



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

DAISY JEREISSATI BARBOSA LIMA

**SÍNTESE DE NOVOS TRIAZÓIS, ANÁLOGOS DA α E NOR- β -LAPACHONA COM
NÚCLEO SELENÓIDE, OBTIDOS VIA REAÇÕES “CLICK”, E DETERMINAÇÃO
DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO POR MODULAÇÃO REDOX**

FORTALEZA

2022

DAISY JEREISSATI BARBOSA LIMA

SÍNTESE DE NOVOS TRIAZÓIS, ANÁLOGOS DA α E NOR- β -LAPACHONA COM NÚCLEO SELENÓIDE, OBTIDOS VIA REAÇÕES “CLICK”, E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO POR MODULAÇÃO REDOX

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutorado em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.

Coorientador: Prof. Dr. Eufranio Nunes da Silva Júnior.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lima, Daisy Jereissati Barbosa.

Síntese de Novos Triazóis, Análogos da Alfa e Nor-Beta-Lapachona com Núcleo Selenóide, Obtidos Via Reações "Click", e Determinação do Potencial Antiproliferativo por Modulação Redox / Daisy Jereissati Barbosa Lima. – 2022.

167 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.

Coorientação: Profa. Dra. Eufrânio Nunes da Silva Junior.

1. Naftoquinonas. 2. Agentes Antineoplásicos. 3. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD 610

DAISY JEREISSATI BARBOSA LIMA

SÍNTESE DE NOVOS TRIAZÓIS, ANÁLOGOS DA α E NOR- β -LAPACHONA COM NÚCLEO SELENÓIDE, OBTIDOS VIA REAÇÕES “CLICK”, E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO POR MODULAÇÃO REDOX

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutorado em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.a. Dra. Cláudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Eufrânio Nunes da Silva Júnior
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Dr. Carlos Roberto Kosky Paier
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos de todos os dias; e mais, aos de todas
as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os membros da banca por sua disponibilidade, atenção e contribuições.

À minha orientadora de longa data, professora Cláudia, pela confiança e investimento, por contribuir com a minha formação desde a iniciação científica até o doutorado, por prover todo o necessário para a realização deste trabalho, seja através de estrutura ou parcerias e por seguir nos inspirando a seguir na pesquisa, pelos conselhos e pela importância dedicada a cada um de nós, seus alunos.

Ao meu coorientador, professor Eufrânio (UFMG), pela oportunidade de desenvolver este trabalho em parceria, pela confiança e pela acolhida e repasse de conhecimentos em seu laboratório (agradecimento que se estende também aos seus alunos).

Ao professor Claus Jacob (Universität des Saarlandes) e seus alunos pelas orientações, disponibilidade e acolhida em seu grupo, durante o doutorado sanduíche.

À técnica do laboratório de oncologia experimental, Silvana, por toda a contribuição despendida desde a minha iniciação científica até este momento.

Aos meus colegas de laboratório, pela cooperação, aprendizado e parceria diária.

Aos meus amigos de laboratório (que são muitos, pois permeei orgulhosamente muitas gerações que passaram pelo LOE), pela partilha de todas as horas, pelo encorajamento, por tornar a complexa experiência na pós-graduação mais leve, divertida e produtiva.

Aos meus amigos de fora do laboratório pelas palavras de motivação, pela compreensão dos meus cansaços e incontáveis ausências e, apesar disso, por me fazerem sentir que jamais caminhei sozinha durante esta jornada.

Aos meus pais, que não tenho palavras para agradecer por não terem medido esforços para me proporcionar tudo o que poderiam para que materializássemos meu sonho de ser cientista.

À sociedade, aos órgãos de fomento CNPq e CAPES e à pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pelos recursos disponibilizados para que todos estes anos de formação se tornassem possíveis.

“O ser humano é o ser humano e sua circunstância.” (José Ortega Y Gasset)

RESUMO

A β -lapachona tem se destacado como uma das quinonas com potencial anticâncer mais estudadas nos últimos anos. Seu derivado, Nor- β -lapachona, demonstra atividade similar, inspirando a síntese de novos derivados quinoidais com mecanismo de ação semelhante e potências variadas. Desta maneira, o objetivo desse trabalho foi sintetizar e caracterizar moléculas baseadas na estrutura da α -Lapachona, avaliar seus potenciais citotóxicos, relacionar estrutura-atividade de compostos derivados da Nor- β -lapachona e avaliar o mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade do composto mais ativo dentre os sintetizados, em comparação com moléculas já testadas anteriormente em células tumorais humanas. Foram sintetizadas oito moléculas similares à α -Lapachona por meio de reação *click*, com incorporação de grupos contendo selênio, e investigados os efeitos desses compostos na viabilidade de diversas linhagens tumorais e uma linhagem não tumoral, pelo ensaio do MTT. Moléculas inspiradas no esqueleto quinoidal da Nor- β -lapachona também foram testadas nas mesmas linhagens para o estudo da relação estrutura-atividade. A molécula ENSJ 670, derivada da Nor- β -lapachona, destacou-se em potência e seletividade dentre as moléculas testadas e, portanto, foi selecionada para continuidade nos estudos de mecanismo de ação. A Nor- β -lapachona foi utilizada como controle positivo, para comparação de potência e mecanismo de ação. Os experimentos de mecanismo foram realizados na linhagem de câncer de cólon HCT-116. A molécula ENSJ 670 apresentou diminuição da viabilidade celular, significativa geração de espécies reativas de oxigênio, alta taxa de despolarização mitocondrial e morte evidenciada por apoptose, demonstrando desempenho superior ao controle positivo, a Nor- β -lapachona. Após estes achados, sugeriu-se a influência da ENSJ670 sobre a enzima NQO1 através do ensaio do *docking* molecular e observou-se interação da molécula teste com esta enzima em maior grau que o dicumarol, um reconhecido inibidor da mesma. Em ensaio de inibição bioenzimática com dicumarol, onde foram utilizadas as moléculas DY37 e ENSJ 670, as mesmas apresentaram atividade citotóxica potencializada. A naftoquinona ENSJ 670 demonstra potente atividade antitumoral *in vitro* e mecanismo de morte celular associado a ação mitocondrial com possível envolvimento da enzima NQO1; destacando-se a importância de outros ensaios posteriores para validação do potencial terapêutico desta molécula.

Palavras-chaves: 1. Naftoquinonas; 2. Agentes Antineoplásicos 3. Estresse Oxidativo;

ABSTRACT

SYNTHESIS OF NOVEL TRIAZOLS, ANALOGS OF α AND NOR- β -LAPACHONE WITH SELENOID NUCLEUS, OBTAINED VIA “CLICK” REACTIONS, AND DETERMINATION OF ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL BY REDOX MODULATION

β -lapachone has emerged as one of the most studied quinones with anticancer potential in recent years. Its derivative, Nor- β -lapachone, demonstrates similar activity, inspiring the synthesis of new quinoidal derivatives with similar mechanism and varying potencies. Thus, the objective of this work was to synthesize and characterize molecules based on the structure of α -lapachone, evaluate the cytotoxic potential, relate structure-activity of compounds derived from Nor- β -lapachone and evaluate the mechanism of action involved in the cytotoxicity of the compound most active among those synthesized, compared to molecules already tested in human tumor cells. Eight molecules similar to α -lapachone were synthesized by means of *click* reaction with incorporation of groups containing selenium and investigated the effect of these compounds on the viability of several tumor cell lines and a non-tumor cell line, using the MTT assay. Molecules inspired by the quinoidal skeleton of Nor- β -lapachone were also tested in the same cell lineages to study the structure-activity relationship. The molecule ENSJ 670, derived from Nor- β -lapachone, stood out in potency and selectivity among the molecules tested and, therefore, was selected for continuity in the mechanism of action studies. Nor- β -lapachone was used as a positive control to compare potencies and mechanisms of action. The mechanism experiments were performed on the colon cancer cell line HCT-116. The ENSJ 670 molecule showed decreased cell viability, significant generation of reactive oxygen species, high mitochondrial depolarization rate and death evidenced by apoptosis, demonstrating superior performance to the positive control, Nor- β -lapachone. After these findings, the influence of ENSJ670 on the enzyme NQO1 was suggested through the molecular docking assay and interaction of the test molecule with this enzyme was observed to a greater degree than dicumarol, a recognized inhibitor of the same. In a bioenzymatic inhibition assay with dicumarol, where the molecules DY37 and ENSJ 670 were used, they showed potentiated cytotoxic activity. Naphthoquinone ENSJ 670 demonstrates potent antitumor activity *in vitro* and cell death mechanism associated with mitochondrial action with possible involvement of the NQO1 enzyme; highlighting the importance of other later trials to validate the therapeutic potential of this molecule.

Keywords: 1. Naphthoquinones; 2. Antineoplastic Agents 3. Oxidative Stress;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma (INCA, 2020)	18
Figura 2. Características das células tumorais e direcionamento terapêutico. Adaptado de Hanahan, 2022	19
Figura 3. Apresentação esquemática das fontes de radicais livres e seus efeitos no corpo humano. Adaptado de SHARIFI-RAD e colaboradores, 2020.	22
Figura 4. O equilíbrio entre geração e eliminação de EROs permite que as células cancerosas permaneçam na faixa tumorigênica dos níveis de EROs (Adaptado de SULLIVAN; CHANDEL, 2014). SODs- Superóxido dismutases, NRF2- (fator nuclear derivado de eritróide 2), GSH/GPX- Glutathiona/ Glutathiona peroxidase, PRXs- Peroxiredoxinas.	24
Figura 5 Representação das estruturas químicas dos agentes anticâncer etoposídeo e paclitaxel e suas respectivas aplicações terapêuticas.	28
Figura 6 Ciclo redox induzido por quinonas (Silva e colaboradores, 2002).	33
Figura 7 Quinonas biologicamente ativas e de atividade descrita em literatura.	35
Figura 8 Triazóis: moléculas recém aprovadas para uso clínico- (Adaptado de Jiang et al., 2019).	37
Figura 9. Reação de formação do 1,4-substituído-1,2,3-triazol	38
Figura 10. Estruturas de compostos organoselênio.....	40
Figura 11 Produto final das reações <i>click</i> , onde X é um calcogênio (Selênio ou enxofre) e R cadeias aromáticas ou alifáticas	44
Figura 12. Rota sintética para a obtenção da 3-Azido- C-Alil- Para.....	45
Figura 13. A. Rota sintética de disselenetos via SN2, onde X é um bom grupo abandonador (halogênios) e R é uma cadeia alifática. B. Grupos substituintes testados para esta rota sintética D. Rota sintética de disselenetos a partir de selenocianatos aromáticos, onde R são grupamentos diversos, oriundos de disselenetos representados em C.	46
Figura 14. Disselenetos comerciais.	47
Figura 15. Reação <i>Click</i> entre 3-Azido- C-Alil- Para e calcogenoalcinos na presença de catalisador de cobre.	48

Figura 16. Representação molecular de quinonas que servem de inspiração para novas moléculas com potencial farmacológico.....	57
Figura 17. Modelos de modulação redox em células submetidas a distintas condições em comparação com células normais. Adaptado de Jamier, Ba e Jacob (2010).	58
Figura 18. Fórmula utilizada para o cálculo do índice de seletividade dos compostos testados.....	63
Figura 19. Representação das moléculas selecionadas para testes comparativos com os novos protótipos sintetizados e apresentação farmacêutica da doxorrubicina (quinona de uso já estabelecido na prática clínica), uma solução isotônica de uso injetável.	68
Figura 20. Representação da pluralidade de mecanismos que a antraquinona doxorrubicina (29) apresenta (RIVANKAR, 2014).	69
Figura 21. Reações entre amidrazonas e quinonas de ocorrência natural com formação de Espirotriazóis (Adaptado de Aly e colaboradores, 2020)	71
Figura 22. Quinonas e seus potenciais redutores (adaptado de ZHU; WANG, 2010)	73
Figura 23. Efeito da <i>o</i> -quinona ENSJ 670 (21) sobre a viabilidade das células HCT-116, determinada por citometria de fluxo após 24h de tratamento.	76
Figura 24. Alvos biológicos de Orto-quinonas: da quimioprevenção à toxicidade. ...	79
Figura 25. Efeito da ENSJ 670 (21) sobre a externalização da fosfatidilserina em células HCT-116 após 24h de tratamento, determinado por citometria de fluxo, utilizando Anexina-V-PE e 7-AAD. Os resultados estão representados em gráficos em barras e dot-plot.....	82
Figura 26. Quinonas naturais e sintéticas e seus mecanismos de morte em diversas linhagens de células tumorais.	83
Figura 27. Efeito da ENSJ670 (21) sobre a despolarização mitocondrial em células HCT-116, determinado or citometria de fluxo após 24h e 48h de tratamento. A concentração utilizada para o controle positivo NBL foi de 20 μ M.	85
Figura 28. Um paralelo entre a produção de espécies reativas de oxigênio em células saudáveis e tumorais a partir do estímulo por fatores de crescimento. Adaptado de Perillo e colaboradores, 2020.	86
Figura 29. Efeito das naftoquinonas ENSJ670 (21) na produção de ROS em células HCT-116 determinado por citometria de fluxo utilizando o CM-H2DCFDA, após 1h, 3h e 5 horas de incubação.	88

Figura 30. Interação Quinona- GSH com transição Quinona-Semiquinona e formação de espécies reativas de oxigênio durante o processo. Adaptado de Bolton, Dunlap e Dietz (2018)	90
Figura 31. Representação dos processos biológicos em que a enzima NQO1 está envolvida e suas múltiplas funções.	93
Figura 32. Representação dos sítios onde se ligariam as amostras no teste de docking molecular in silico. A. Dicumarol; B. DY037 (13); C. ENSJ670 (21). As figuras 32b e 32c demonstram os aminoácidos aos quais cada molécula interagiria na enzima NQO1.	95

LISTA TABELAS

Tabela 1 Antioxidantes e como sua atividade é expressa quimicamente.....	25
Tabela 2 Classificação das quinonas quanto ao sistema aromático (Adaptada de SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016).....	30
Tabela 3 Produtos das clicks entre naftoquinonas e 1,2,3 triazóis com a presença de selênio, rendimentos e pontos de fusão.	61
Tabela 4. Moléculas da série o-quinonas, inspiradas no esqueleto da Nor- β -Lapachona, testadas para comparação com as moléculas da série p-quinona e seus respectivos dados de fórmula molecular e peso molecular.	62
Tabela 5. CI ₅₀ de incubação de 72h, em μ M, das moléculas seleno-quinoidais-Para nas linhagens tumorais (PC3, HCT-116, NCI-460, SNB-19, RAJI, HL-60) e na linhagem não tumoral L929. Os resultados foram baseados nas médias de pelo menos três experimentos independentes. α -Lapachona e Doxorubicina foram utilizadas como controles para fins comparativos. I.S (índice de seletividade comparando-se L929 e HCT-116).....	64
Tabela 6. CI ₅₀ de incubação de 72h, em μ M das moléculas seleno-quinoidais-ORTO nas linhagens tumorais (PC3, HCT-116, NCI-460, SNB-19, RAJI, HL-60) e na linhagem não tumoral, L929. Os resultados foram baseados nas médias de pelo menos três experimentos independentes. Nor- β -Lapachona e Doxorubicina foram utilizadas como controles para fins comparativos. I.S (índice de seletividade comparando-se L929 e HCT-116).....	65
Tabela 7. CI ₅₀ nos tempos de incubação de 24 e 48h, em μ M das moléculas o e p-quinonas frente a linhagem tumoral HCT-116. Os resultados são oriundos de uma média de experimentos realizados em triplicata.	74
Tabela 8. Apanhado entre as interações identificadas entre os aminoácidos da enzima NQO1, as moléculas em estudo (DY037 (13) e ENSJ 670 (21)) e outras moléculas que apresentam afinidade pela estrutura.	97
Tabela 9. Representação numérica da força de ligação entre as moléculas testadas e a enzima NQO1. O valor da energia de ligação δG é demonstrado em menos kcal/mol.....	99
Tabela 10. Demonstração da modulação enzimática da NQO1 prevista através de um grupo de células tratadas apenas com as amostras teste ou pré-tratadas com Dicumarol ou N-Acetilcisteína.....	101

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	23
INTRODUÇÃO	17
Estatísticas do câncer	17
Características das Células Tumorais.....	18
Metabolismo mitocondrial e Câncer	20
Lapachol e derivados: naftoquinonas com propriedades terapêuticas.....	31
A reação " <i>CLICK</i> " na síntese de Quinonas acopladas a 1,2,3-Triazóis com um núcleo selenoidal	38
Inclusão de Sistemas Antioxidantes.....	39
JUSTIFICATIVA.....	41
OBJETIVOS	42
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
MÉTODOS	44
Síntese de compostos naftoquinoidais 1,2,3-triazólicos com a presença dos calcogênios selênio e enxofre	44
Química <i>Click</i>	44
Síntese dos intermediários naftoquinoidais.....	44
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	48
Infravermelho (IV)	48
Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).....	49
Ponto de Fusão (PF).....	49
Análise da Citotoxicidade Pelo Método do MTT	49
Citometria de Fluxo	50
Avaliação da integridade da membrana, do número de células e da morfologia celular	51
Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina –Anexina V.....	52

Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	53
Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares	54
<i>Docking</i> molecular estático	54
Investigação da Bioativação enzimática das moléculas ENSJ670 E DY37	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
Potencial Antiproliferativo e Estudo Estrutura-Atividade	62
Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo	76
O-quinonas: Toxicidade x Citoproteção.	78
Estudo do mecanismo de ação do composto ENSJ 670 em células tumorais de cólon HCT-116.....	80
Mecanismo de Morte Celular	80
Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina –Anexina V.....	80
Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	83
Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelulares	86
<i>Docking</i> Molecular: Conexão entre as naftoquinonas ENSJ 670 (21) e DY037 (13) e a enzima NQO1	91
Viabilidade das Quinonas DY 037 (13) e ENSJ 670 (21) Após Indução da Inibição Enzimática da NQO1 por Dicumarol	99
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXO 1	136
CARACTERIZAÇÃO:.....	136
Síntese dos precursores de azida clicáveis:	136
Procedimento geral para cicloadições “ <i>Click</i> ” catalisadas por Cu(I)	136
Infravermelho- IR	139
Espectrometria de Massas de Alta Resolução- MS	144
Artigo Publicado.....	153

INTRODUÇÃO

Câncer

O câncer abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças que têm em comum a proliferação desordenada de células somáticas que sofreram acúmulo de mutações. Portanto, trata-se de um conjunto de doenças de natureza genética, cuja divisão mitótica descontrolada pode ocorrer em qualquer órgão ou tecido do corpo (World Health Organization, 2017).

Com rápida divisão, estas células tendem a ser muito agressivas, promovendo expansão de clones que apresentam capacidade de invadir partes adjacentes do tecido de origem, o que abre espaço para que as células possam migrar para a circulação sanguínea e, assim, colonizar outros órgãos (Greaves & Maley, 2012). É considerado um problema de saúde pública mundial, estando entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (INCA, 2020). De 5 a 10% de todos os tipos de câncer podem ser atribuídos unicamente a defeito genético hereditário, enquanto a maioria dos casos (90 - 95%) são atribuídos a interação de fatores ambientais com o genoma (Mbemi et al., 2020; Anand et al., 2008).

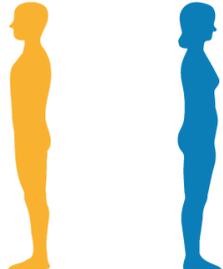
A interação entre fatores ambientais e o genoma pode resultar em instabilidade genômica, gerando mutações permanentes em proto-oncogenes e/ou genes supressores de tumor. As mutações promovem proliferação de clones de células com alterações genéticas e epigenéticas, associadas com a expressão e função anormal desses genes, resultando, sobretudo, em perda de controle nos processos de diferenciação e proliferação celular (Baylin & Jones, 2016; Alegria-Torres; Baccarelli & Bollati, 2011).

Estatísticas do câncer

As estimativas GLOBOCAN 2020 de incidência e mortalidade de câncer produzidas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer mostram que, em todo o mundo, houve cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10,0 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) em 2020. Deve ser destacado

que o câncer de mama feminino ultrapassou o câncer de pulmão, sendo o câncer mais comumente diagnosticado, com 2,3 milhões de novos casos estimados (11,7%), seguidos por câncer de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). Por outro lado, o câncer de pulmão permanece como a principal causa de morte por câncer, com uma estimativa de 1,8 milhões de mortes. A carga global de câncer deve ser de 28,4 milhões de casos em 2040 (SUNG et al., 2021).

Figura 1 Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma (INCA, 2020)

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Próstata	65.840	29,2%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Colo do útero	16.590	7,4%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Estômago	13.360	5,9%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Estômago	7.870	3,5%
Esôfago	8.690	3,9%			Ovário	6.650	3,0%
Bexiga	7.590	3,4%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Laringe	6.470	2,9%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%
Leucemias	5.920	2,6%					

*Números arredondados para múltiplos de 10.

