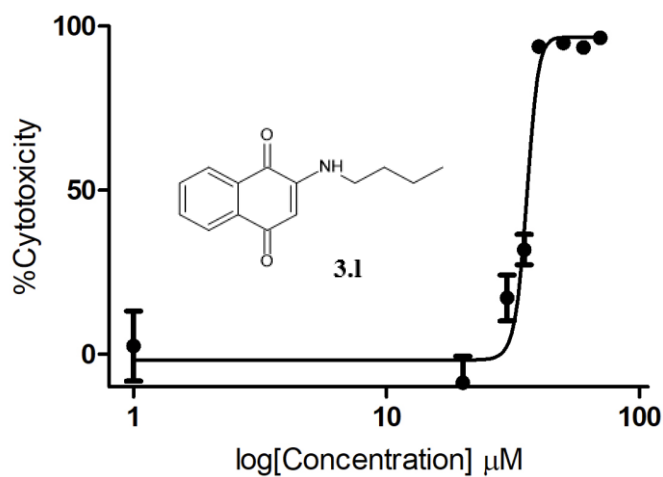
Anexo 12 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **3.d**.



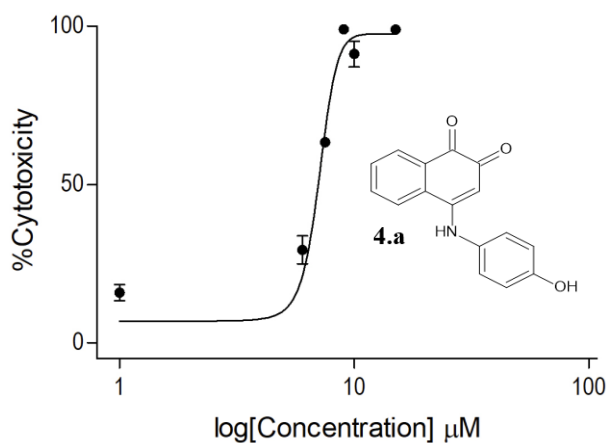
Anexo 13 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **3.k**.



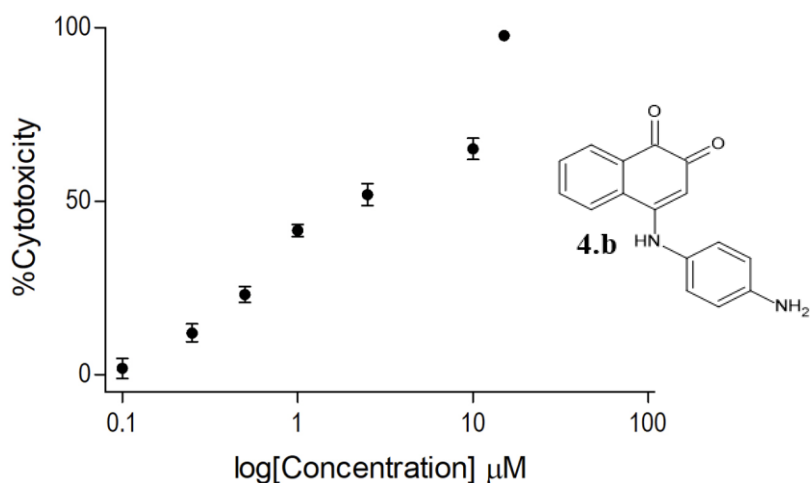
Anexo 14 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **3.l**.



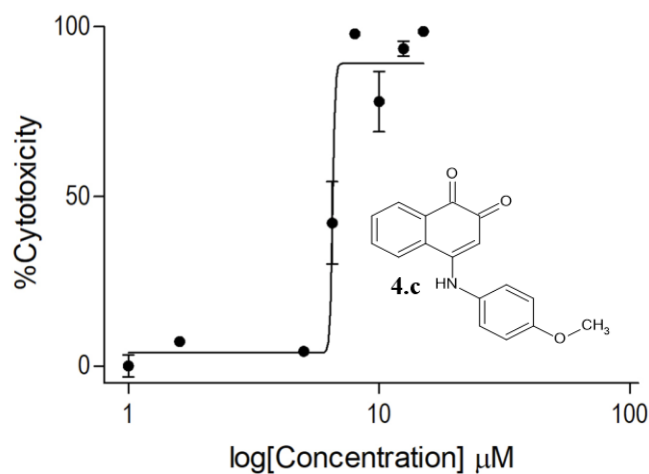
Anexo 15 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **4.a**.