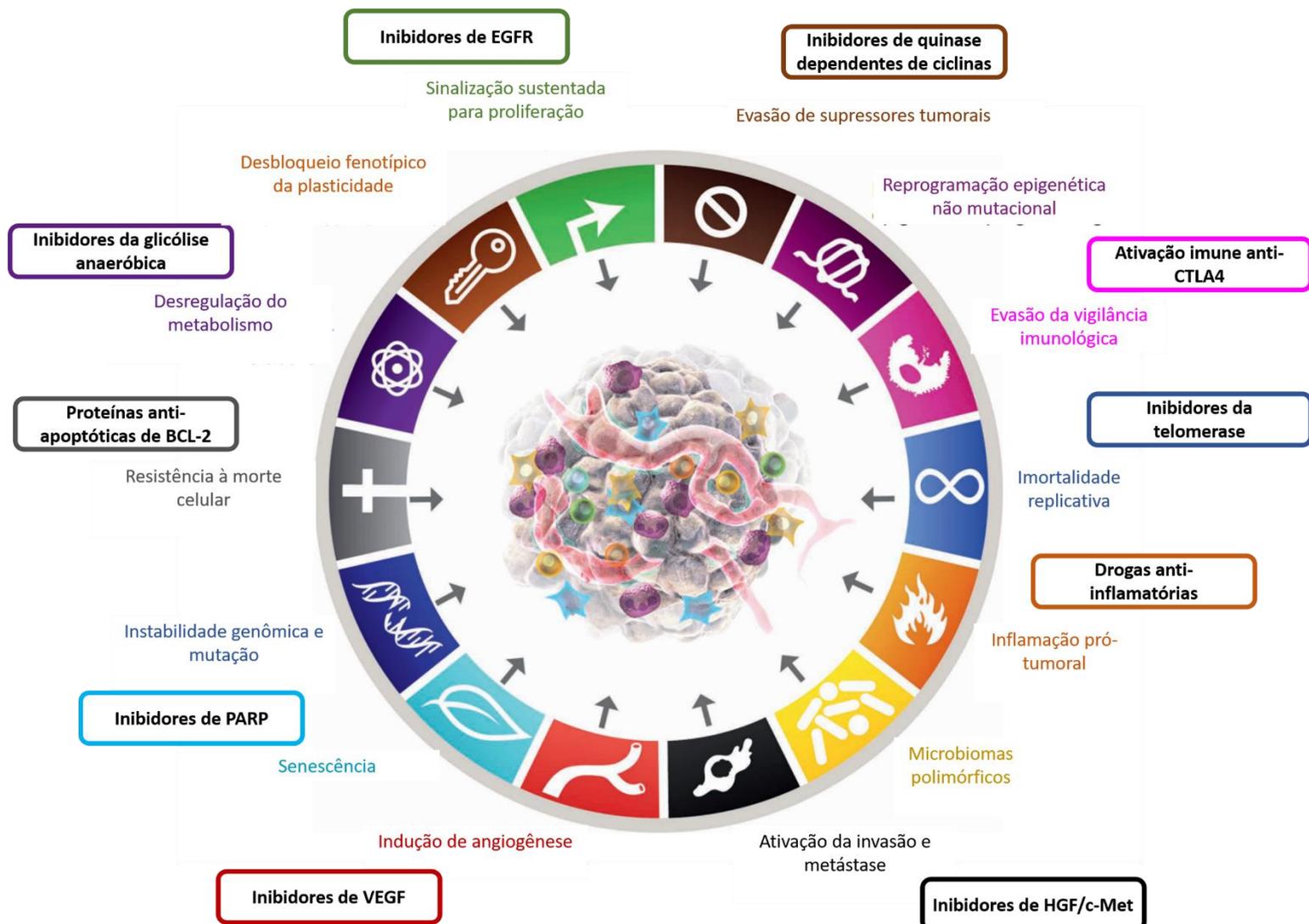
No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), vinculado ao Ministério da Saúde, oferece as estimativas de casos novos de incidência de câncer. De acordo com o instituto, estima-se que para cada ano do triênio 2020-22 haverá ocorrência de 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). Já o câncer de pele não melanoma representará, sozinho, 177 mil novos casos. Na sequência, aparecem os cânceres de mama e próstata (com cerca de 66 mil cada), os mais frequentes em homens e mulheres (Figura 1), respectivamente, cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil).

Características das Células Tumorais

As células tumorais possuem características próprias que as distinguem das células não tumorais do organismo. Essas características, descritas por Hanahan e Weinberg (2000, 2011 e 2022), permitem uma melhor compreensão da biologia da célula tumoral. Além da instabilidade genômica e mutações descritas anteriormente,

as “marcas do câncer” são: sinalização sustentada para proliferação, evasão de supressores tumorais, evasão do sistema imune, imortalidade replicativa, resposta inflamatória (antes imaginada como um mecanismo exclusivamente antitumoral, mostrou-se também ser pró-tumor através do fornecimento de moléculas bioativas ao microambiente tumoral) e desregulação do metabolismo energético (catabolismo da glicose preferencialmente pela via glicolítica) (Figura 2).

Figura 2. Características das células tumorais e direcionamento terapêutico. Adaptado de Hanahan, 2022



Todos os eventos descritos levam a resistência à apoptose, processo de morte celular fisiologicamente regulado para eliminar células tumorais incipientes,

bem como abrem espaço para a formação de novos vasos sanguíneos no ambiente tumoral, o que ativa os processos de invasão e metástase da célula tumoral. Essas “marcas” são adquiridas durante as várias etapas de desenvolvimento dos tumores humanos, sendo fontes promissoras para a descoberta e desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra o câncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Na intenção de desacelerar e/ ou impedir o crescimento tumoral e invasão de tecidos adjacentes, tem-se ampliado as pesquisas relacionadas a estas “marcas” e alcançado novas abordagens na terapia anticâncer como o uso de vetores virais (SOUZA, 2019), imunoterapia (PADILHA; COSTA, 2020) e até mesmo combinações de anti-angiogênicos com fármacos citotóxicos (ALLEN *et al*, 2017) estes são alguns exemplos de tecnologias desenvolvidas buscando otimizar a terapia anticâncer e torná-la mais efetiva.

Metabolismo mitocondrial e Câncer

As mitocôndrias são organelas que desempenham um papel importante na sobrevivência e proliferação celular (XIA *et al.*, 2019). O metabolismo mitocondrial é importante para a função do ciclo do ácido tricarbóxico, cadeia transportadora de elétrons, oxidação de ácidos graxos, síntese de aminoácidos, lipídios e nucleotídeos; e produção de ATP e antioxidantes (WALLACE, 2012).

As mitocôndrias são organelas complexas que influenciam a iniciação, o crescimento, a sobrevivência e a metástase do câncer, e muitas facetas da biologia mitocondrial, além da produção de energia, contribuem ativamente para a tumorigênese. Estas incluem massa mitocondrial, regulação da morte celular, homeostase redox, regulação metabólica e sinalização celular. A interação entre esses aspectos da biologia mitocondrial resulta na coordenação da fisiologia celular e destaca as funções pleiotrópicas das mitocôndrias no câncer. Além disso, semelhante às descobertas transformadoras de mutações oncogênicas nas vias de sinalização de fatores de crescimento, as mutações nas enzimas metabólicas mitocondriais são uma nova e excitante fronteira na biologia do câncer (VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016). Uma marca registrada dos tumores é a reprogramação metabólica, que suporta a síntese de macromoléculas, a demanda bioenergética e a sobrevivência celular (PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Portanto, as mitocôndrias são centros de reações metabólicas e conduzem essa reprogramação por meio de vários mecanismos.

Com o avanço dos estudos em oncologia, duas hipóteses sobre o câncer foram eventualmente erradicadas: primeiramente a noção de que o câncer é um distúrbio puramente intrínseco à célula que se origina de alterações epigenéticas ou genéticas (BUI; SCHREIBER, 2007; KROEMER *et al*, 2015); e em segundo, a visão de que as células malignas satisfazem suas necessidades bioenergéticas e anabólicas principalmente (se não apenas) por meio da glicólise aeróbica (EREZ; DEBERARDINIS, 2015; DANHIER *et al* 2017). Atualmente, é amplamente aceito que os tumores se formam, se desenvolvem e respondem à terapia no contexto de uma interação bidirecional complexa com o sistema imunológico do hospedeiro (GALLUZZI *et al*, 2015; CHEN; MELLMAN, 2017). Da mesma forma, a influência fundamental do metabolismo mitocondrial em todas as etapas da oncogênese, ou seja, a transformação maligna, a progressão do tumor e a resposta ao tratamento, acabou recebendo o devido reconhecimento (HE *et al.*, 2018), demonstrando a relevância desta organela em todo o processo de formação e proliferação celular dos tumores.

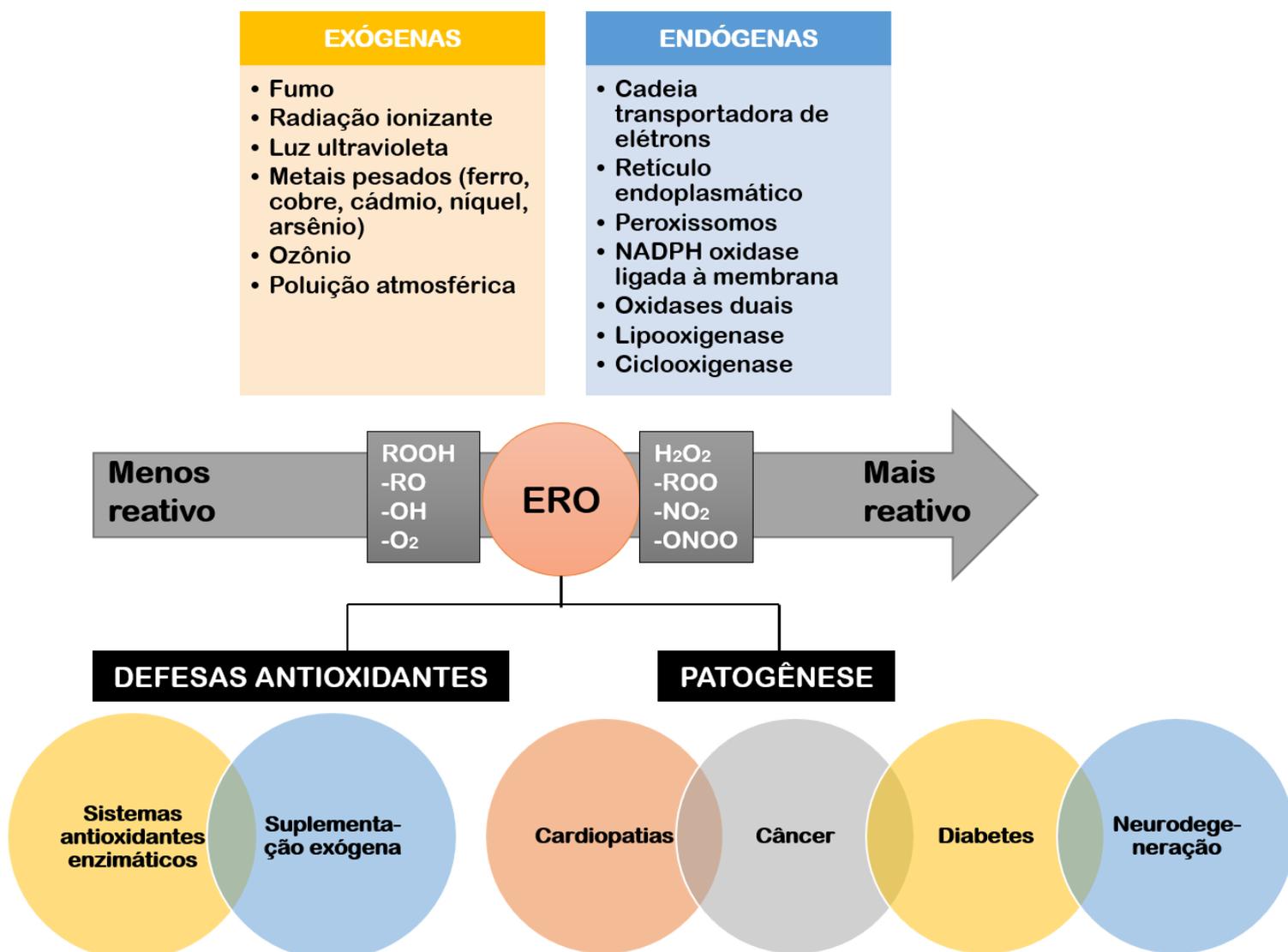
A flexibilidade que as mitocôndrias conferem às células tumorais, incluindo alterações na utilização de combustível, bioenergética, susceptibilidade à morte celular e estresse oxidativo, permite a sobrevivência em face de condições ambientais adversas, como ausência de nutrição e ação de tratamentos quimioterápicos direcionados ao câncer. Portanto, para tratar o câncer de forma eficaz, intervenções terapêuticas propiciadas por alvos mitocondriais poderão ser consideradas em estudos futuros, em que terapias combinadas serão importantes para o avanço dos tratamentos contra o câncer (VYAS; ZAGANJOR; HAIGIS, 2016).

Estresse oxidativo e antioxidantes

O estresse oxidativo é um estado de equilíbrio perturbado entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a eficiência de antioxidantes (PISOSCHI; POP, 2015) e desempenha, portanto, um papel essencial na patogênese de inúmeras doenças crônico-degenerativas (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

EROs são pequenas moléculas derivadas de oxigênio, que incluem radicais de oxigênio [superóxido ($O_2 \cdot^-$), hidroxil ($\cdot OH$), peroxil ($RO_2 \cdot$) e alcoxil ($RO \cdot$)] e certas moléculas ou íons que são agentes oxidantes ou são facilmente convertidos em radicais, como ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As ROS são produzidas no interior das células por fontes endógenas e exógenas (POLJLAK; DAHMANE, 2012).

Figura 3. Apresentação esquemática das fontes de radicais livres e seus efeitos no corpo humano. Adaptado de SHARIFI-RAD e colaboradores, 2020.



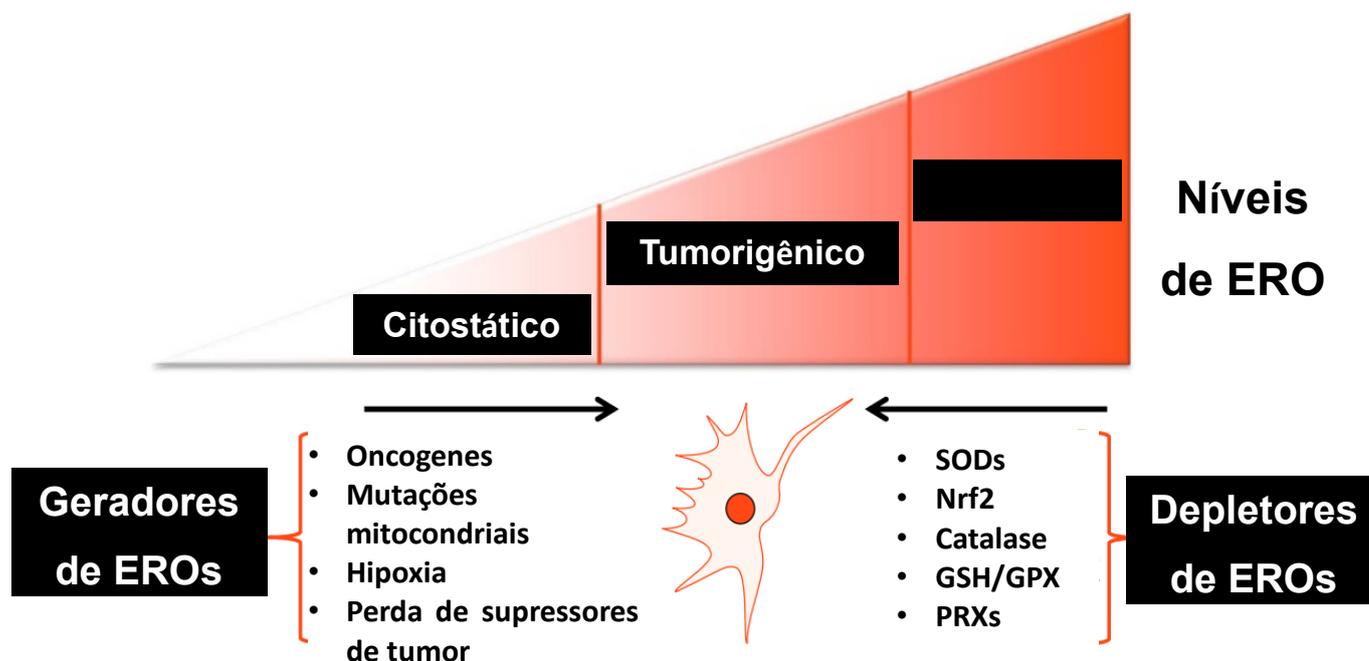
As espécies reativas de oxigênio (EROs) endógenas compreendem os subprodutos do metabolismo celular em organismos aeróbicos. Em baixas concentrações, geralmente estão envolvidos em diferentes processos celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose, como um segundo mensageiro na sinalização celular (Salehi et al., 2018). A produção de EROs dentro das células em condições fisiológicas é dependente da respiração mitocondrial, NADPH Oxidase (NOX), óxido nítrico sintase (NOS) desacoplado e xantina oxidoreductase (XOR).

A Figura 3 ilustra como o aumento dos níveis de EROs, sua produção em compartimentos celulares inadequados ou sua produção com formas defeituosas durante os processos oxidativos podem desencadear o desenvolvimento de inúmeras doenças crônico-degenerativas, levando a graves danos às biomacromoléculas (Chen et al., 2012; Gandhi e Abramov , 2012; Salehi et al., 2018).

Ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, podem ser danificados pela produção anormal de ERO, alterando assim, suas funções. Fontes endógenas de EROs são células inflamatórias, mitocôndrias e peroxissomos (SHARMA *et al.*, 2007). As células inflamatórias produzem ERO por redução do oxigênio molecular. Durante a reação em cadeia respiratória mitocondrial, a maior porcentagem de oxigênio é metabolizada em água, enquanto até 5% é convertido em ânion superóxido. Também pode ser produzida em outros processos, como na reação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, xantina oxidase, lipoxigenases e ciclooxigenases. As organelas que mais produzem peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos são os peroxissomos. Células inflamatórias, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, também produzem ERO por meio da reação NADPH oxidase (IVANOVA *et al.*, 2013).

A radiação ionizante e alguns agentes ambientais, substâncias químicas, bebidas alcoólica, alimentos, tabaco, agentes quimioterápicos e agentes infecciosos contribuem para a produção de EROs (SULLIVAN; CHANDEL, 2014). A radiação está envolvida em todos os estágios da carcinogênese e pode induzir apoptose e danos ao DNA. Os cigarros podem induzir lesões no DNA que levam ao câncer de pulmão, enquanto o consumo de álcool está relacionado ao câncer oral, de cabeça e pescoço. Em condições fisiológicas, as EROs, em concentrações mais baixas, têm papéis positivos em um organismo, como atuar como moléculas sinalizadoras no ciclo de crescimento celular, migração e diferenciação das células (BIRBEN *et al.*, 2012). Quando as concentrações de EROs atingem algum nível crítico, pode ocorrer apoptose. EROs estão envolvidos no processo de carcinogênese, que inclui iniciação, promoção, ativação de proto-oncogenes e inativação da estabilidade e genes supressores de tumor (TAFANI *et al.*, 2016).

Figura 4. O equilíbrio entre geração e eliminação de EROs permite que as células cancerosas permaneçam na faixa tumorigênica dos níveis de EROs (Adaptado de SULLIVAN; CHANDEL, 2014). SODs- Superóxido dismutases, NRF2- (fator nuclear derivado de eritróide 2), GSH/GPX- Glutaciona/ Glutaciona peroxidase, PRXs- Peroxiredoxinas.



A ativação da geração de EROs mitocondrial por oncogenes, mutações mitocondriais, hipóxia ou perda de supressor de tumor eleva a sinalização de ROS para aumentar a tumorigenicidade. As células tumorais também expressam níveis aumentados de proteínas antioxidantes que impedem o aumento de EROs de atingir níveis citotóxicos incompatíveis com o crescimento (figura 4) (SULLIVAN; CHANDEL, 2014).

Os sistemas de defesa antioxidantes no corpo humano mantêm o equilíbrio entre a produção e a neutralização de EROs e incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona S-transferase (GST), e glutaciona (GSH) (PAULSEN; CARROLL, 2013).

Consumo de Antioxidantes Como Reforço aos Sistemas Endógenos

Antioxidantes exógenos precisam ser suplementados continuamente através da dieta, uma vez que suas vias sintéticas geralmente estão presentes apenas em células microbianas ou vegetais. As vitaminas C e E apresentam efeitos antioxidantes proeminentes e, em consequência disto, pertencem à classe essencial de moléculas (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Tabela 1 Antioxidantes e como sua atividade é expressa quimicamente

ANTIOXIDANTE	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
ÁCIDO ASCÓRBICO (Vitamina C)	-Ânion superóxido, - 1O_2 - H_2O_2 -Peróxidos orgânicos - $\bullet OH$ -Ácido hipocloroso (HClO) (Kocot et al., 2017)
α-TOCOFEROL (Vitamina E)	-Membrana celular -Transferência de hidrogênio (Salehi et al., 2020b)
CAROTENÓIDES (Precursores da Vitamina A)	1O_2 (Banafsheh e Sirous, 2016)
POLIFENÓIS <ul style="list-style-type: none"> ▪ Flavonóides ▪ Ácidos fenólicos ▪ Estilbenos (resveratrol) ▪ Taninos ▪ Cumarinas ▪ Curcuminóides ▪ Lignanais 	Curcumina: -Sequestrante de ânions superóxido - H_2O_2 -Peróxidos lipídicos - $\bullet OH$ e vários RNS (Imam et al., 2017). -Aumento dos níveis celulares de GSH (Banafsheh e Sirous, 2016)
FLAVONÓIDES	-Ânion superóxido -Radicais peroxil - $\bullet OH$ - transferência de hidrogênio (HAT) -Íons metálicos (como ferro e cobre) -Bloqueio das reações do tipo Fenton (Salehi et al., 2019d)

<p><u>CATEQUINAS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Catequina ▪ Epicatequina ▪ Epigallocatequina ▪ Epicatequina galato ▪ Epigallocatequina galato 	<p>-Ânions superóxido -●OH -Íons metálicos (Imam et al., 2017; Roychoudhury et al., 2017).</p>
<p><u>ORGANOSSULFURADOS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ S-alil-mercaptopo cisteína ▪ S-alil cisteína ▪ Sulfeto de dialil ▪ Trissulfeto de dialil 	<p>-Eliminação de ROS -Inibição da peroxidação de lipídios (Borek, 2001; Miltonprabu et al., 2017).</p>

Na Tabela 1, estão representados e referenciados uma série de compostos com ação antioxidante de relevância para os seres humanos na manutenção do equilíbrio redox e em que espécies reativas atuam.

Vários minerais, em pequenas quantidades, também são essenciais para algumas atividades antioxidantes enzimáticas. Eles são, portanto, às vezes considerados como antioxidantes. Por exemplo, o selênio é um componente necessário do GPX (Battin e Brumaghim, 2009), enquanto o cobre, zinco e manganês são fundamentais para a atividade da SOD.

Tratamento do Câncer

As principais estratégias iniciais adotadas no tratamento do câncer são a ressecção cirúrgica de tumores sólidos localizados e a radioterapia para tumores em pacientes sem condições de receber abordagem terapêutica sistêmica ou possibilidades técnicas de ressecção completa. Com esses métodos, obtém-se a cura de cerca de um terço dos pacientes. Em casos onde há a ocorrência de micrometástases, a abordagem sistêmica com quimioterápicos se faz necessária (INCA, 2011). Estas indicações clássicas sofreram alterações significativas com a introdução do conceito de tratamentos adjuvantes e neoadjuvantes que têm sido desenvolvidos atualmente (SHIEN & IWATA, 2020).

As estratégias terapêuticas combinadas têm otimizado o tratamento dos pacientes no combate ao câncer, no entanto, ainda não atingiram resultados plenamente satisfatórios (PRIETO-VILA, 2017).

A crescente incidência do câncer na população é uma das razões que a torna um dos principais alvos de pesquisas para a compreensão dos processos fisiopatológicos e para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. A pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de novas drogas a partir de plantas medicinais têm sido fonte essencial para a obtenção de uma variedade de drogas para manutenção da saúde humana e, conseqüentemente, para o tratamento do câncer (NEWMAN & CRAGG, 2020).

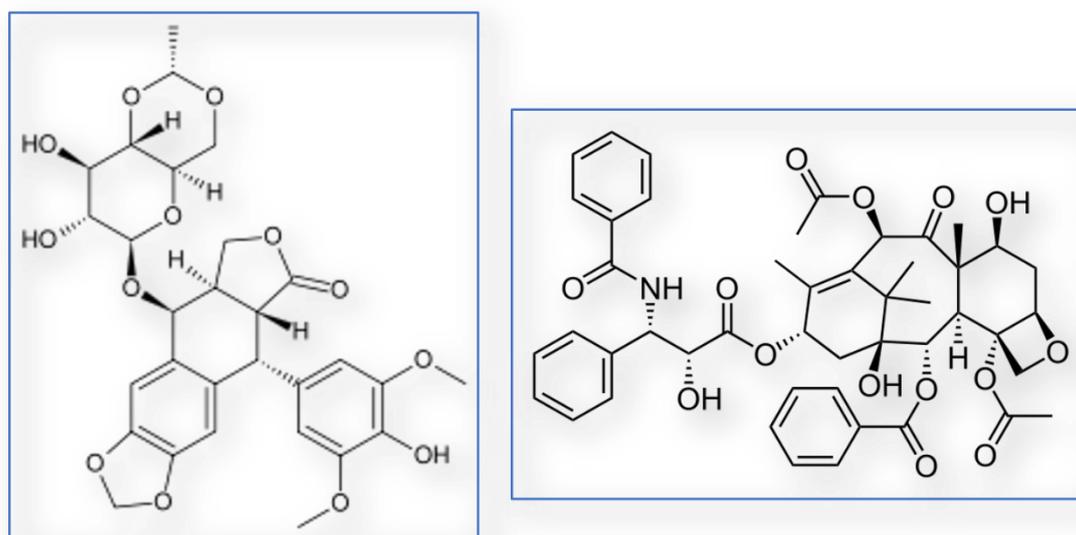
A obtenção de substâncias com propriedades farmacológicas é uma das aplicações mais antigas e consolidadas da biodiversidade. Diversos quimioterápicos utilizados frequentemente no tratamento de várias neoplasias são derivados de plantas, como os alcalóides da vinca (*Vinca rósea*), o etoposídeo isolado da raiz do podófilo (*Podophyllum peltatum*) e o taxol isolado de *Taxus brevifolia* e do teixo europeu (*Taxus baccata*) (CRAGG & NEWMAN, 2005; CRAGG *et al*, 2009).

O Brasil ocupa posição privilegiada em biodiversidade em todos os conceitos, possuindo a maior quantidade total de espécies catalogadas no mundo. Além disso, a facilidade de coleta, as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento e a diversidade estrutural de substâncias orgânicas oriundas das plantas brasileiras contribuem para estas se destacarem como a principal fonte renovável para o desenvolvimento de novos fármacos a serem usados no tratamento de diversas doenças, como o câncer (VALLI, RUSSO & BOLZANI, 2018; CALIXTO, 2019).

A pesquisa com produtos naturais tem sérias limitações, como tempo demorado para isolamento e caracterização dos compostos, elevado custo, baixo rendimento, ausência de efeito (ou especificidade) biológica, sazonalidade de plantas e controle de qualidade de ativos, dentre outros. Para contornar esses problemas, novas abordagens sustentáveis têm sido desenvolvidas, havendo um redirecionamento das metodologias de descoberta de medicamentos no mundo. Assim, a pesquisa de novos princípios ativos a partir de produtos naturais tomou novos caminhos com o aprimoramento dos processos químicos de semissíntese, síntese total e, mais recentemente, química combinatória (LAHLOU, 2013; ATANASOV ET AL., 2021).

Os processos químicos clássicos de semissíntese, por exemplo, são, sem dúvida, fontes importantes para obtenção de fármacos e suas estruturas análogas com propriedades químicas mais estáveis e farmacologicamente mais potentes e eficazes (CRAGG & NEWMAN, 2013; NEWMAN & CRAGG, 2020). Como exemplo, pode-se citar o caso do etoposídeo (figura 5), derivado semissintético da podofilotoxina, com atividade clínica no câncer de células germinativas, no câncer de pulmão de células não pequenas, nos linfomas de Hodgkin e não Hodgkin e no câncer gástrico (NORONHA ET AL., 2020; ECONOMIDES et al., 2019); e do paclitaxel (figura 5), cuja síntese total foi obtida em 1994 (NICOLAOU et al., 1994), com atividade significativa em uma ampla variedade de tumores sólidos, como câncer de ovário e câncer de mama avançado. A maioria das pequenas moléculas que foram aprovadas pelo FDA dos EUA como drogas anticâncer entre 1981 e 2014 foram derivadas de produtos naturais e eram em sua maioria derivados semissintéticos (NEWMAN & CRAGG, 2016).

Figura 5 Representação das estruturas químicas dos agentes anticâncer etoposídeo e paclitaxel e suas respectivas aplicações terapêuticas.



ETOPOSÍDEO

-câncer de pulmão de células não pequenas
-linfomas de Hodgkin e não Hodgkin
-câncer gástrico
(Noronha et al., 2020; Economides et al., 2019)

PACLITAXEL

Tumores sólidos:
-câncer de ovário
-câncer de mama avançado
(Nicolaou et al., 1994)

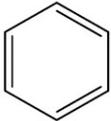
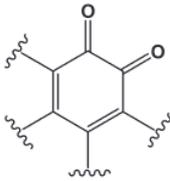
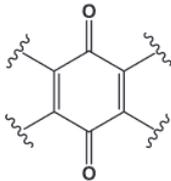
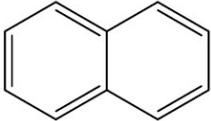
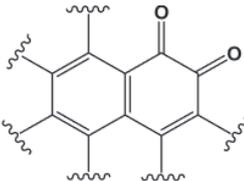
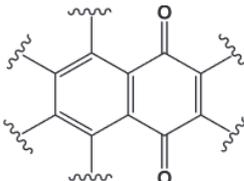
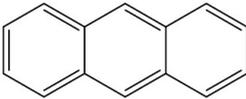
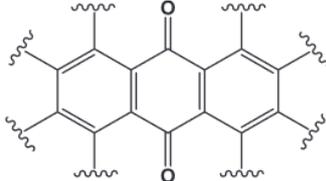
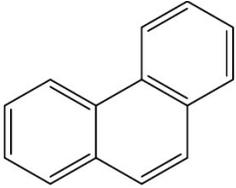
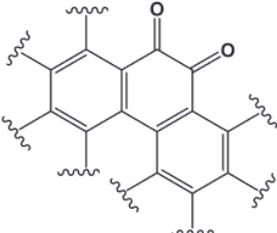
A doxorubicina, uma quinona de ocorrência natural, foi descrita inicialmente pela primeira vez em literatura em 1969, e embora encontrada naturalmente em bactérias do gênero *actino*, pode ser obtida a partir da transformação de daunorrubicina, por via de semissíntese, gerando um impacto positivo em seu rendimento em escala industrial, como mostram as autoras Martins-Teixeira e Carvalho (2020). Estas moléculas apresentam núcleo quinoidal e possuem capacidade de induzir morte celular por mecanismos variados, possuindo, assim, aplicação clínica na terapia anticâncer (Cappetta et al, 2017; Octavia et al. 2012).

Grupo Químico a Ser Estudado: Quinonas- Propriedades Físico-Químicas e Biológicas

As quinonas são dienonas cíclicas conjugadas e se apresentam como pigmentos biológicos encontrados em uma variedade de organismos vivos (bactérias, fungos, plantas superiores e em alguns animais) (CAMPOS-XOLALPA *et al.*, 2021). Esse grupo de moléculas pode apresentar aparência cristalina amarela, alaranjada ou vermelha, odor característico e baixa solubilidade em água, álcool, éter, éter de petróleo e álcalis (DEVI; MEHENDALE, 2014).

Com base na estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinoidal. Assim, são classificadas em benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico, antraquinonas - um anel antracênico linear e fenantraquinonas- um anel fenantrênico angular (Tabela 2) (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016).

Tabela 2 Classificação das quinonas quanto ao sistema aromático (Adaptada de SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016).

Grupo	Sistema Aromático	Estruturas Básicas	
Benzoquinonas	Anel benzênico 		
		<i>Orto-quinona</i>	<i>Para-quinona</i>
Naftoquinonas	Anel naftalênico 		
		<i>Orto-quinona</i>	<i>Para-quinona</i>
Antraquinonas	Anel antracênico 		
		<i>Para-quinona</i>	
Fenantraquinonas	Anel fenantrênico 		
		<i>Orto-quinona</i>	

No decorrer das pesquisas sobre o isolamento e determinação de estruturas de uma série de antibióticos e pigmentos, foi estabelecido que hidroquinonas são amplamente distribuídas na natureza. Compostos com propriedades terapêuticas valiosas também foram detectados entre moléculas sintéticas da mesma classe (TSIZIN; CHERNYAK, 1982). Desta forma, é sabido que quinonas orquestram e/ou medeiam uma ampla variedade de processos biológicos e químicos, incluindo o transporte de elétrons em muitos organismos vivos, processo desempenhado pela molécula ubiquinona (Martínez and Benito, 2005; El-Najjar et al., 2011); fotossíntese (plastoquinona e filoquinona) em plantas; metabolismo de estrogênios, catecolaminas, antioxidantes e congêneres de tocoferol- vitamina E

(AZZI, 2000); e a eliminação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos do organismo (Knecht; Goodale, 2013).

Lapachol e derivados: naftoquinonas com propriedades terapêuticas

O Brasil possui uma flora rica em diversidade biológica e, em particular, o bioma cerrado brasileiro contém plantas medicinais tropicais, com potencial para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos, com propriedades analgésicas, tranquilizantes, diuréticas, laxantes, antibióticas e antineoplásicas (SOUZA; FELFILI, 2006). Existem aproximadamente 46 tipos de madeira no Brasil sob a denominação de ipê (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Nas plantas da família *Bignoniaceae*, *Tabebuia avellanedae*, *T. serratifolia*, *T. heptaphyla*, *Zeyhera digitalis* e *Z. tuberculosa*, são encontradas naftoquinonas, além de outros compostos como flavonóides, lignanas, monoterpenos, triterpenos, ácidos cinâmicos e benzóicos (FONSECA *et al.* 2003, SILVA *et al.* 2003, HUSSAIN *et al.* 2007, SILVA 2009).

Os derivados das naftoquinonas podem apresentar potencial citotóxico e genotóxico pela interação com biomoléculas nucleofílicas, como tióis proteicos e não proteicos (glutaciona), e pela interferência na ação de enzimas celulares envolvidas no processo de proliferação celular (Klaus *et al.* 2010). O Lapachol é uma naftoquinona com várias propriedades biológicas relevantes (MARTIN-NAVARRO *et al.* 2010). No final do século 19, a conversão do lapachol em α -Lapachona e β -Lapachona por ciclização ácida foi descrita (SILVA *et al.* 2007). A β -Lapachona (3,4-dihidro-2, 2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona) é uma substância que apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e antirretroviral. Além disso, esse composto tem apresentado bons resultados em modelos de leucemia, no bloqueio da multiplicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), como terapia adjuvante na retinopatia proliferativa, como agente antipsoriático, e por possuir atividade esquistossomicida (PARDEE *et al.* 2002, AIRES *et al.* 2014). O Lapachol também tem sido descrito como inibidor da topoisomerase I do DNA, enzima que desempenha importante papel nos processos de replicação e empacotamento do DNA, desencadeando estudos sobre a ação antineoplásica da β LP em implantes de tumores de próstata, ovário e mama em camundongos, bem como em células humanas de cultivo *in vitro*, como próstata e pulmão (KUNG *et al.* 2014).

Quinonas como moduladores redox

Como exposto anteriormente, as quinonas despertam grande interesse farmacológico devido a suas propriedades de biooxidação-redução e à capacidade de catalisar processos biológicos de transferência de elétrons, gerando um ambiente de estresse oxidativo nas células (Silva *et al.*, 2002). Esse processo pode também ser decorrente da ação de agentes ambientais tóxicos sobre os seres vivos, como radiações ultravioleta e gama, ozônio e poluentes automotivos no ar, assim como de certas substâncias da cadeia alimentar e de produtos oriundos do tabagismo (MANISALIDIS *et al.*, 2020). Além disso, prevê-se que 1 a 2% do oxigênio consumido pelos mamíferos seja convertido a O_2^\bullet e H_2O_2 , devido a falhas fisiológicas na mitocôndria, permitindo que elétrons escapem sem que sejam transferidos pelo oxigênio (KAUSAR *et al.*, 2018).

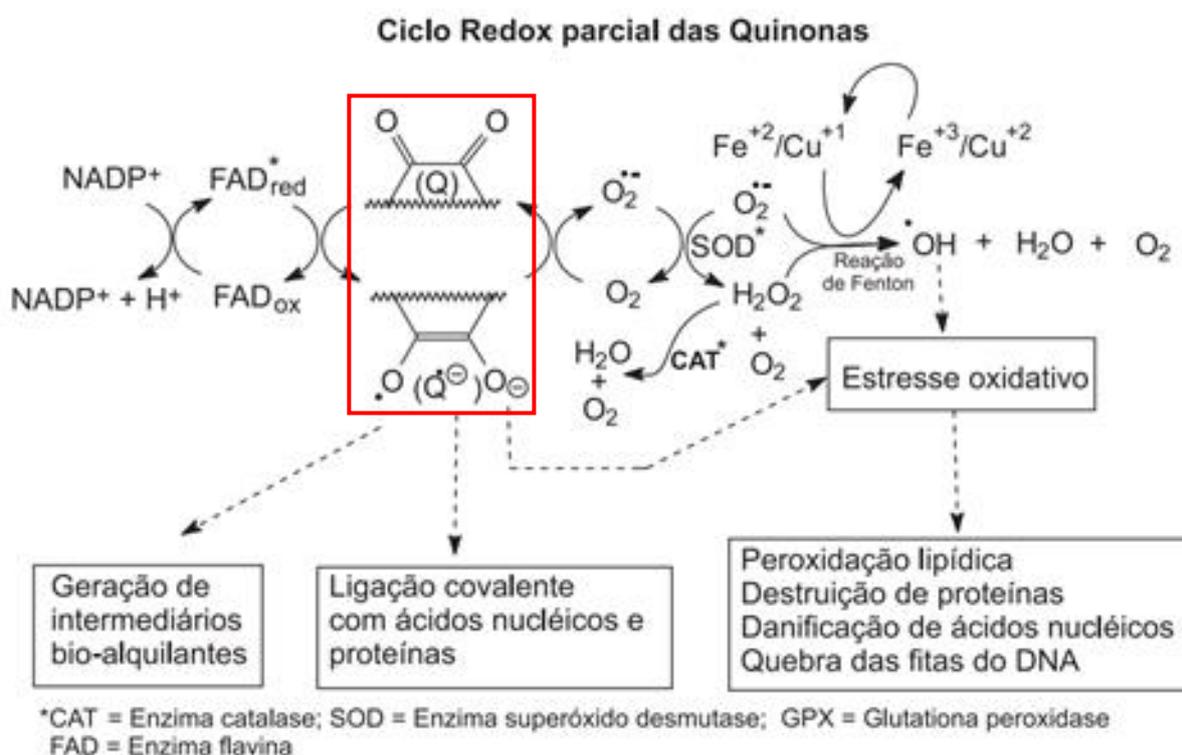
O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, resultante da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, conduz a um estado pró-oxidante que favorece o surgimento de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares que podem ocasionar a morte celular (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Mecanicamente, observa-se que a ação oxidativa das quinonas consiste na acomodação de dois elétrons e dois prótons para constituir sucessivamente um radical semiquinona aniônico ou neutro e uma hidroquinona. Os compostos que podem dar ou receber elétrons são muito variados e diferentes equilíbrios químicos poderiam ser gerados pela interação entre diferentes agentes oxidantes (como oxigênio molecular e quinona) e agentes redutores (como álcoois alcanos e até mesmo água), a fim de gerar espécies radicais bastante reativas. Por exemplo, a oxidação da hidroquinona por oxigênio molecular gera radicais de oxigênio que são o radical superóxido em sua forma neutra e o radical hidroxila, que pode causar degradação como estresse oxidativo ou reticulação de certos materiais. A natureza dos grupos substituintes, bem como o pH, a temperatura e o solvente definem concretamente o equilíbrio redox e as propriedades óxido-redutoras das quinonas (Bearnais-Barbry, 2001).

Foram realizadas várias pesquisas na área de doenças endêmicas em que se evidenciou a atividade tripanossomicida de quinonas. Tais estudos exploraram a capacidade das quinonas induzirem o estresse oxidativo conforme esboçado no

esquema abaixo, que apresenta resumidamente as etapas bioquímicas deste processo, concebidas por diversos autores nos últimos 30 anos (Silva *et al.*, 2002; CRUZ, 2017).

Figura 6 Ciclo redox induzido por quinonas (Silva e colaboradores, 2002).



No esquema acima (Figura 6), sob ação enzimática, a quinona é reduzida com um elétron para a formação do ânion semiquinona ($\text{Q}^{\bullet-}$), sob a catálise das enzimas flavinas NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase. A espécie semiquinona $\text{Q}^{\bullet-}$ reduzirá o oxigênio molecular ao ânion-radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que, na presença da enzima superóxido desmutase, é transformado em H_2O_2 . Este ânion-radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), por catálise com metais de transição (reação de Fenton), ou por reação com H_2O_2 (reação de Harber-Weiss), origina HO^\bullet intracelular. Embora o H_2O_2 não seja considerado um radical livre, é uma substância bastante

reativa, podendo assim promover também a oxidação de algumas biomoléculas. Sumariamente, HO• e H₂O₂ são estimadas as principais espécies responsáveis pelo estresse oxidativo celular (Barbosa *et al.* 2010).

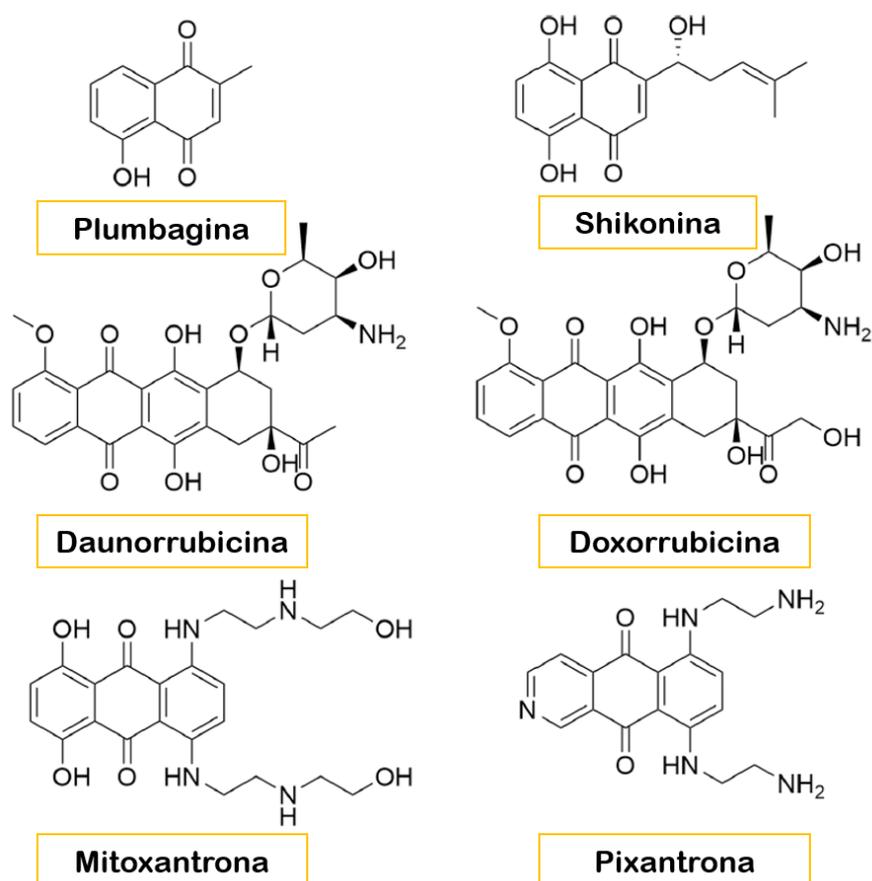
Na tentativa de eliminar estas espécies oxidantes, as células executam ações de desintoxicação, através mecanismos antioxidantes intracelulares. O controle eficiente do estresse oxidativo vai resultar dos níveis dos agentes intracelulares antioxidantes, como α -tocoferol, vitamina C, catalase (CAT), enzima superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona redutase (GSH). Em sistemas onde ocorre uma continuidade do ciclo redox, ou faltam mecanismos defesa, há acréscimo intracelular dos oxidantes (O₂•), e H₂O₂, com consequente dano a componentes celulares primordiais como as membranas, através da peroxidação lipídica e a diminuição do potencial antioxidante celular, podendo gerar danos permanentes ou não, como por exemplo, a nível genômico (CHAVEZ *et al.*, 2019). Esta cascata pode levar a consequências antagônicas, por alteração do sinal para a transcrição de genes, mutagenicidade e/ou por ativação de fatores responsáveis pela indução apoptótica (Flowers *et al.*, 1997; da Silva *et al.*, 2003).

Beckman e Ames (1997) estimaram que a degradação do DNA por HO• pode levar à formação de, aproximadamente, 150.000 subprodutos por célula, resultantes de sua ligação ao DNA seguida de clivagem em diversos pontos da cadeia. Calcula-se que o estresse oxidativo seja o responsável por uma parcela considerável dos cânceres humanos (Panis *et al.*, 2021), além de doenças neurodegenerativas (ALVES; ABREU, 2021), cardiovasculares (PEOPLES *et al.*, 2019), diabetes *mellitus* (IGHODARO, 2018), entre outras patologias. A adição do radical hidroxila (HO•) na dupla hélice do DNA ocorre rapidamente, havendo quebra em uma ou duas fitas. A reação ocorre no nível das bases nitrogenadas, que sãoceptoras de radicais ou nas unidades de carboidratos, resultando em quebra da ligação N-glicosídica (Liu, Zai-Qun, 2019). Embora ainda não tenha tido todas as suas etapas completamente elucidadas, o ciclo redox segue sendo a estratégia atual de que se valem muitos farmacologistas para obtenção de conhecimentos sobre o desempenho citotóxico das naftoquinonas.

De maneira sintética, uma série de processos de importância crucial para as células, como a ativação da cascata de apoptose e os danos provocados pelo estresse oxidativo figuram entre os principais efeitos que as quinonas provocam em sistemas biológicos. Aparentemente, as espécies O₂•- e

H₂O₂ estão sendo consideradas como dois importantes sinais reguladores de condições intracelulares. Acredita-se que o aumento de suas concentrações (uma situação mais oxidante) incentive o processo de apoptose (Pereyra *et al.*, 2019).

Figura 7 Quinonas biologicamente ativas e de atividade descrita em literatura.