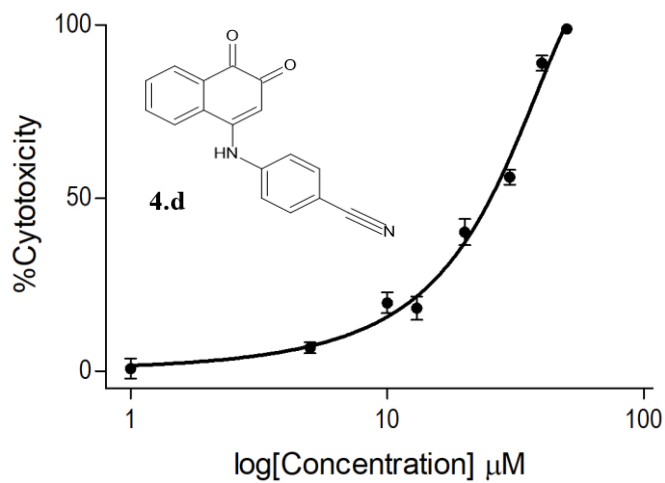
Anexo 16 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **4.b**.



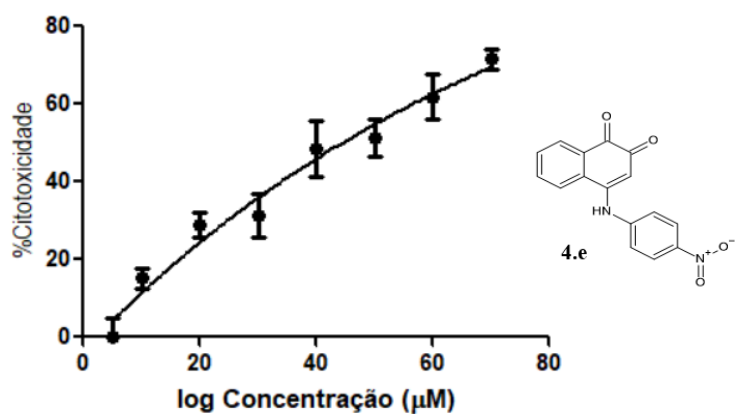
Anexo 17 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **4.c**.



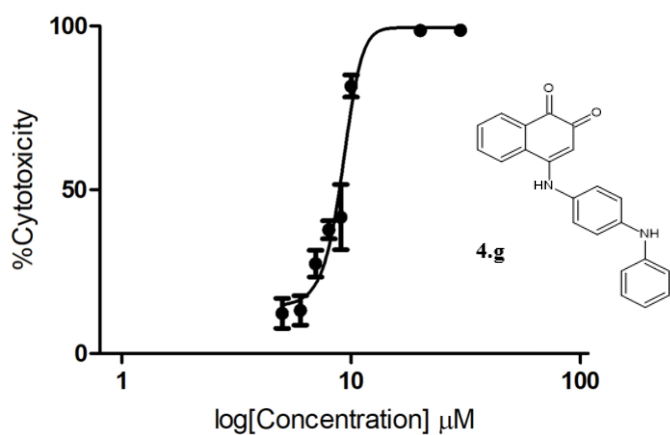
Anexo 18 – Curva dose-resposta de citotoxicidade em linhas celulares Hep G2 para o composto **4.d**.



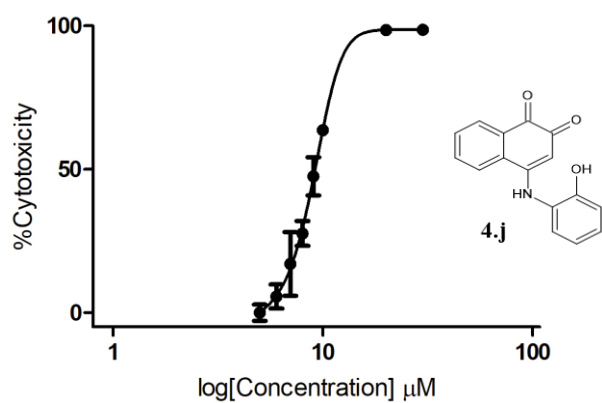
Anexo 19 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto **4.e**.



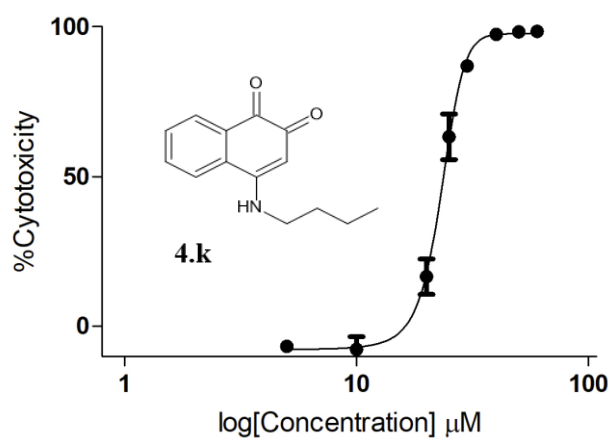
Anexo 20 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto **4.g**.



Anexo 21 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto **4.j**.



Anexo 22 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto **4.k**.



Anexo 23 – Valor de EC50, limites máximos e mínimos, declive e erro relativo (ER) para o composto **4.l**.