Ao relacionar o potencial citotóxico de quinonas naturais e sintéticas, em apanhado acadêmico, encontra-se uma variedade de moléculas com esqueleto da 1,4-naftoquinona, um derivado do naftaleno contendo dois átomos de oxigênio carbonil. Esta é a isoforma de naftoquinonas mais estável e amplamente relatada. A significância farmacológica do núcleo de 1,4-naftoquinona está bem estabelecida (QIU *et al.*, 2017; JALI *et al.*, 2018) e inclusive já existem moléculas com mecanismos bem delineados, como os mecanismos envolvendo vias relacionadas a ROS, como PI3K-mTOR, Cdc25 fosfatase, NF-κB, EGFR, receptor tirosina quinase (RTK), proteína quinase ativada por AMP e proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (TANDON;

KUMAR, 2013). A Figura 7, para fins de demonstração, ilustra naftoquinonas de potencial antiproliferativo já explorado, algumas inclusive já utilizadas na prática clínica.

O efeito indutor de ROS das naftoquinonas e as vias relacionadas ao estresse oxidativo podem provocar danos ou alterações nas proteínas, lipídios, RNA e DNA. Entre os compostos com estrutura de naftoquinona, a porção quinona é conhecida como redox do ciclo celular, isto é, um precursor de espécies ROS que levam ao estresse oxidativo, causado pela perda do equilíbrio pró-oxidante / antioxidante (ARMENDÁRIZ-VIDALES *et al.* 2014).

Além das quinonas, existe uma infinidade de outros compostos de origem natural ou não com atividades biológicas diversas. A química medicinal vem empenhando esforços em desenvolver moléculas cada vez mais eficientes, com propriedades químicas melhoradas, rotas sintéticas simplificadas e de interesse farmacológico. Com a finalidade de desenvolver estratégias cada vez mais eficazes do ponto de vista biológico, a hibridização de compostos com atividades semelhantes, tem sido explorada na intenção de obter-se compostos mais eficientes e de mecanismos de ação múltiplos e inovadores (Decker, 2011). No presente trabalho, especulou-se não somente sobre a atividade de quinonas, mas dessas moléculas hibridizadas com triazóis, uma extensiva classe de compostos com atividade terapêutica de relevância farmacológica.

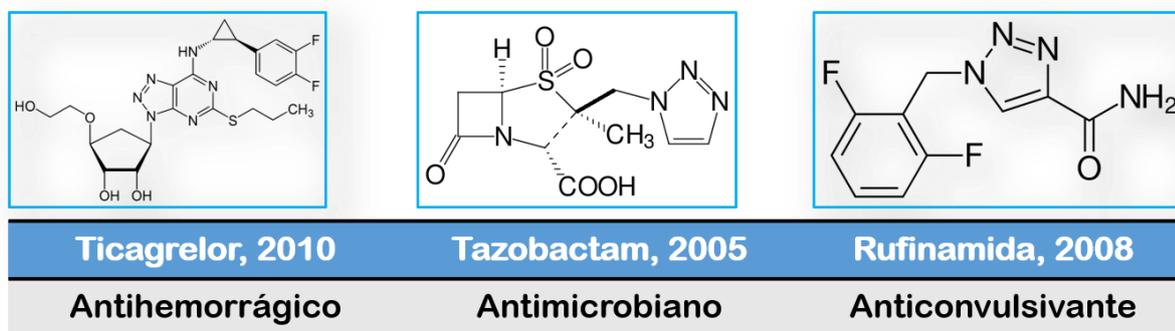
Atividade farmacológica de 1,2,3 Triazóis

Os heterociclos baseados em 1,2,3-triazol são relatados como possuidores de vários potenciais medicinais e biológicos, como atividades anticâncer, antivirais, antimicrobianas, herbicidas, antiinflamatórias cardiovasculares e inibitórias da tirosinase (Dheer *et al.*, 2017). Algumas propriedades como tendência de fazer ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações de empilhamento π de compostos triazólicos, bem como sua semelhança com ligações amida em termos de distância e planaridade, elevaram a significância de 1,2,3 -triazóis no campo da química medicinal, pois favorecem intensamente a ligação com alvos biomoleculares (Gholampour *et al.*, 2019).

Alguns triazóis de importância clínica estão citados na Figura 8. Ao longo dos anos 2000 alguns medicamentos detentores desta estrutura foram aprovados para uso e perduram até os dias atuais com grande contribuição para a terapêutica de uma série de condições de saúde. O ticagrelor, um antitrombótico, hoje comercializado sob o nome de referência Brilinta® no Brasil, tem contribuído com um mecanismo de ação inovador, além de boa eficácia no que se propõe, além de boa adesão terapêutica, por ser administrado por via oral, além de apresentar maior segurança do que as heparinas injetáveis; Tazobactam, um betalactâmico inicialmente associado à Piperacilina (associação comercializada e bastante utilizada nos dias atuais), hoje é associado à Ceftolozane e comercializado sob o rótulo de Zerbaxa® e tem auxiliado no combate a microorganismos multirresistentes. Já a Rufinamida tem sido medicamento de escolha em associação para tratamento da síndrome de Lennox-Gastaut e outros eventos convulsivantes. A partir deste panorama, é visível o quanto as moléculas triazólicas ainda têm potencial para contribuir com a emergência de um novo arsenal com as mais variadas funções terapêuticas.

Demonstrada a variedade biológica de triazóis e quinonas nesta sessão, no intuito de somar as atividades biológicas destas duas classes de compostos, a ideia de hibridizá-las por meio de reações *click* de cicloadição azida-alcino (Figura 9) surge como uma possibilidade prática e versátil para o processo de síntese química.

Figura 8 Triazóis: moléculas recém aprovadas para uso clínico- (Adaptado de Jiang et al., 2019).



A Química *Click*

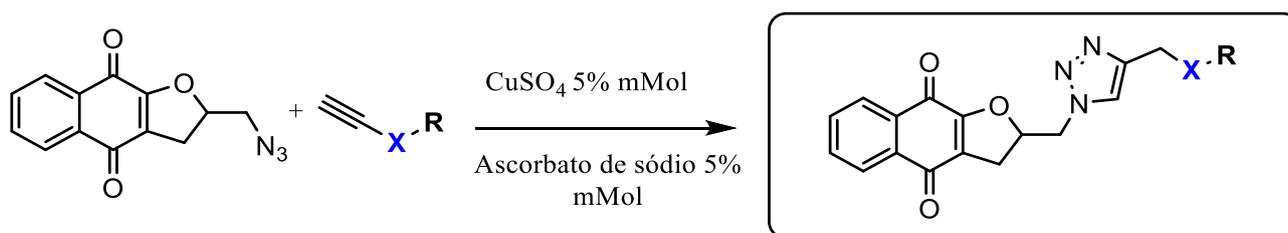
“Química *click*” é um termo que foi proposto pela primeira vez por Sharpless e colaboradores, em 2001. As características da química *click* incluem alto rendimento, amplo escopo, subprodutos menos citotóxicos, alta estereoespecificidade e reações simples (Kolb et al., 2001; Takayama et al., 2019)

A química *click* de ciclo-adição azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC) demonstra inúmeras vantagens sobre os métodos convencionalmente utilizados para a preparação de derivados de 1,2,3-triazol, incluindo excelente compatibilidade entre os grupos funcionais (Kolb & Sharpless, 2001, 2003; Jiang et al., 2019).

A reação "*CLICK*" na síntese de Quinonas acopladas a 1,2,3-Triazóis com um núcleo selenoidal

O 1,4-substituído-1,2,3-triazol (estrutura ilustrada na Figura 10) tem múltiplos papéis nas moléculas bioativas: como elemento farmacofórico básico, participa da formação de pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas; como estrutura molecular, regula outros elementos farmacofóricos para manter uma conformação ativa; como um grupo de conexão, ele liga moléculas ou sondas conjugadas. Conseqüentemente, a reação CuAAC tornou-se uma reação privilegiada na caixa de ferramentas dos químicos, permitindo fácil geração quimio e regioespecífica de bibliotecas de produtos e bioconjugados de 1,4-substituído-1,2,3-triazol. Além disso, a reação *in situ* CuAAC pode potencialmente ser usada para triagem de inibidores enzimáticos específicos ou biomarcadores contendo 1,2,3-triazóis substituídos nas posições 1,4 (Wang *et al.*, 2016).

Figura 9. Reação de formação do 1,4-substituído-1,2,3-triazol



Relatos em literatura demonstram que os híbridos de 1,4-naftoquinona e triazol apresentaram uma série de atividades biológicas, incluindo antimicobacteriana (Devi Bala *et al.*, 2014), anti-Trypanosoma cruzi (da Silva *et al.*, 2012), antileishmania (Guimarães *et al.*, 2013) e antimalárica (Brandão *et al.*, 2018). Os primeiros estudos de híbridos de 1,4-naftoquinona-1,2,3-triazol, considerados agentes anticâncer, foram relatados pelo Grupo do professor Oliveira. Entre os derivados testados, dois compostos demonstraram relevante atividade citotóxica em células K562 e HL-60. De acordo com os achados, constatou-se que a citotoxicidade é mediada por apoptose em células HL-60 e parada do ciclo celular em fase S na linhagem celular K562 (Nascimento *et al.*, 2011).

Inclusão de Sistemas Antioxidantes

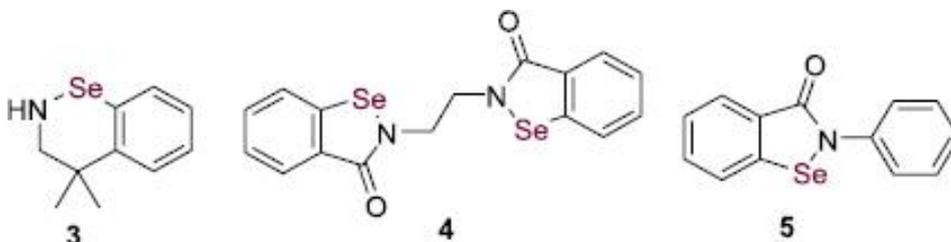
Como já descrito anteriormente, a atividade oxidativa tem sido explorada como importante alvo farmacológico para uma série de moléculas com a atividade antitumoral. Contudo, a geração de espécies reativas em excesso pode acabar prejudicando o desempenho destas moléculas, atingindo células saudáveis e interferindo em seu desempenho no quesito seletividade (ZAIDIEH *et al.*, 2019). Desta forma, a tese sobre a obtenção de moléculas com o incremento de sistemas antioxidantes vem ganhando espaço com foco na modulação da geração de espécies oxidativas, tendo em vista a melhora da atividade através da modulação da produção de radicais livres (XIA *et al.*, 2017).

Em 2007, Halliwell já vinha teorizando sobre o conceito de antioxidantes-“qualquer substância que atrasa, previne ou remove dano oxidativo a uma molécula alvo”- e a possibilidade de modulação do estresse oxidativo através da presença destes sistemas antioxidantes dentro das próprias moléculas (HALLIWELL *et al.*, 2015).

Compostos selenóides têm sido amplamente estudados por sua variedade de efeitos farmacológicos já bem descritos em literatura, como atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora e terapêutica, além de ação benéfica em modelos de Alzheimer e Parkinson (Nogueira *et al.*, 2004; Uzma *et al.*, 2011). Atribui-se essas propriedades principalmente à capacidade desses compostos de

equilibrar o sistema redox, através da mimetização da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPX) (Zhou *et al.*,2018).

Figura 10. Estruturas de compostos organoselênio.



O perfil biológico dos compostos de selênio está estabelecido e seu uso como moléculas bioativas está emergindo como um campo de pesquisa ainda mais atraente. O seleneto ALT2074 (Figura10, Estrutura 3) foi identificado como um imitador da glutathione peroxidase (GPx), capaz de prevenir alterações endoteliais e lesão de isquemia-reperfusão miocárdica (Assaf *et al.*, 2007). Além disso, o ethaselen (Figura 10, Estrutura 4) está na fase II dos ensaios clínicos para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas com superexpressão de tioredoxina redutase (TrxR) (Wang *et al.*, 2011). Um dos compostos de organoselênio mais importantes é o ebselen (Figura 10 Estrutura 5), que exibe atividade redutora de hidroperóxido e peroxinitrito, atuando como mimético da enzima glutathione peroxidase e peroxirredoxina (Sies *et al.*, 2020).

Somadas as vantagens terapêuticas dos dois grupos químicos, o presente trabalho vem inovando com a proposta de acrescentar a estas novas moléculas um calcogênio (precursor antioxidante) que atuaria formando dentro da própria estrutura um sistema antioxidante modulador da produção de radicais livres.

JUSTIFICATIVA

A taxa de mortalidade associada às formas mais comuns de câncer ainda é extremamente alta. Os quimioterápicos atualmente empregados na prática oncológica são pouco específicos e propensos à toxicidade sistêmica e ao desenvolvimento de resistência tumoral. Além disso, sua baixa seletividade torna necessária a busca por novos compostos com ação mais seletiva e menos efeitos colaterais. Portanto, a pesquisa por novos agentes anticâncer é necessária ao enfrentamento dessa doença, cuja incidência deve aumentar nos próximos anos.

Nos últimos anos intensificou-se o interesse por compostos da classe das quinonas, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos. Quinonas têm sido aprovadas para a terapia clínica anticâncer com bons resultados e seletividade adequada. Esses compostos atuam sobre o alvo NAD(P)H quinona desidrogenase 1 (NQO1), cujo nível de expressão é mais elevado em determinados tipos de câncer em relação a células normais, explicando a seletividade das quinonas por esses tumores. Em geral, as quinonas anticâncer são pró-fármacos que originam agentes alquilantes, geradores de espécies reativas de oxigênio ou inibidores específicos de outras proteínas após conversão pela NQO1. O estudo de moléculas dessa classe é promissor para a geração de compostos líderes no desenvolvimento de quimioterápicos mais potentes e seletivos.

Somando-se as atividades antitumorais de potentes quinonas a triazóis com o incremento de calcogênios (Se ou S), espera-se obter moléculas inéditas de potencial antiproliferativo farmacologicamente relevante.

Além do supracitado, o projeto visou possibilitar a formação e otimização de recursos humanos, promover a interdisciplinaridade e colaboração entre universidades brasileiras, bem como a importação de novos métodos através da internacionalização de docentes e discentes.

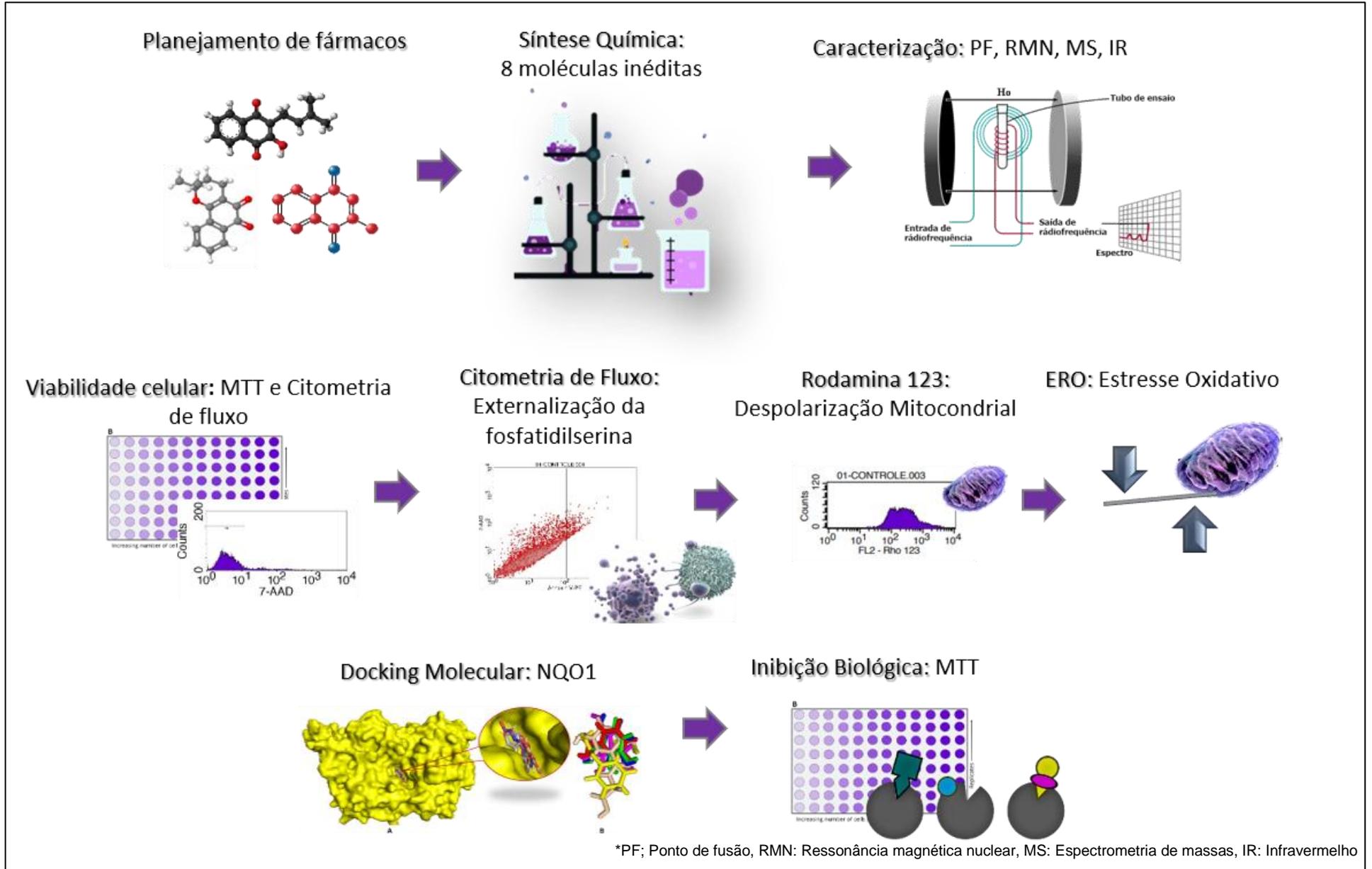
OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi a obtenção semissintética de derivados triazólicos de α -lapachona inéditos, com núcleo selenóide, visando identificar compostos mais efetivos e seletivos com potencial antitumoral quando comparados a α -Lapachona e Nor- β -Lapachona e elucidar as possíveis vias que envolvem seu mecanismo de ação e morte celular.

Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver a síntese dos derivados triazólicos de α -lapachona inéditos.
- ✓ Elucidar a estrutura dos compostos sintetizados por meio da espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C).
- ✓ Avaliação e comparação da atividade antiproliferativa de naftoquinonas derivadas da α e Nor- β -Lapachona em células tumorais humanas e células normais murinas utilizando o ensaio do MTT;
- ✓ Avaliar preliminarmente a afinidade entre as amostras e a enzima NQO1 *in silico* através do ensaio de *Docking* Molecular
- ✓ Avaliar indiretamente a modulação da atividade antiproliferativa das naftoquinonas mais citotóxicas após pré-tratamento de células HCT-116 com dicumarol, um potente inibidor da enzima NQO1
 - Avaliar os prováveis mecanismos de ação responsáveis pela atividade antiproliferativa da molécula com maior potencial citotóxico por meio de citometria de fluxo utilizando células de câncer de cólon (HCT-116).
 - Investigar a capacidade dos compostos mais citotóxicos de modular a produção das espécies reativas de oxigênio em células tumorais de câncer colorretal; linhagem HCT-116.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



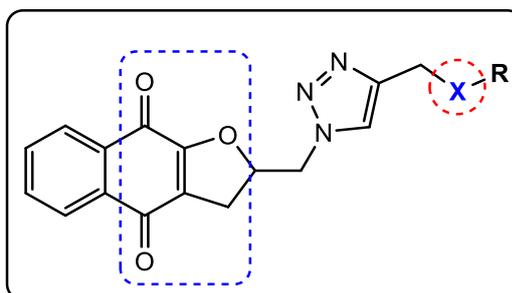
MÉTODOS

Síntese Química

Síntese de compostos naftoquinoidais 1,2,3-triazólicos com a presença dos calcogênios selênio e enxofre

Foi planejado um grupo de compostos contendo dois centros redox (Figura 11), visando a obtenção de compostos inéditos com potencial e seletiva atividade citotóxica contra células tumorais. Assim, as substâncias aqui propostas, foram desenhadas a fim de avaliar a capacidade antitumoral de naftoquinonas 1,2,3-triazólicas contendo os calcogênios selênio e enxofre, como prováveis moduladores redox efetivos.

Figura 11 Produto final das reações *click*, onde X é um calcogênio (Selênio ou enxofre) e R cadeias aromáticas ou alifáticas



Química *Click*

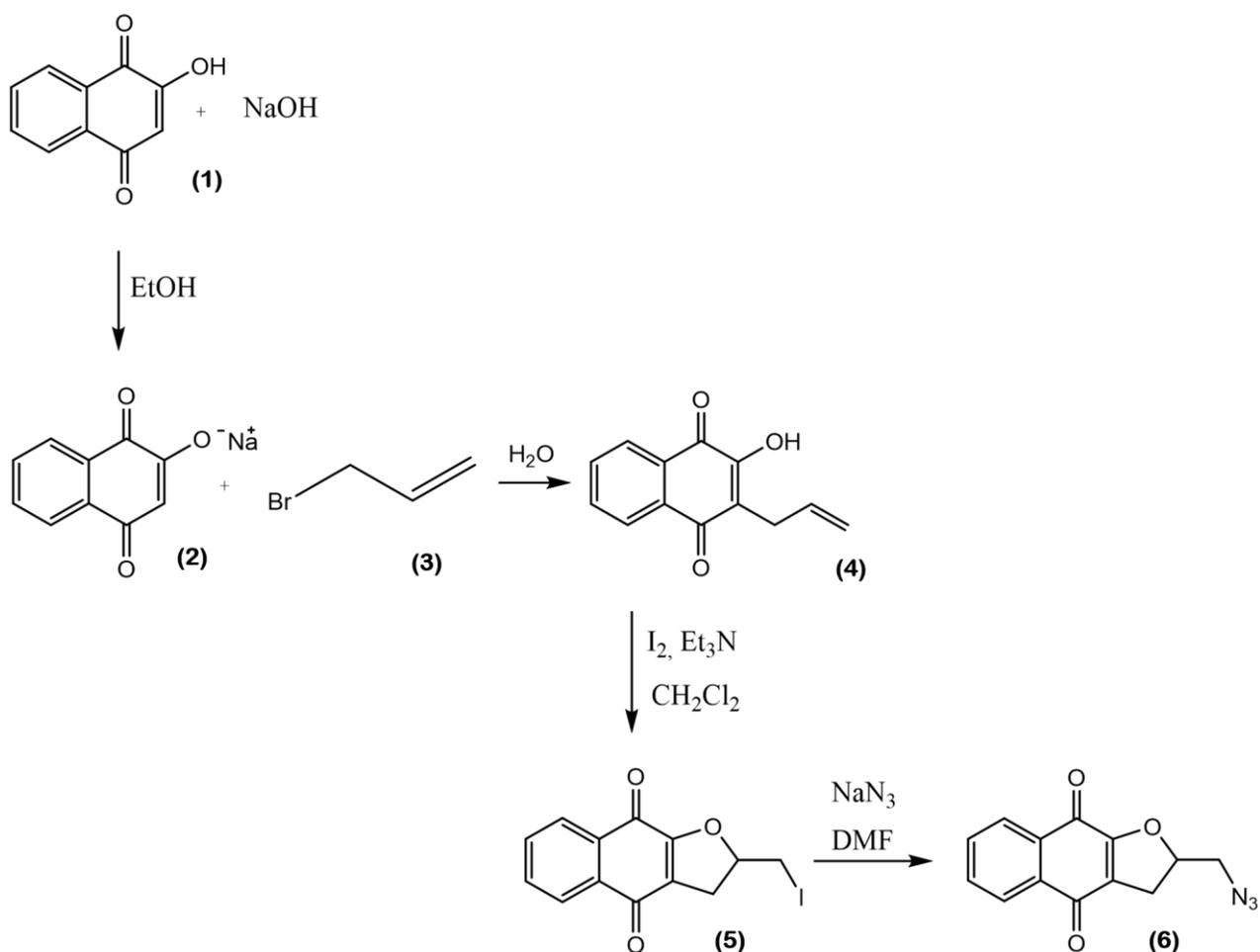
A expressão “**química *click***” conceitua reações termodinamicamente favoráveis que, realizadas em laboratório, são capazes de conectar duas moléculas (neste caso, quinonas e triazóis) de forma muito simples e com altos rendimentos, sendo de grande aplicabilidade (Sharpless *et al.*, 2001).

Síntese dos intermediários naftoquinoidais

Para elaborar um dos produtos intermediários (azida), a 2-Hidroxi-1,4-naftoquinona, uma lausona de ocorrência natural, foi realizado um processo de ciclização e, após esta, uma reação de substituição nucleofílica com azida de sódio,

originando furanonaftoquinonas com carbonilas em posição *orto* e *para*, sendo esta última, o produto de interesse, 3-Azido-C-Alil-Para para a produção das moléculas finais via reações *click* (Figura 11).

Figura 12. Rota sintética para a obtenção da 3-Azido- C-Alil- Para.

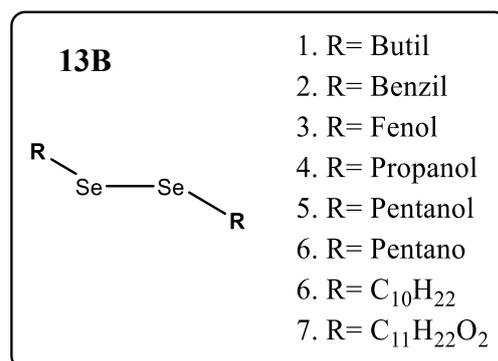
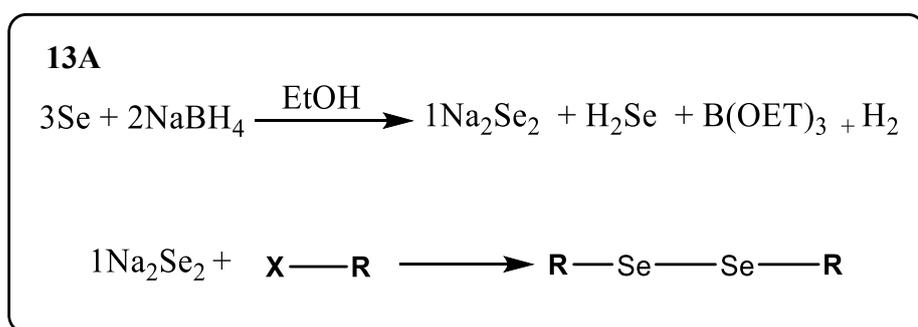


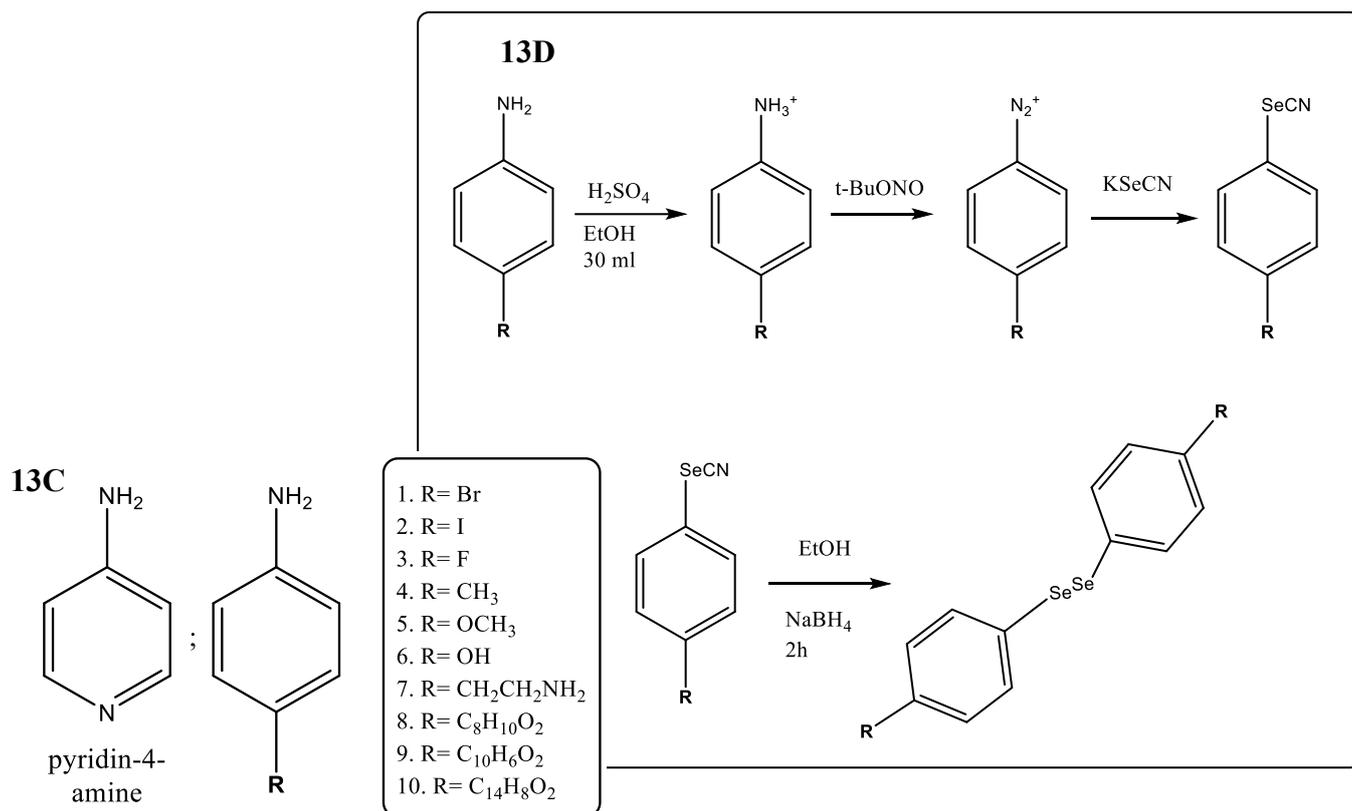
Em um primeiro momento, a lausona (1) é desprotonada com hidróxido de sódio em etanol, depois precipitado em éter, formando um sal da lausona (2). Nessa reação, é possível verificar o produto na forma de um sólido avermelhado. A seguir, promove-se a alilação, com a adição do brometo de alila (3). Foi realizada a purificação da C-alil-lausona (4) por meio de coluna cromatográfica com um gradiente de acetato de etila em hexano como fase móvel e obtida como um sólido amarelo com aproximadamente 70% de rendimento. A partir da ciclização da C-alil-lausona foram obtidos os derivados furanonaftoquinônicos. A reação é feita com iodo e trietilamina,

em diclorometano, formando os produtos com carbonilas em posição *orto* e *para* (sendo esta última o produto de interesse, a mesma encontra-se representada como a última molécula da reação acima). Seguiu-se a separação dos produtos por coluna cromatográfica. Os produtos foram caracterizados por RMN de ^1H de acordo com a literatura. A porção *para* foi separada e por fim foi realizada a reação de substituição com azida de sódio em DMF. Após 24 horas de reação, a mistura foi submetida à extração com acetato de etila, resultando no produto puro.

Alcinos acoplados ao selênio foram preparados por meio de duas vias: produção direta de disselenetos via reações $\text{S}_\text{N}2$, quando utilizadas cadeias alifáticas (Figura 13 A) com os grupos substituintes descritos na Figura 13B, e utilizando-se selenocianatos intermediários com posterior conversão em disselenetos, quando utilizadas moléculas aromáticas (Figura 13 D), com os grupos substituintes descritos na Figura 13C. Após o preparo dos disselenetos, devido a sua baixa estabilidade, realizou-se sua quebra seguida imediatamente da conversão em alcinos. Novamente, devido à baixa estabilidade dos alcinos, seguiu-se as reações *click* com o composto 3-Azido- C-Alil-Para, reação representada na Figura 14.

Figura 13. A. Rota sintética de disselenetos via $\text{S}_\text{N}2$, onde X é um bom grupo abandonador (halogênios) e R é uma cadeia alifática. B. Grupos substituintes testados para esta rota sintética D. Rota sintética de disselenetos a partir de selenocianatos aromáticos, onde R são grupamentos diversos, oriundos de disselenetos representados em C.





É importante observar que, como os disselenetos de 4-clorofenil, 4-nitrofenil, difenil e dissulfeto de fenil já são bem descritos em literatura e estão comercialmente disponíveis (Figura 14), foram realizados apenas os procedimentos de quebra dos disselenetos para a sequência do preparo dos alcinos.

Figura 14. Disselenetos comerciais.

DISSELENETOS DE USO COMERCIAL

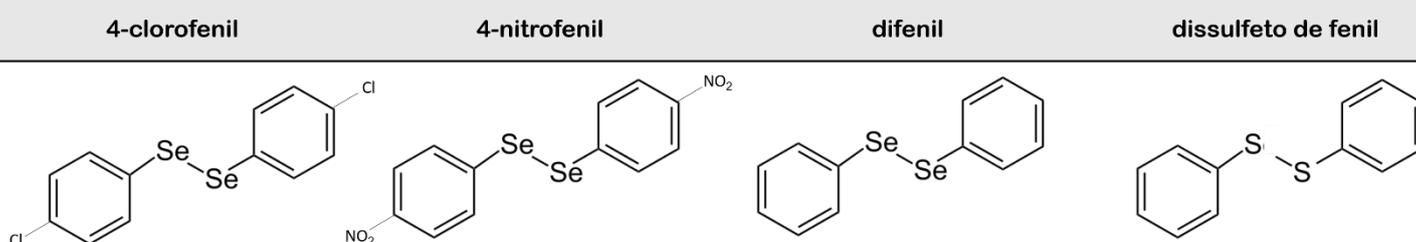
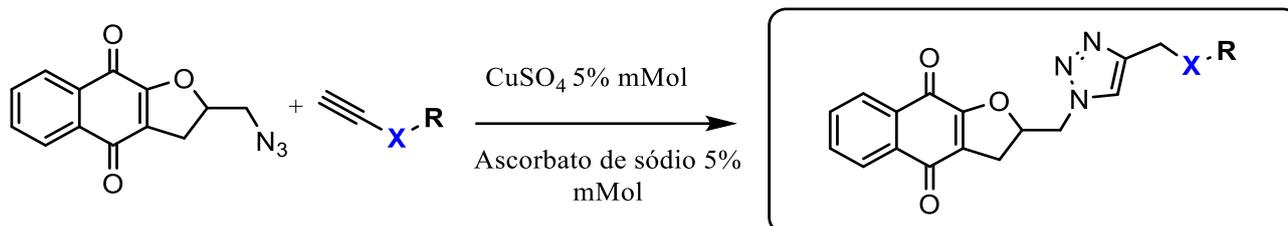


Figura 15. Reação *Click* entre 3-Azido- C-Alil- Para e calcogenoalcinos na presença de catalisador de cobre.



A etapa seguinte foi a reação entre 3-Azido- C-Alil- Para e calcogenoalcinos, catalisada por sulfato de cobre e ascorbato de sódio (5% mMol, respectivamente) (Figura 15).

Caracterização das Moléculas Sintetizadas

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN) foram obtidos usando um espectrômetro Bruker DRX 400 ou Bruker AVANCE 400. Os espectros de ^{13}C foram registrados a 100 MHz conforme indicado. Os deslocamentos químicos (Δ) são dados em partes por milhão (ppm). Os sinais são descritos como singuletos (s), dupletos (d), duplete duplos (dd), tripletos (t), tripleto de dupletos (td), quartetos (q), quintetos e multipletos (m). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram referenciados ao sinal de solvente residual apropriado ou sinal de tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamento (J) foram cotadas com aproximação de 0,5 Hz.

Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum One FTIR como filmes finos ou sólidos comprimidos em uma placa de diamante. As bandas de IR são descritas pelo número de onda 21 (v^- , cm^{-1}).

Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

As amostras sintetizadas para este trabalho passaram pelo teste de espectrometria de massas encomendado ao centro analítico de instrumentação da Universidade de São Paulo (USP). Os espectros de massa foram registrados usando um Brüker Daltonics micrOTOF-Q II (modo APPI + e ESI +), de alta resolução. Todas as amostras foram enviadas em pó e testadas pelo método de infusão direta.

Ponto de Fusão (PF)

Os pontos de fusão foram mensurados no aparelho de Fisher Johns. Foram realizadas três medições das amostras em pó, com o uso de um capilar e observado o início da mudança de fase de cada amostra. Após o processo, foram calculadas as médias das medidas.

Estudo da Atividade Biológica

Avaliação do Potencial Antiproliferativo

Viabilidade Celular

Análise da Citotoxicidade Pelo Método do MTT

A citotoxicidade dos compostos sintetizados foi avaliada utilizando o método do MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-*H*-brometo de tetrazólio], descrito por Mosmann (1983). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria das células viáveis, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas. Foram estabelecidas as CI_{50} nas linhagens celulares HCT-116 (côlon – humana), PC3 (próstata – humana), HL60 (leucemia – humana), SNB-19 (glioblastoma- humano), e L929 (linhagem murina de células fibroblásticas normais), obtidas por meio de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). Foram estabelecidas CI_{50} nos tempos de incubação de 24h, 48h e 72h.

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células

em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10 a 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), sendo incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio invertido a cada 24 horas.

Após a obtenção de todos os resultados, os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Foi plotado um gráfico determinando as suas CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism versão 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma importante ferramenta para o estudo das células em seus aspectos morfológicos. No citômetro, as células são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida, em que, ao interceptar o feixe de luz, proveniente de um laser, causam sua dispersão em várias direções dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e da densidade óptica de cada célula. A detecção de um feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionada com o tamanho celular, que se dá por dispersão linear (FSC, Forward Scatter), enquanto que a captação de um desvio ortogonal está relacionada com a complexidade da célula, em particular sua granulosidade, que ocorre por dispersão lateral (SSC, Side Scatter). Quando analisados conjuntamente esses parâmetros levam a uma noção da morfologia celular. Além disso, é capaz de detectar a fluorescência emitida por marcadores utilizados, classificando cada célula como um evento. (SHAPIRO, 1995; FERRAZ, 2000).

Para os experimentos realizados no citômetro de fluxo, as células HCT-116 foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de $0,5 \times 10^5$ células/mL (50.000 células/ poço). Os tratamentos com o composto ENSJ670 seguiram concentrações e tempos de incubação descritos em cada método. A Nor-β-Lapachona (10 μM) foi utilizada como controle positivo, para fins comparativos, no quesito estrutura-atividade. Após transcorrido o tempo de tratamento, as células foram transferidas para microyubos e centrifugadas a 1800rpm por 5 minutos. O

sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de PBS com 2% SBF e 1mM EDTA.

As células foram analisadas utilizando os citômetros FACSVerse®(UFC-NPDM), para análises de espécies reativas de oxigênio (ROS), e FACSCalibur®(UFC- Departamento de Farmácia), para as demais análises. Um total de 10.000 eventos, por replicata de amostra, foi adquirido. Cada ensaio foi realizado em triplicata, em geral, de três experimentos independentes.

A análise dos dados da citometria de fluxo foi feita com base na média \pm erro padrão da média. Para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett, com nível de significância mínimo de 5% ($p < 0,05$).

Avaliação da integridade da membrana, do número de células e da morfologia celular

A partir do conhecimento de que as naftoquinonas podem atuar afetando a função mitocondrial celular, com o objetivo de sanar a limitação do ensaio do MTT, que atua através da medida da capacidade funcional mitocondrial e evitar dados falso-positivos, utilizou-se o ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo para corroborar os dados encontrados nos testes anteriores.

O método de verificação do *status* de integridade da membrana foi baseado na capacidade do corante fluorescente, Iodeto de Propídeo (PI), de se ligar ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida. As células foram consideradas em apoptose tardia ou necrose quando marcadas pelo corante e por emitirem elevada fluorescência vermelha, quando excitadas pelo laser. Já as células com membrana íntegra foram consideradas viáveis quando emitiam baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Os tratamentos com o composto ENS670 seguiram tempos de incubação de 24 horas e concentrações de 0,85 μ M; 1,70 μ M e 3,5 μ M.

Após a ressuspensão das células em 1mL de PBS com 2% SBF, 1mM EDTA (descrito anteriormente), uma alíquota de 400 μ L de suspensão de células de cada amostra foi incubada com 40 μ L de solução de PI a 50 μ g/mL (diluído em PBS). Após 10 minutos, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas

informações sobre a densidade, morfologia (espalhamento frontal e lateral da luz, correspondendo ao tamanho e granulosidade, respectivamente) e integridade de membrana celular, utilizando o filtro para o espectro do vermelho (DARZYNKIEWICK et al., 1992).

Os dados foram expressos com a média \pm erro padrão da média (E.P.M). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Dunnett, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina –Anexina V

A translocação da fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*), um fosfolípido localizado na face interna da membrana plasmática, que é translocado para a face externa da célula, é considerada um evento associado aos primeiros estágios do processo de apoptose. A Anexina V é uma proteína ligadora de fosfolípidos dependente de Ca^{2+} com alta afinidade pela PS (VERMES *et al.*, 1995).

Neste ensaio foram utilizados dois corantes distintos que permitem a diferenciação de células viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia/ necrose pela coloração diferencial por fluorescência. Um dos corantes é a Anexina-V que, quando conjugada à ficoeritrina (PE, do inglês *Phycoerythrin*), emite fluorescência amarela, possibilitando a identificação de células em apoptose. O outro corante, o 7-AAD, é capaz de penetrar as membranas celulares desintegradas e se ligar ao núcleo, emitindo fluorescência vermelha. A estratégia de dupla coloração permite a identificação de quatro populações distintas: células consideradas viáveis, sem nenhuma marcação [AnexinaV-PE (-) e 7-AAD (-)]; células consideradas em apoptose inicial, caracterizadas apenas pela fluorescência amarela [AnexinaV-PE (+) e 7-AAD (-)]; células em apoptose tardia ou necrose, reconhecidas pelos dois corantes [AnexinaV-PE (+) e 7-AAD (+)], pois nos estágios finais as membranas das células apoptóticas perdem a integridade; e células vermelhas que são consideradas debris nucleares [AnexinaV-PE (-) e 7-AAD (+)].

Os tratamentos com o composto ENSJ670 seguiram tempos de incubação de 24 horas, e concentrações de 0,85 μ M; 1,70 μ M e 3,5 μ M.

Após o tratamento de 24 horas, uma alíquota de 50 μ L da suspensão de células em PBS(+2% SBF, 1mM EDTA)de todos os grupos foi incubada com os

corantes. Após 20 minutos de incubação na ausência de luz, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (Guava easy Cyte™). A fluorescência da anexina V conjugada com a PE foi mensurada por fluorescência amarela (583 nm) e o 7-AAD na fluorescência vermelha (680 nm). As porcentagens de células em cada um dos quatro quadrantes foram calculadas.

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos testados, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Dunnett, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Este teste baseia-se na capacidade da mitocôndria sequestrar um corante fluorescente, a rodamina 123 (Rh123). Quando essa organela apresenta seu potencial transmembrânico inalterado, as células que sequestraram Rh123 emitem alta fluorescência, quando excitadas por um laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparados com as células que possuem mitocôndrias normais.

Os tratamentos com o composto ENSJ670 seguiram tempos de incubação de 24 horas, e concentrações de 0,85 μ M; 1,70 μ M e 3,5 μ M.

Uma alíquota de 800 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 250 μ L de uma solução de Rh123 em PBS ([] 1 μ g/mL). Após 15 minutos de incubação a 37°C/ 5% CO₂ no escuro, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e 400 μ L de PBS foi adicionado em cada amostra. Após um período de 30 minutos reincubadas no escuro, à temperatura ambiente (CURY-BOAVENTURA; POMPÉIA; CURI, 2004).

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos testados, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Dunnett, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares

A produção de espécies reativas de oxigênio foi monitorada utilizando o reagente não fluorescente diacetato 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (CM-H2DCFDA), que na presença de espécies reativas de oxigênio, quando o mesmo sofre oxidação, é convertido em um produto altamente fluorescente. O derivado clorometil (CM-) do H2DCFDA providencia uma retenção bastante superior em células vivas, quando comparado com o H2DCFDA, justificando sua escolha. A dupla marcação com iodeto de propídeo (PI) foi usada para detecção da produção de ROS apenas nas células vivas (PI negativas).

Os tratamentos com o composto ENSJ670 seguiram tempos de incubação de 60 min, 3 horas e 5 horas; e concentrações de 0,85 μM ; 1,70 μM e 3,5 μM .

As células foram pré-tratadas com CM-H2DCFDA em concentração final de 10 μM e incubadas por 30 min, no escuro, a 37°C e 5%CO₂. Após esse tempo, o meio contendo CM-H2DCFDA foi removido e as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS. A partir dessa etapa as células foram sempre protegidas da luz. Foi, então, adicionado meio contendo os compostos e incubados nos tempos de interesse. Ao final do tempo de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, lavadas com PBS e ressuspendidas em 500 μL de PBS com 1 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo. As amostras foram mantidas em gelo e imediatamente analisadas por citometria de fluxo (BD FACSVerse®) usando o canal de fluorescência verde (WU; YOTNDA, 2011; AMEZIANE-EL-HASSANI; DUPUY, 2013). Um total de 5.000 eventos foram analisados por amostra.

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M de três experimentos independentes realizados em duplicata e/ou triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos testados, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Dunnett, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

***Docking* molecular estático**

Hardware e software

O desenho das moléculas e os estudos de *docking* foram feitos na CPU Intel® Core i3-2100, processador 3,10 GHz x 4, memória (RAM) 4,00 GB, 64 bits com Ubuntu Linux (versão 14.04.3 LTS) como sistema operacional. A preparação de ligante das naftoquinonas selecionadas com potencial anticâncer de cólon foi realizada e as análises executadas com UCSF Chimera versão 1.13.1, University of California. As combinações de ligante e receptor em um único arquivo foram realizadas no software PyMOL, versão 0.99rc6, e a visualização da interação ligante-alvo foi realizada no Maestro, versão 12.1.013, em uma CPU Intel® Core™ i3-6100T, processador 3,10 GHz x 8,00 GB de 64 bits com Windows 7 Professional.

Preparação de ligante

Todas as moléculas selecionadas foram desenhadas usando a opção 2D e 3D do Marvin ChemSketch versão 18.20.0 e salvas no formato mol2. Minimização de energia, análise conformacional e preparação de ligante foram realizadas e exportadas no formato SDF. Posteriormente, foram importados para a quimera para o estudo de encaixe pela ferramenta AutoDock Vina.

Docking usando AutoDock / Vina

Etapas intermediárias, como arquivos pdbqt para preparação de proteínas e ligantes e criação de caixa de grade, foram concluídas usando o programa de interface gráfica do usuário UCSF Chimera por meio de ferramentas AutoDock (ADT). ADT, usado internamente no UCSF Chimera, atribuiu hidrogênios polares, cargas usando Gasteiger, solvente excluído e cadeias laterais incompletas substituídas usando a biblioteca Dunbrack 2010. Durante a adição de H foi considerado o método de H-bonds. Os estados de protonação da histidina baseavam-se no nome do resíduo. Na ferramenta AutoDock Vina, usada internamente no UCSF Chimera, o tamanho da grade foi definido para 60 x 60 x 60 xyz pontos com espaçamento de grade de 0,375 Å e o centro da grade foi designado nas dimensões (x, y e z): -1,095, -1.554 e 3.894. Uma grade de pontuação foi calculada a partir da estrutura do ligante para minimizar o tempo de computação. Durante o procedimento de *docking*, tanto a proteína quanto os ligantes são considerados semirrígidos. A pose com menor energia de ligação ou

afinidade de ligação foi extraída e alinhada com a estrutura do receptor para análise posterior.

Análise gráfica do resultado do docking molecular

A preparação do arquivo para as respostas dos níveis de interação do receptor e do ligante foi realizada no software PyMOL. O arquivo criado com a interação dos dois foi submetido à ferramenta de análise de interação receptor-ligante do software Maestro, gerando imagens de interação com corte de 5Å dos resíduos de aminoácidos. As imagens finais foram geradas no formato .tif.

Investigação da Bioativação enzimática das moléculas ENSJ670 E DY37

Pelo uso do método do MTT (já descrito anteriormente) foi possível investigar os possíveis mecanismos de morte celular dos compostos na linhagem tumoral HCT-116, a partir da utilização de alguns inibidores envolvidos nas vias estresse oxidativo, apoptose e metabolização de quinonas (Dicumarol e N-acetilcisteína). As células foram incubadas com acetilcisteína (100 µM) por 24 horas e dicumarol por 4 horas (200 µM). Posteriormente ao tempo de pré-tratamento, as placas foram centrifugadas (1800 rpm por 5min), o meio foi retirado e um novo meio de cultura foi adicionado com as concentrações seriadas dos compostos ENSJ670 e DY37, partindo de 15 e 70 µM, respectivamente, em um tempo de 24 horas de incubação. A droga menadiona (MEN) foi utilizada como controle positivo em todos os experimentos e sua diluição seriada partiu de 70 µM. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Em todos os experimentos com o inibidor dicumarol, sempre foi feita uma placa controle sem nenhum pré-tratamento, para assegurar que o fármaco utilizado no pré-tratamento não estaria alterando a viabilidade celular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

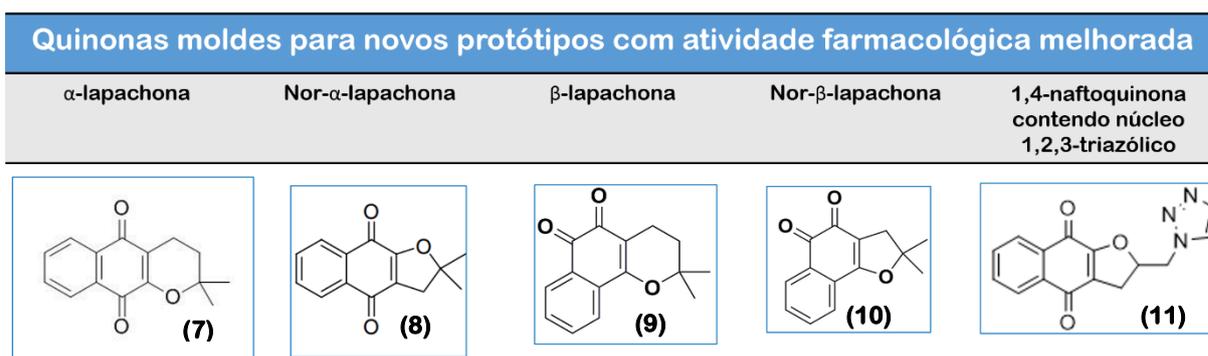
O escopo de ações biológicas inerente às quinonas inclui atividades antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-Alzheimer e antimalárica, o que as tornam conhecidas como "estruturas privilegiadas" em química medicinal; Este conceito é associado a espécies de estrutura molecular que podem vincular-se ou interagir com uma variedade de receptores biológicos e tem uma ampla gama de

atividades farmacológicas, o que pode fornecer ligantes ativos e seletivos para múltiplos objetivos biológicos, otimizando a estrutura dos grupos funcionais. Além disso, a estrutura privilegiada geralmente exibe interessantes propriedades semelhantes a fármacos, por isso pode ser útil como base para compostos ativos inéditos ou para a construção de uma robusta biblioteca de moléculas (Zhao & Dietrich, 2015; Zhang et al, 2021).

Compostos naftoquinoidais acoplados ao anel 1,2,3-triazólico via uma porção de organo-selênio.

O grupo de químicos da Universidade Federal de Minas Gerais, liderado pelo professor Dr. Eufrânio Nunes da Silva Júnior, é responsável pela elaboração de diversas séries de moléculas inspiradas nas quinonas α -lapachona (7), nor- α -lapachona (8), β -lapachona (9), Nor- β -lapachona (10) e 1,4-naftoquinonas contendo 1,2,3-triazóis (11) (Figura 16), gerando uma grande coleção de quinonas híbridas com relevantes resultados em ensaios biológicos.

Figura 16. Representação molecular de quinonas que servem de inspiração para novas moléculas com potencial farmacológico.



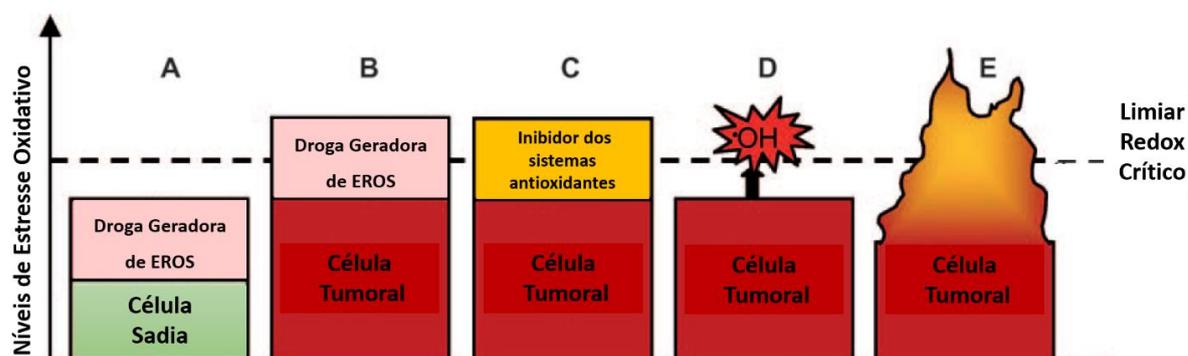
A triagem destas moléculas tem despertado interesse tanto por seus expressivos resultados com finalidade terapêutica (de Castro et al., 2013; Jardim et al., 2017).

Visando contribuir com a ampliação do arsenal terapêutico para o tratamento de diversos tipos de neoplasias, criando moléculas cada vez mais efetivas e seletivas, delineando seus mecanismos de ação e morte, buscando a melhoria da adesão aos tratamentos e sobrevida do paciente oncológico, a parte inicial deste

trabalho consistiu no desenho e síntese de uma família de moléculas a partir da 3-Azido-C-Alil-Para (6), de estrutura análoga ao esqueleto quinoidal da α -lapachona (7) (Figuras 12 e 16).

Baseando-se na abordagem anterior sobre o potencial terapêutico de naftoquinonas e triazóis, projetou-se as moléculas com base na teoria de hibridização molecular, visando obter as características terapêuticas de ambas as moléculas, em uma só estrutura (Gontijo et al., 2020). Além disso, a presença da molécula de selênio vem reforçar a estratégia de obtenção de um sistema quinoidal multialvo (Wang et al., 2014).

Figura 17. Modelos de modulação redox em células submetidas a distintas condições em comparação com células normais. Adaptado de Jamier, Ba e Jacob (2010).



Compostos contendo calcogênios podem ser transformados em espécies ativas, as quais por sua vez geram espécies reativas de oxigênio (EROs) de forma catalítica, mecanismo que envolve glutatona (GSH) e outras importantes enzimas (Figura 17, C) (BARBOSA *et al.*, 2010). Este tipo de catálise emprega EROs pré-existente e assemelha-se a outros mecanismos de compostos que geram EROs, como por exemplo, quinonas (Figura 17, B).

Naftoquinonas geram EROs, formando superóxidos e peróxidos, espécies capazes de trazer danos a células tumorais (BOLTON; DUNLAP; DIETZ, 2018). Em contraste, os compostos organocalcogênios (usuários de EROs pré-existentes), mimetizam o ciclo catalítico da selenoenzima GPx, e são capazes de utilizar EROs e acelerar reações com proteínas e enzimas sensíveis ao sistema redox, causando mau funcionamento da célula (TAKASAGO *et al.*, 1997; FISCHER; DEREU, 2010; NASCIMENTO; CORDEIRO; SILVA, 2019). Somados estes mecanismos, propõe-se

que a célula tumoral, devido ao seu extensivo metabolismo, já naturalmente desequilibrada em relação às espécies reativas de oxigênio, estaria mais vulnerável do que as células sadias, sendo mais suscetível à morte celular por substâncias que aumentam exponencialmente a geração de espécies oxidativas intracelulares (Figura 17, E).

Estratégias para desenvolver compostos com este perfil vêm sendo exploradas, visando à obtenção de quinonas contendo calcogênios e a obtenção de sistemas moduladores redox bioquímicos; explorando o limiar crítico observado em células tumorais e efetivamente atuando como geradores de EROs e catalisadores de formação de espécies reativas de oxigênio mais danosas, via utilização de EROs preexistentes (Figura 17).

Delineando a síntese de compostos com potencial atividade antitumoral, por meio do estresse do ambiente redox intracelular, foram planejadas moléculas compostas por um núcleo naftoquinoidal derivado da molécula lausona e um núcleo calcogênico capaz de mimetizar a atividade da enzima glutathione peroxidase (Zhou et al, 2018), unidos por meio do anel 1,2,3-triazólico. Para realizar esta ligação, foram planejados compostos organo-selênio com terminações alquino e azida.

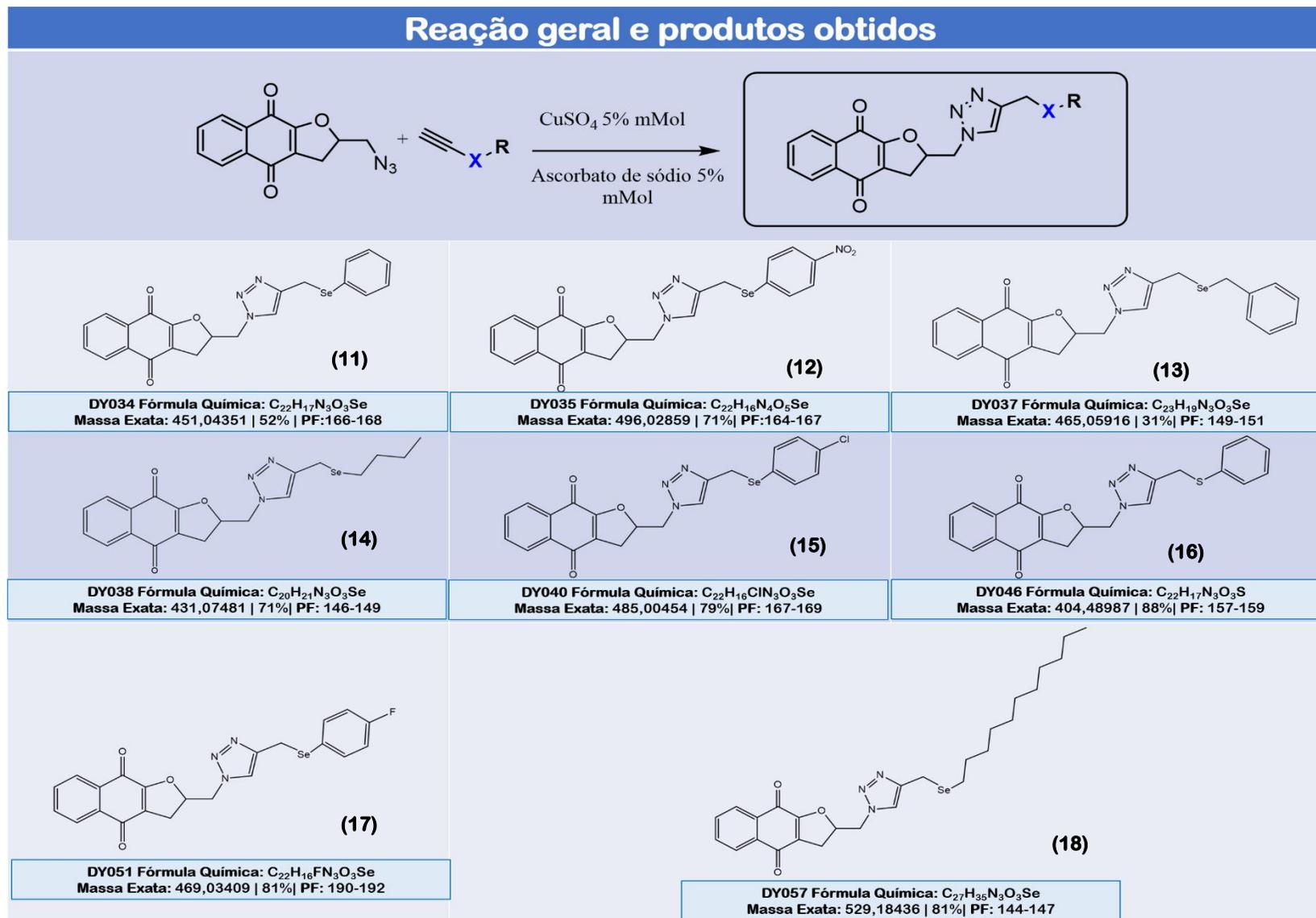
Durante o planejamento da rota sintética, foram idealizadas dezessete moléculas. Destas, dez seriam moléculas com grupos substituintes aromáticos oriundos de selenocianatos e os outros sete, alifáticos. Ao final, obtiveram-se oito moléculas, das quais conseguiu-se caracterizar completamente 6. As estruturas dos produtos finais encontram-se representadas na Tabela 3. No intuito de validar os produtos das rotas sintéticas, ao longo de cada reação realizou-se a análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (H^1) e Carbono 13 (C^{13}) da azida C-Alil- Para e dos produtos finais. O compilado destes resultados de caracterização por RMN, infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução encontram-se no Anexo 2.

Na Tabela 3 é possível visualizar as estruturas das moléculas obtidas por síntese (11-18), rendimentos e análise do ponto de fusão de cada uma delas.

De acordo com a espectroscopia por ressonância magnética nuclear das moléculas preparadas a partir de selenocianatos, obtivemos apenas aquela com o substituinte flúor como produto final da reação *click*. Das moléculas obtidas através das reações com alifáticos, aquelas com os substituintes benzila (11), butila (14) e decano (18) foram produzidas com êxito. Os compostos elaborados a partir de

disselenetos comerciais: fenila (13) e sulfeto (16) também resultaram em *clicks* bem sucedidas, já aqueles baseados em cloro (15) e nitro (12) não resultaram em compostos viáveis, de acordo com os ensaios de caracterização realizados. Os rendimentos variaram entre 14 e 88% e foram mais elevados em moléculas com grupamentos substituintes aromáticos.

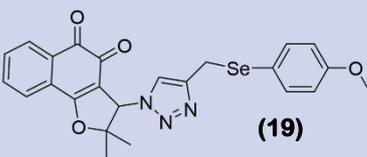
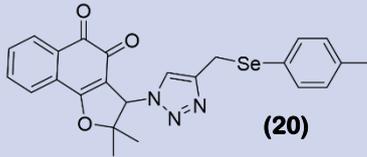
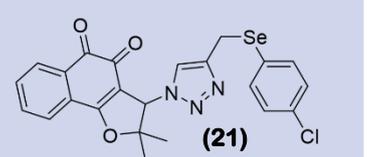
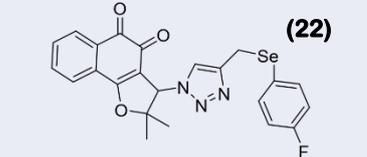
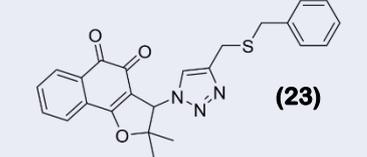
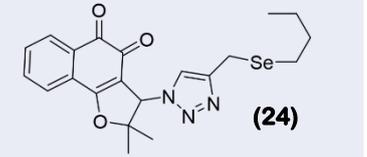
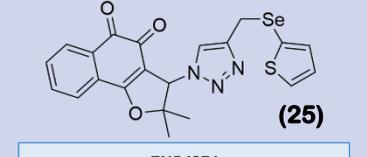
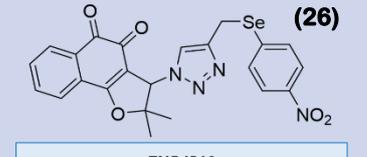
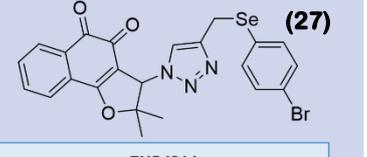
Tabela 3 Produtos das clicks entre naftoquinonas e 1,2,3 triazóis com a presença de selênio, rendimentos e pontos de fusão.



Potencial Antiproliferativo e Estudo Estrutura-Atividade

Após os processos de síntese e caracterização, foi avaliado o efeito citotóxico dos seis compostos 11-18 (Tabela 3). Para fim de efeitos comparativos, entre compostos quinônicos de posição *orto* e *para*, também foram testados os derivados da Nor- β -Lapachona (10) (*o*-quinonas- 19-27), gentilmente cedidos pelo grupo do Professor Dr. Eufraio Nunes da Silva Júnior (UFMG) (Tabela 4).

Tabela 4. Moléculas da série *o*-quinonas, inspiradas no esqueleto da Nor- β -Lapachona, testadas para comparação com as moléculas da série *p*-quinona e seus respectivos dados de fórmula molecular e peso molecular.

Orto-quinonas		
 <p>(19)</p>	 <p>(20)</p>	 <p>(21)</p>
<p>ENSJ668 Fórmula Química: C₂₄H₂₁N₃O₃Se Massa Exata: 495,06973</p>	<p>ENSJ669 Fórmula Química: C₂₄H₂₁N₃O₃Se Massa Exata: 479,07481</p>	<p>ENSJ670 Fórmula Química: C₂₃H₁₉ClN₃O₃Se Massa Exata: 499,02019</p>
 <p>(22)</p>	 <p>(23)</p>	 <p>(24)</p>
<p>ENSJ671 Fórmula Química: C₂₃H₁₈FN₃O₃Se Massa Exata: 483,04974</p>	<p>ENSJ672 Fórmula Química: C₂₄H₂₁N₃O₃S Massa Exata: 431,13036</p>	<p>ENSJ673 Fórmula Química: C₂₁H₂₃N₃O₃Se Massa Exata: 445,09046</p>
 <p>(25)</p>	 <p>(26)</p>	 <p>(27)</p>
<p>ENSJ674 Fórmula Química: C₂₁H₁₇N₃O₃SSe Massa Exata: 471,01558</p>	<p>ENSJ813 Fórmula Química: C₂₃H₁₈N₄O₃Se Massa Exata: 510,04424</p>	<p>ENSJ814 Fórmula Química: C₂₃H₁₈BrN₃O₃Se Massa Exata: 542,96968</p>

Os dois grupos de moléculas foram testados em 6 linhagens de células tumorais: PC3 (carcinoma prostático), HCT-116 (carcinoma colorretal), NCI-460 (carcinoma pulmonar) SNB-19 (Glioblastoma), Raji (linfoma de Burkitt), HL-60 (leucemia mielóide) e na linhagem normal de fibroblastos murinos L929 por um período de incubação de 72 horas igual para todas as linhagens. As amostras foram

testadas em diferentes linhagens de células tumorais e normais a fim de delinear seu perfil citotóxico e seletividade em células neoplásicas.

Utilizou-se o método do MTT para estabelecer o potencial antiproliferativo das moléculas testadas. A escolha das linhagens foi feita de acordo com sua disponibilidade. Os índices de seletividade foram calculados baseando-se nos resultados para a linhagem de carcinoma de cólon -HCT-116 (que apresentou maior sensibilidade a maioria dos compostos), e a linhagem de fibroblastos murinos normais-L929, sendo calculados através da divisão da CI_{50} de células normais L929 pelo resultado encontrado na linhagem tumoral (Figura 16).

Figura 18. . Fórmula utilizada para o cálculo do índice de seletividade dos compostos testados

$$\text{Índice de Seletividade} = \frac{CI_{50} \text{ na Linhagem L929}}{CI_{50} \text{ na Linhagem HCT-116}}$$

Tabela 5. CI50 de incubação de 72h, em μM , das moléculas seleno-quinoidais-Para nas linhagens tumorais (PC3, HCT-116, NCI-460, SNB-19, RAJI, HL-60) e na linhagem não tumoral L929. Os resultados foram baseados nas médias de pelo menos três experimentos independentes. α -Lapachona e Doxorubicina foram utilizadas como controles para fins comparativos. I.S (índice de seletividade comparando-se L929 e HCT-116)

Amostras	Linhagens celulares							I.S.
	PC-3	HCT-116	NCI-460	SNB-19	RAJI	HL-60	L929	
DY034 (11)	>10	7,62 (6,49-8,95)	>10	>10	>10	4,09 (3,52-4,76)	-	-
DY035 (12)	>10	>10	>10	>10	>10	1,05 (0,99-1,11)	-	-
DY037 (13)	2,10 (1,71-2,59)	2,03 (1,88-2,20)	>10	5,16 (4,61-5,79)	6,03 (4,74-7,69)	3,87 (3,41-4,40)	13,15 (11,20-15,43)	6,5
DY038 (14)	>10	7,40 (6,02-9,11)	>10	>10	>10	0,73 (0,61-0,78)	-	-
DY040 (15)	>10	>10	>10	>10	>10	6,36 (5,57-7,26)	-	-
DY046 (16)	>10	9,92 (8,08-12,26)	>10	>10	>10	5,43 (4,53-6,31)	-	-
DY051 (17)	9,35 (8,50-10,30)	7,55 (6,76-8,44)	>10	>10	5,11 (4,35-6,02)	3,17 (2,78-3,60)	-	-

DY057 (18)	>10	>10	>10	>10	9,60 (6,77-13,64)	4,19 (3,42-5,14)	-	-
α-Lapachona (7)	-	19,17 (12,92- 29,07)	-	-	-	-	-	-
Doxorrubicina (29)	0,76 (0,59-0,93)	0,21 (0,16-0,29)	0,15 (0,13-0,18)	NT	NT	0,02 (0,01-0,02)	1,72 (1,58-1,87)	8,19

Tabela 6. CI50 de incubação de 72h, em μ M das moléculas seleno-quinoidais-ORTO nas linhagens tumorais (PC3, HCT-116, NCI-460, SNB-19, RAJI, HL-60) e na linhagem não tumoral, L929. Os resultados foram baseados nas médias de pelo menos três experimentos independentes. Nor- β -Lapachona e Doxorrubicina foram utilizadas como controles para fins comparativos. I.S (índice de seletividade comparando-se L929 e HCT-116)

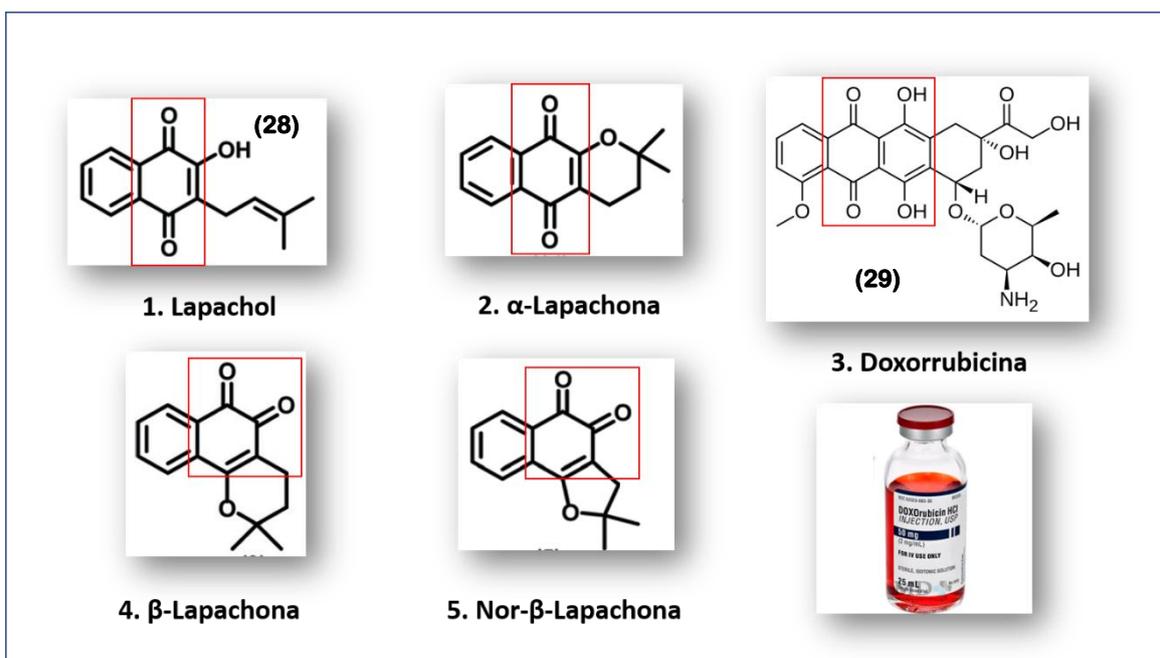
MTT 72h μ M- ORTO

Amostras	Linhagens celulares							I.S.
	PC-3	HCT-116	NCI-460	SNB-19	RAJI	HL-60	L929	
ENSJ 668 (19)	4,64 (3,68-5,86)	1,12 (0,93-1,34)	>10	3,23 (1,81-9,23)	1,93 (1,60-2,34)	1,06 (0,95-1,19)	1,86 (1,65-2,10)	1,66
ENSJ 669 (20)	1,92 (1,25-3,10)	1,58 (1,29-2,08)	>10	2,80 (2,35-3,34)	2,35 (1,80-3,12)	0,62 (0,57-0,68)	2,84 (2,43-3,32)	1,79
ENSJ 670 (21)	2,61 (2,09-3,27)	0,84 (0,74-0,96)	2,02 (1,68-2,44)	2,19 (1,96-2,45)	1,97 (1,59-2,45)	1,00 (0,90-1,11)	1,10 (0,81-1,50)	1,30
ENSJ 671 (22)	3,07 (2,46-3,87)	1,18 (1,05-1,34)	2,04 (1,22-3,59)	2,95 (2,45-3,57)	2,47 (2,04-2,62)	1,05 (1,05-1,23)	1,10 (0,74-1,65)	0,93
ENSJ 672 (23)	3,48 (2,82-4,29)	1,02 (0,88-1,17)	4,48 (2,71-4,65)	3,18 (2,82-3,59)	1,96 (1,81-2,24)	1,51 (1,38-1,66)	1,20 (0,97-1,51)	1,17
ENSJ 673 (24)	6,44 (5,40-7,68)	2,25 (1,96-2,60)	>10	3,87 (3,01-4,98)	4,46 (3,26-5,82)	1,68 (1,53-1,86)	2,80 (2,35-3,33)	1,2
ENSJ 674 (25)	2,33 (1,67-3,41)	1,70 (1,47-1,98)	2,99 (2,03-4,41)	5,73 (3,89-9,65)	1,95 (1,31-2,98)	0,83 (0,74-0,94)	1,71 (1,19-2,54)	1

ENSJ 675	3,20 (2,32-4,67)	3,72 (2,39-5,96)	1,62 (1,19-2,20)	1,66 (1,35-2,06)	3,30 (2,50-4,35)	7,80 (5,92-10,28)	3,23 (2,71-3,89)	0,9
ENSJ 813 (26)	1,64 (1,40-1,93)	0,79 (0,69-0,91)	1,07 (0,71-1,63)	1,56 (1,31-1,85)	2,54 (2,25-3,24)	11,04 (8,37-15,00)	1,52 (1,13-2,04)	1,92
ENSJ 814 (27)	2,11 (1,82-2,43)	1,08 (0,87-1,34)	0,89 (0,70-1,13)	1,54 (1,10-2,19)	2,27 (1,59-2,45)	0,63 (0,45-0,93)	1,74 (1,38-2,22)	1,61
Lapachol (28)	-	>20 μ M (MACHADO, 2018)	-	-	-	-	-	-
β- Lapachona (09)	-	5,6 μ M (4,67 – 6,75) (DIAS, 2018)	-	-	-	-	-	-
Nor- β - Lapachona (10)	-	1,57 μ M (1,18-2,10) (COSTA <i>et al</i> , 2017)	-	-	-	-	-	-

Dentre os derivados C-Alil-para testados (11-18) (Tabela 5), com exceção da molécula que apresenta o grupamento dodecano (18), todas sensibilizaram células da linhagem de cólon, HCT-116. A molécula DY037 (13), detentora do grupo substituinte benzila, destacou-se por apresentar atividade antiproliferativa em todas as linhagens testadas, com CI_{50} variando entre 2,03 e 6,03 μ M. A amostra também apresentou interessante índice de seletividade (6,5x) com foco no tratamento da linhagem HCT-116. Representadas na Figura 19.2 e 19.3, a α -Lapachona (07) (uma p-quinona) e a doxorrubicina (uma antraquinona) foram também testadas para fins comparativos.

Figura 19. Representação das moléculas selecionadas para testes comparativos com os novos protótipos sintetizados e apresentação farmacêutica da doxorrubicina (quinona de uso já estabelecido na prática clínica), uma solução isotônica de uso injetável.

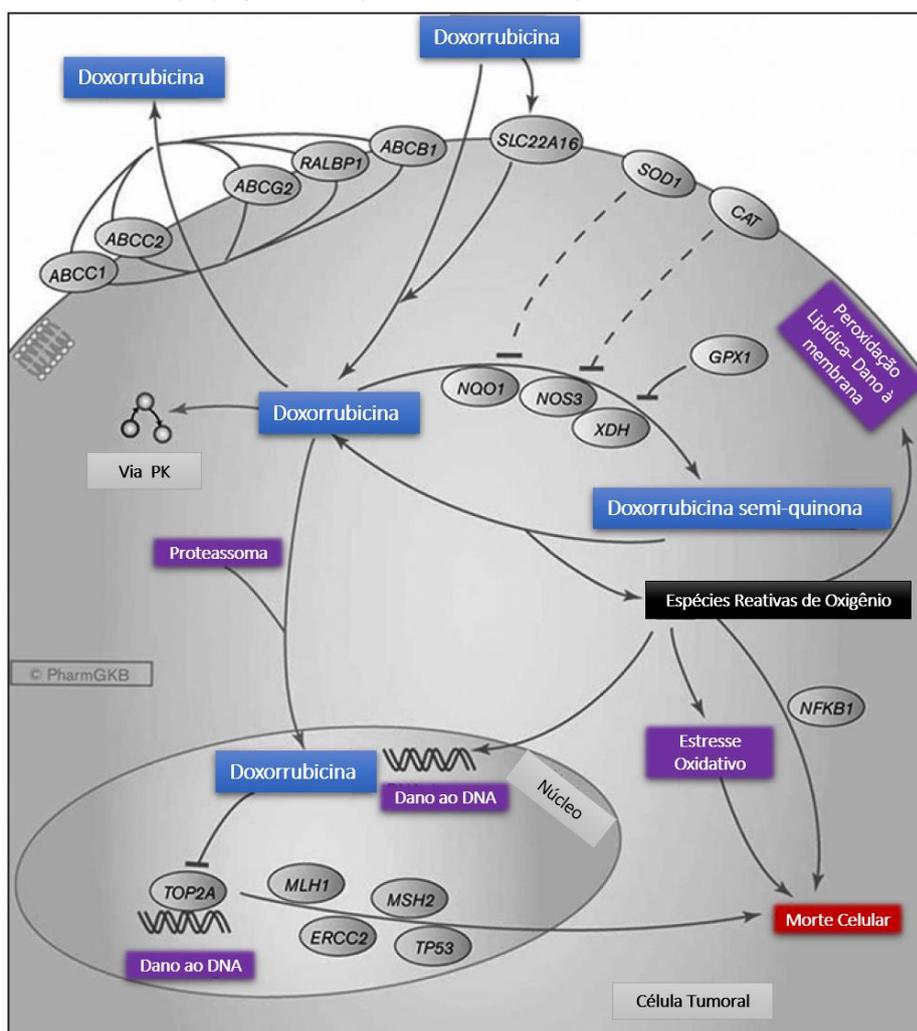


A documentação experimental e clínica em oncologia traz dados sobre as propriedades antitumorais de diversas quinonas de origem natural e sintética utilizadas no tratamento do câncer (BRANDÃO *et al.*, 2010). A doxorrubicina (29), conhecida comercialmente como Adriblastina RD, é um fármaco antineoplásico da classe das antraciclina, as quais se encontram entre os agentes quimioterápicos mais eficazes em uso clínico no tratamento do câncer, o que justifica seu uso para fins de comparação nos ensaios de potencial antiproliferativo deste estudo.

Estruturalmente, possui esqueleto cíclico do tipo quinona-hidroquinona e unidade glicosídica denominada daunosamina (figura19) (MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2020).

Em um rápido apanhado literário, é possível listar uma gama de mecanismos associados à ação antitumoral da doxorubicina (29). Esta versátil quinona atua como agente intercalante de DNA (AGUDELO *et al.*, 2014), indutor de estresse oxidativo (CAPPETTA *et al.*, 2017), promotor de alterações na membrana celular (ALVES *et al.*, 2017), desencadeador da superprodução de ceramidas (ØVERBYE *et al.*, 2017) e envenenador de topoisomerase II (MARINELLO *et al.*, 2018), sendo estes os principais mecanismos pelos quais exerce sua atividade antineoplásica (Figura 20).

Figura 20. Representação da pluralidade de mecanismos que a antraquinona doxorubicina (29) apresenta (RIVANKAR, 2014).



A doxorubicina (29) pode tratar efetivamente vários tipos de câncer por meio de seus diferentes modos de ação. No entanto, seu uso tem sido limitado devido à grave toxicidade que surge durante e após o tratamento. A toxicidade surge devido aos diferentes modos de ação que a doxorubicina (29) utiliza para inibir o crescimento do tumor (RIVANKAR, 2014). Além disso, diferentes eventos celulares podem ser desencadeados pela doxorubicina (29), todos responsáveis pela parada do ciclo celular ou morte celular. Logo, apesar da ampla eficácia, duas principais limitações estão associadas ao uso clínico de doxorubicina (29): multirresistência e cardiotoxicidade. Derivados de antraciclinas contendo diferentes gliconas e funções azido demonstraram promissora atividade com redução de toxicidade cardíaca e supressão de resistência em células tumorais, respectivamente (MOISEEVA, 2019). Isso motiva a elaboração de novas moléculas inspiradas em quinonas para o tratamento do câncer.

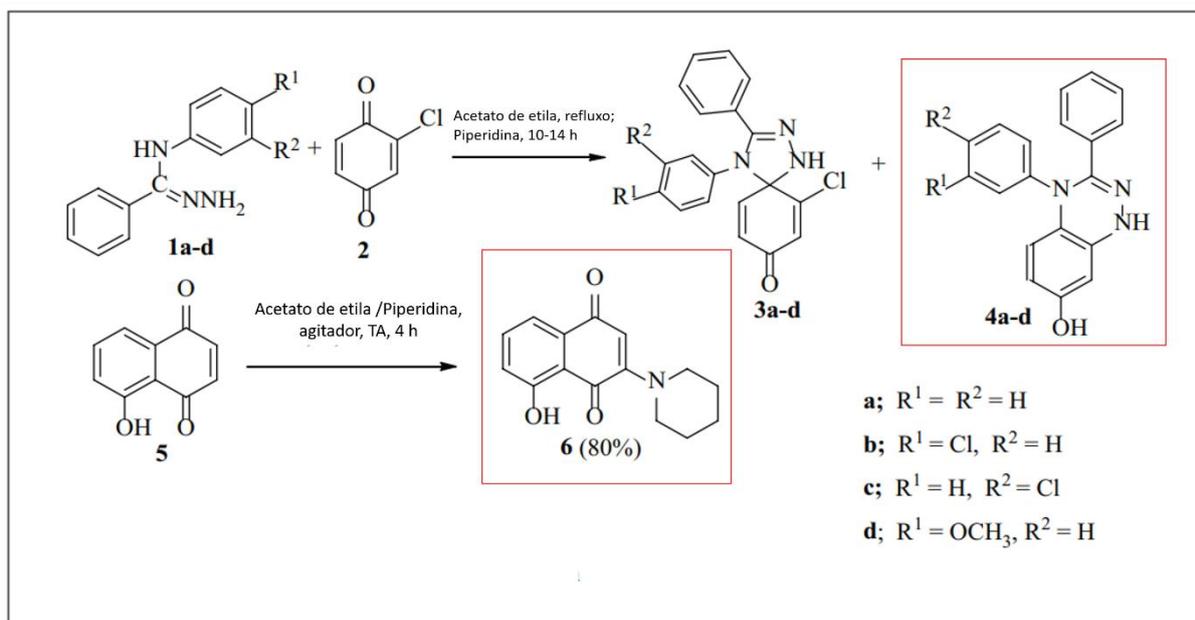
Como pode ser observado na Tabela 5, o análogo DY037 (13) apresentou desempenho superior à α -Lapachona (07) na linhagem de cólon HCT-116 no período de incubação de 72 horas. Em comparação a quinona doxorubicina (29), superou os análogos sintetizados em todas as linhagens testadas com IC_{50} variando entre 0,02 μ M em HL-60 (uma linhagem bastante sensível) e 0,76 μ M em PC3, uma linhagem mais resistente.

Enquanto isso, é válido observar que todas as amostras sintetizadas demonstraram atividade alta a moderada na linhagem de leucemia mielóide HL-60, com variações entre 0,73 e 6,36 μ M, destacando-se a molécula de grupo butila (11). Comparando-se os resultados das moléculas com grupamentos alifáticos (14 e 18), é nítida a melhora da atividade biológica com a diminuição do tamanho da cadeia. A propósito, as moléculas DY037 (13) e DY051 (17) demonstraram potencial relevante frente à linhagem também leucêmica (linfóide) RAJI. Jardim e colaboradores (2017) produziram uma série de 10 compostos *p*-quinônicos híbridos com presença de selênio que tiveram sua atividade antiproliferativa testada em 5 linhagens tumorais e, assim como em nossos achados, obtiveram resultados significativos ao tratar as células da linhagem HL-60. Destes compostos, 7 obtiveram CI_{50} considerável, variando entre 1,96 e 5,39 μ M. Semelhantemente à série produzida neste trabalho, as CI_{50} em linhagens de células normais alcançaram valor maior que 10 μ M (Jardim *et al.*, 2017).

Já a série representada pelos compostos 19-27, tem seus resultados demonstrados na Tabela 6 e, no período de incubação de 72 horas, apresentaram como composto com maior potencial antiproliferativo as amostras ENSJ 669 (20) – que exibe o grupo substituinte butila- e 814 (27), que apresenta o grupo substituinte fenil-Br, com valores de Cl_{50} de 0,62 e 0,63 μM na linhagem leucêmica HL-60, respectivamente. A molécula 813 (26), de grupo substituinte nitro-fenil, demonstrou bom potencial inibitório (Cl_{50} de 0,79 μM) na linhagem HCT-116. A molécula ENSJ 674 (25), que possui presença do heterociclo tiofeno, apresentou o menor índice inibitório: Cl_{50} de 5,73 μM na linhagem de glioblastoma (SNB-19).

No ano de 2020, Aly e colaboradores evidenciaram a viabilidade de reações de amidrazonas com duas quinonas de ocorrência natural, a saber, 2-cloro-1,4-benzoquinona e 5-hidroxi-1,4-naftaleno-1,4-diona (Figura 21). Espirotriazóis e 1,2,4-triazinas foram obtidos a partir das reações de amidrazonas com as quinonas citadas. As amostras obtidas foram testadas em um painel de 60 linhagens, das quais catorze linhagens foram sensibilizadas pela primeira molécula e vinte e duas pela segunda, demonstrando bom potencial de inibição do crescimento das células, sendo considerados os resultados das hibridizações encorajadores e promissores.

Figura 21. Reações entre amidrazonas e quinonas de ocorrência natural com formação de Espirotriazóis (Adaptado de Aly e colaboradores, 2020)



Um outro estudo experimental executado por Bahia e colaboradores (2016) mostra a síntese e estudo de uma série de compostos derivados de distintas quinonas em linhagens tumorais de pele, cólon, próstata e leucemia; Semelhantemente aos nossos achados, o grupo encontrou valores de CI_{50} mais elevados nas séries de *p*-quinonas: todas as amostras derivadas da α -Lapachona apresentaram resultados maiores que 9 μ M e os derivados da Nor- α -Lapachona (10) não apresentaram nenhuma CI_{50} inferior a 2 μ M. Nas séries derivadas de *o*-quinonas, praticamente todas as moléculas derivadas da β -Lapachona (9) (Figura 19) obtiveram resultados abaixo de 1 μ M e as derivadas da Nor- β -Lapachona (10) (Figura 19) apresentaram valores de CI_{50} menores que 2 μ M em todas as linhagens testadas. Apesar de demonstrar desempenho superior ao das moléculas que as inspiraram, nenhuma das amostras do estudo supracitado apresentou índice de seletividade tão elevado quanto a amostra DY037, sintetizada para o presente estudo.

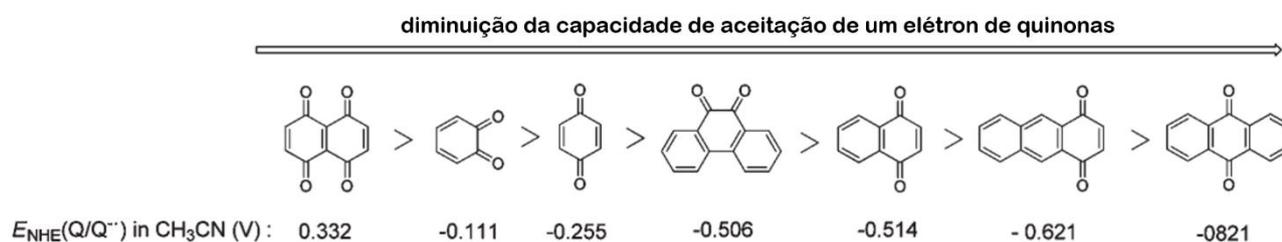
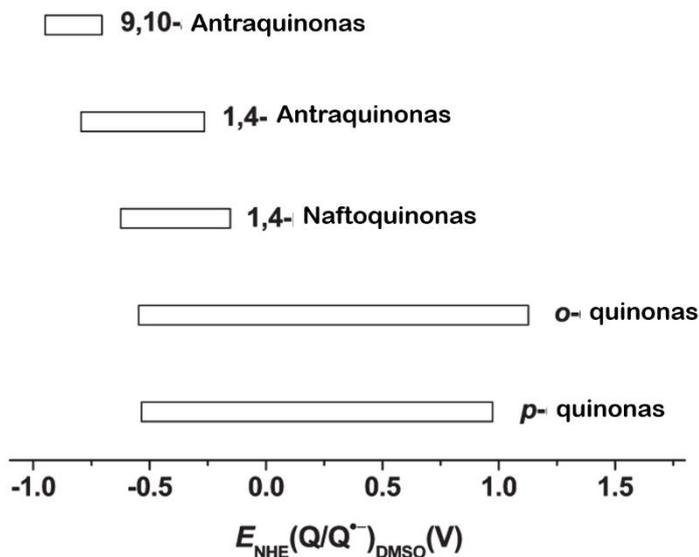
A molécula ENSJ 669 (20) demonstrou maior seletividade em relação à linhagem de câncer de cólon HCT-116. As moléculas seleno-quinoidais-*para* (11-18) sintetizadas apresentaram menor potencial antiproliferativo neste estudo e nos demais em que foram testadas e comparadas a moléculas desta classe, quando relacionados seus resultados com as moléculas inspiradas na Nor- β -Lapachona (10)(seleno-quinoidais-*orto*). Para que possamos compreender esta diferença de comportamento, é interessante evidenciar as características de cada espécie química em relação ao seu potencial redox, e mesmo que as diferenças estruturais sejam pequenas, há diferenças.

Potencial de oxidação/redução é a tendência de uma espécie química adquirir elétrons e, desta maneira, ser reduzida. Cada espécie tem seu potencial intrínseco de redução. Em estudos realizados no ano de 2010, Zhu & Wang estudaram o potencial de redução de um elétron de 116 quinonas e evidenciaram que *p*-quinonas apresentavam menor potencial redox que *o*-quinonas e isso influenciou os resultados em sua atividade biológica, o que é evidenciado em nossos achados e ao longo dos estudos abordados anteriormente.

Os autores demonstraram ainda que quinonas com propriedades aromáticas, as 2-substituídas-1,4-naftoquinonas têm os maiores potenciais de redução de um elétron, seguidos por 1,4-antraquinonas substituídas e depois por 9,10-antraquinonas substituídas (Figura 22) (ZHU; WANG, 2010). Esse dados que

podem dar suporte ao processo de planejamento de fármacos e conseqüentemente a síntese de produtos de maior eficiência biológica.

Figura 22. Quinonas e seus potenciais redutores (adaptado de ZHU; WANG, 2010)



Após a execução dos ensaios do MTT com incubação de 72 horas, seguiu-se com ensaios de tempos de incubação mais curtos, a fim de estabelecer qual molécula seria selecionada para a continuação dos estudos de mecanismo de morte e de ação. A escolha da linhagem em que os estudos foram continuados relacionou-se à expressão de NQO1. Visivelmente, nos dados expressos nos resultados de 72 horas de incubação, a linhagem HL-60 demonstrou maior sensibilidade frente às moléculas testadas. Contudo, linhagens leucêmicas como RAJI e HL60 apresentam expressão nula ou muito baixa de NQO1 (SCARPA *et al.*, 2012), um possível alvo a ser abordado neste estudo. Portanto, devido aos interessantes resultados na linhagem HCT-116 e sua moderada expressão da enzima em questão, optou-se por continuar os estudos nesta linhagem.

A Tabela 7 ilustra os dados de CI_{50} resultantes de períodos de incubação de 24 e 48 horas com as moléculas DY037 (13), representando as *p*-quinonas derivadas da C-Alil-lausona (04), e ENSJ 670 (21), 671 (22), 672 (23) e 813 (26), representando as *o*-quinonas derivadas da Nor- β -Lapachona (10). Foram utilizados como controles do experimento Menadiona, α -Lapachona (07) (*p*-quinona) e Nor- β -Lapachona (10) (*o*-quinona). A doxorubicina (29) não foi utilizada neste experimento por apresentar seu mecanismo principal de ação (dano ao DNA) com efeito apenas após um tempo de 48 horas de incubação (Figura 18).

Como pode ser observado na Tabela 7, a linhagem em que a maioria das moléculas testadas apresentou atividade foi a de câncer de cólon e por este motivo ela foi utilizada para a continuidade dos estudos. A *p*-quinona DY037 (13), portadora do grupo -benzil, seguiu apresentando valores de CI_{50} bastante superiores as das *o*-quinonas. No tempo de incubação de 48 horas, sua CI_{50} aumentou mais de três vezes e em 24 horas, obtivemos uma concentração inibitória superior a $10\mu\text{M}$; inviabilizando sua continuidade nos estudos. Ainda assim, esta molécula demonstrou potencial antiproliferativo mais acentuado que as moléculas utilizadas para comparação: α -Lapachona exibiu CI_{50} maior que $40\mu\text{M}$ enquanto a menadiona praticamente dobrou sua CI_{50} entre os tempos de 48 e 24 horas de incubação. Todas estas *p*-quinonas (controles e DY037 (13)) apresentaram comportamento tempo dependente, ou seja, sua atividade inibitória é diretamente proporcional ao período de incubação entre as moléculas e as células tumorais testadas.

Tabela 7. CI_{50} nos tempos de incubação de 24 e 48h, em μM das moléculas *o* e *p*-quinonas frente a linhagem tumoral HCT-116. Os resultados são oriundos de uma média de experimentos realizados em triplicata.

Código	$CI_{50}\ \mu\text{M}$	
	HCT-116- 48h	HCT-116- 24h
DY037 (13)	7,1 (6,41-7,87)	11,79 (9,19-15,25)
ENSJ 670 (21)	1,66 (1,33-2,08)	1,71 (1,43-2,05)
ENSJ 671 (22)	3,11 (2,46-3,92)	3,46 (2,83-4,25)

ENSJ 672 (23)	2,41 (1,96-2,95)	2,43 (2,03-2,91)
ENSJ 813 (26)	1,88 (1,48-2,42)	2,25 (1,75-2,91)
Nor-β-Lapachona (10)	1,024 (0,85-1,24)	4,12 (3,051-5,567)
α-Lapachona (07)	-	43,49 (33,25-56,89)

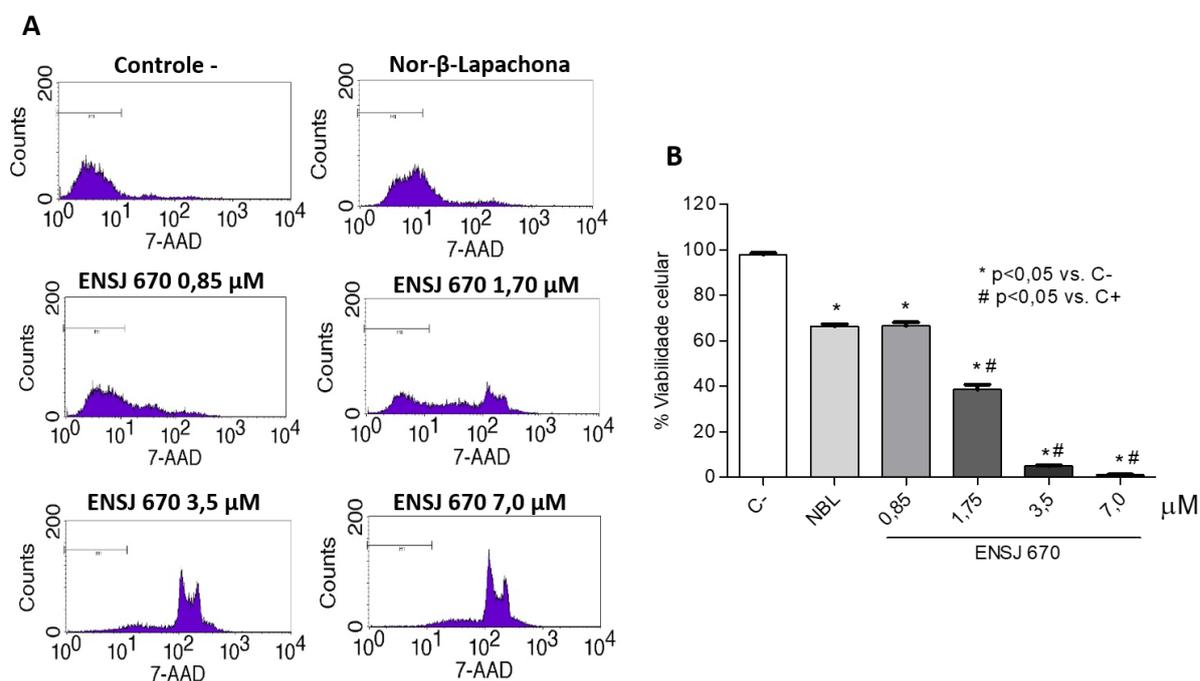
Já as *o*-quinonas (19-27), apresentaram potencial antiproliferativo elevado. Apesar das CI_{50} praticamente dobrarem em tempos de incubação menores (24 e 48 horas), as mesmas se mantiveram baixas quando comparadas entre si e as *p*-quinonas. Diferentemente do observado entre as *p*-quinonas, as CI_{50} encontradas entre as *o*-quinonas nos tempos de incubação de 24 e 48 horas se mantiveram praticamente constantes, evidenciando um comportamento que se distancia do das *p*-quinonas; não apresentando dependência do tempo no intervalo supracitado. Enquanto isso, o controle utilizado para comparação, a *o*-quinona Nor- β -Lapachona (10), apresentou uma CI_{50} praticamente quatro vezes maior no tempo de incubação de 24 horas, em relação a incubação de 48 horas, demonstrando um comportamento tempo-dependente e distinto do das moléculas testadas.

Diante das evidências encontradas, selecionou-se a molécula ENSJ 670 (21) para a continuidade dos estudos de mecanismo de morte celular e ação, por este composto apresentar a menor CI_{50} no período de incubação de 24 horas, além de apresentar razoável índice de seletividade quando testado em 72 horas, comparando-se o potencial citotóxico entre a linhagem tumoral na qual apresentou maior atividade (HCT-116) e a linhagem de células murinas normais L929.

Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo

Como já mencionado anteriormente, a molécula ENSJ 670 (21) foi selecionada para a continuidade dos estudos de mecanismo. Posteriormente aos ensaios do MTT, sucedeu-se o ensaio de viabilidade celular em células da linhagem HCT-116. Neste ensaio utilizaram-se quatro diferentes concentrações da molécula em estudo: metade da sua CI_{50} ($0,85 \mu\text{M}$), a própria CI_{50} ($1,75 \mu\text{M}$), o dobro ($3,5 \mu\text{M}$), e o quádruplo ($7,0 \mu\text{M}$). Para parâmetro de comparação, também foi mensurada a viabilidade de células não tratadas e células tratadas com a molécula protótipo que inspirou a o -quinona abordada neste estudo, a Nor- β -Lapachona (10).

Figura 23. Efeito da o -quinona ENSJ 670 (21) sobre a viabilidade das células HCT-116, determinada por citometria de fluxo após 24h de tratamento.



Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram contados para cada experimento. *, $p < 0.05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. NBL: Nor-Beta-Lapachona.

A Figura 23.A representa, por meio de histogramas, a viabilidade das moléculas testadas. Observando-se os histogramas, verifica-se que entre o controle negativo e o controle positivo é evidente um discreto deslocamento do pico para a direita e alteração do seu formato, enquanto o gráfico representado em B denota significativa redução da viabilidade celular no grupo tratado com a Nor- β -lapachona (10), em comparação ao controle negativo.

Em relação aos grupos tratados com a molécula teste, na menor concentração da *o*-quinona já é possível perceber, em comparação aos controles, uma sensível alteração na maneira como o gráfico se configura, com visível deslocamento das células para a direita, denotando alteração do padrão de tamanho e granulometria celular. A inibição da viabilidade celular é equivalente nos grupos do controle positivo e na menor concentração da *o*-quinona testada. Ao observar o perfil do histograma da Cl_{50} da molécula teste, um deslocamento bastante acentuado é visualizado, diluindo bastante o pico encontrado nas células sem tratamento. Comparando-se esta concentração e a Cl_{50} do controle positivo, de acordo com a parte B da Figura 19, é possível constatar uma redução superior do número de células em relação ao controle negativo e significativa redução do mesmo parâmetro comparado ao desempenho da Nor- β -lapachona (10). Visualmente é possível concluir que a diminuição da viabilidade celular encontrada na citometria é proporcional ao resultado encontrado no ensaio do MTT com incubação de 24 horas, corroborando-se os ensaios.

As duas maiores concentrações da *o*-quinona testada (21) apresentaram um potencial ainda maior de redução da viabilidade na linhagem celular HCT-116, tanto em comparação ao controle positivo quanto ao negativo, e é possível observar que a formação dos histogramas se deu em um padrão totalmente diferente do padrão das doses anteriores, com extenso deslocamento para a direita e extensiva diminuição da contagem do número de células.

O-quinonas: Toxicidade x Citoproteção.

Importância da concentração, tempo e reatividade

Não é difícil encontrar estudos que referenciam a relação destas moléculas (*o*-quinonas) com a quimioprevenção de doenças celulares e ao mesmo tempo seu potencial citotóxico. Bolton, Dunlap e Dietz (2018) elencaram em seus estudos sobre quinonas naturais uma série de mecanismos que abordam a quimioprevenção e toxicidade.

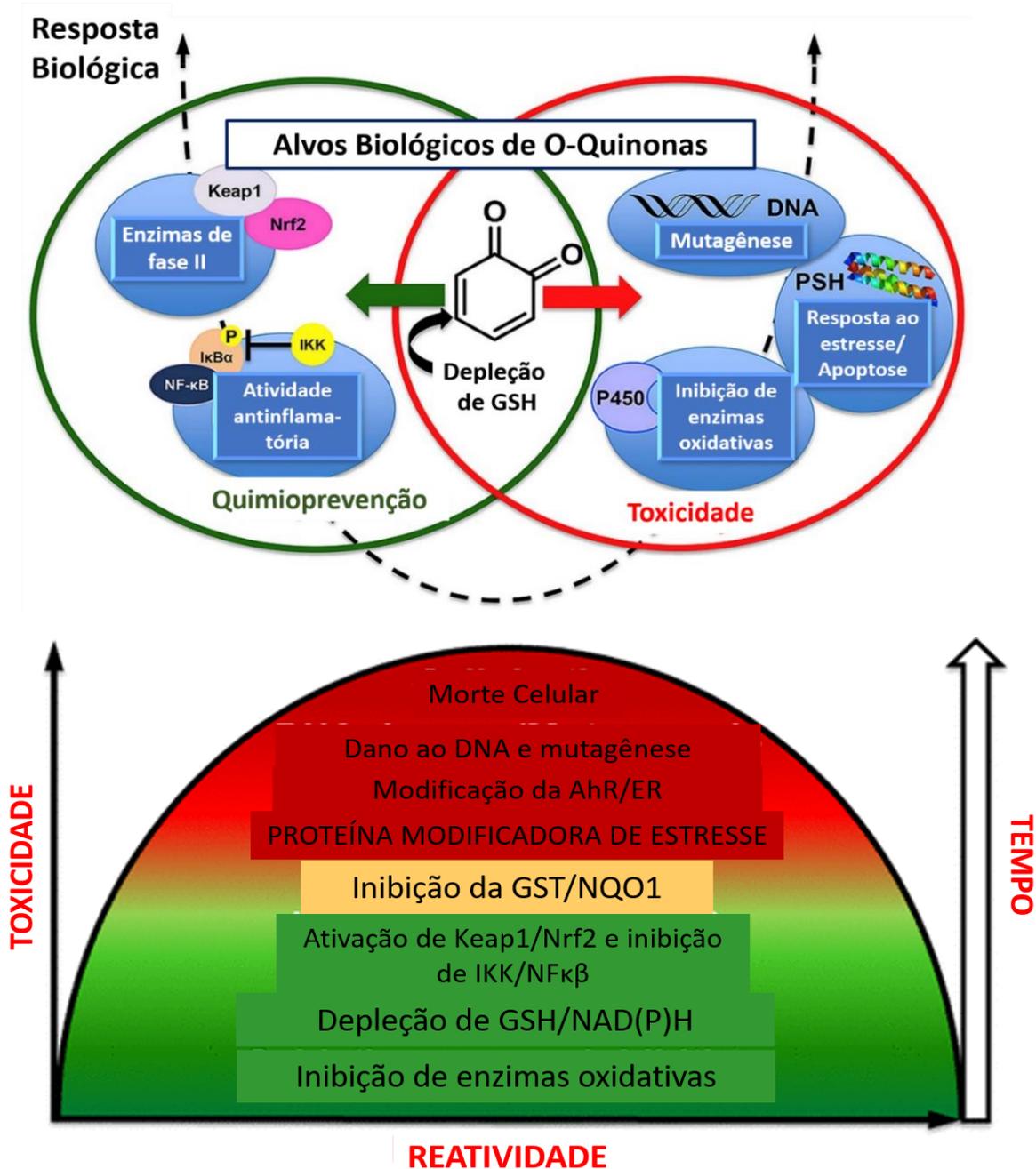
Alguns autores citam que a performance biológica quimiopreventiva das *o*-quinonas se manifesta através de atividade anti-inflamatória (Moridani *et al.*, 2001; Denis *et al.*, 2015), como ocorre com a quercetina (Kleemann *et al.*, 2011), resveratrol (Brisdelli *et al.*, 2009) e capsaicina (Reyes-Escogido Mde *et al.*, 2011), ou controle de enzimas de fase II, de metabolização de xenobióticos (Pierce *et al.*, 2016), por meio da enzima Keap1, que aumenta a atividade do elemento de resposta antioxidante (ERA) dependente de Nrf2, levando à indução de várias enzimas de desintoxicação. O potencial citotóxico das *o*-quinonas se manifesta por meio do dano ao DNA (Reyes-Escogido Mde *et al.*, 2011; Bolton & Dunlap, 2017), interação com enzimas oxidativas (Chin & Kinghorn, 2008) e morte por apoptose resultante do estresse celular (Gundala *et al.*, 2014), interações representadas na Figura 24.

Discute-se que quinonas e os compostos que as formam provavelmente têm curvas de dose-resposta em forma de U invertido (Figura 24) (SATO; MCKERCHER; LIPTON, 2013). Isso ocorre porque eles apresentam efeitos opostos em sistemas biológicos que, dependendo da dose, alvos celulares e tempo de exposição, podem resultar em toxicidade ou citoproteção. Em doses baixas e para quinonas relativamente estáveis/seletivas, a citoproteção vem de um contra-ataque eletrofílico resultando na indução de enzimas de desintoxicação pela via Keap1/Nrf2. Em doses mais altas e para quinonas menos seletivas/mais reativas, a depleção de GSH, a oxidação de NAD(P)H e a degradação de proteínas levariam à resposta ao estresse do retículo endoplasmático e à transdução de sinal alterada. Adutos de DNA, especialmente de quinonas de estrogênio e PAH (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), que não são reparados de forma eficiente durante a exposição a longo prazo, podem iniciar e promover o processo carcinogênico. Quinonas muito reativas provavelmente só têm como alvo as enzimas que as sintetizam (P450, COX-2, etc.)

ou reagem com água e têm poucos efeitos tóxicos/citoprotetores (BOLTON & DUNLAP, 2016).

Figura 24. Alvos biológicos de Orto-quinonas: da quimioprevenção à toxicidade.

Adaptada de Bolton, Dunlap e Dietz (2018);



Uma vez que a molécula em estudo é constituída pelo grupamento quinona, ao planejar os estudos de mecanismo de ação considerou-se as possíveis vias de ação das moléculas já descritas em literatura para a execução dos testes futuros.

Estudo do mecanismo de ação do composto ENSJ 670 em células tumorais de cólon HCT-116

Para os experimentos de mecanismo de ação da naftoquinona ENSJ 670 (21), foram utilizadas células tumorais humanas de carcinoma colorretal da linhagem HCT-116. As células foram cultivadas em placas nas concentrações indicadas em cada ensaio na seção de métodos. Os protocolos aplicados examinaram os efeitos de diferentes concentrações do composto ENSJ670, em tempo de incubação de 24 horas. As concentrações de ENSJ 670 (21) testadas foram estimadas a partir da média calculada dos valores de CI_{50} determinados pelo método do MTT para esta mesma linhagem celular, após 24h de incubação. Assim as concentrações escolhidas foram de 0,85 μ M; 1,75 μ M; 3,5 μ M e em alguns ensaios 7 μ M. Os controles positivos utilizados estão indicados em cada ensaio.

Mecanismo de Morte Celular

Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina –Anexina V

Para avaliar o padrão de morte celular, utilizou-se o método da Anexina para constatação da externalização da fosfatidilserina. A fosfatidilserina é um fosfolípido de membrana cuja externalização está, frequentemente, associada às primeiras alterações que ocorrem na via de morte celular por apoptose (FADOK *et al.*, 1992; CALLAHAN; WILLIAMSON; A SCHLEGEL, 2000). A fim de analisar a possível participação desse mecanismo de morte celular no padrão de morte desencadeado pela molécula ENSJ670 (21), o ensaio da Anexina V, marcador específico de fosfatidilserina, foi realizado por citometria de fluxo, após 24h de incubação. A Nor- β -Lapachona (10) foi utilizada como controle positivo para fins de comparação.

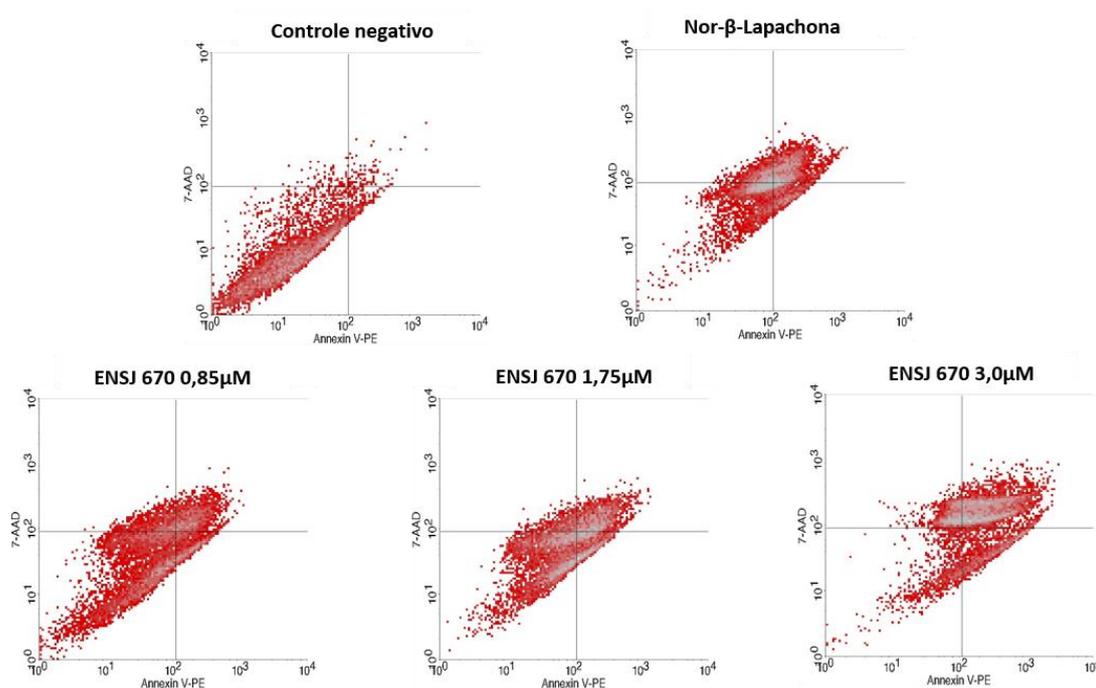
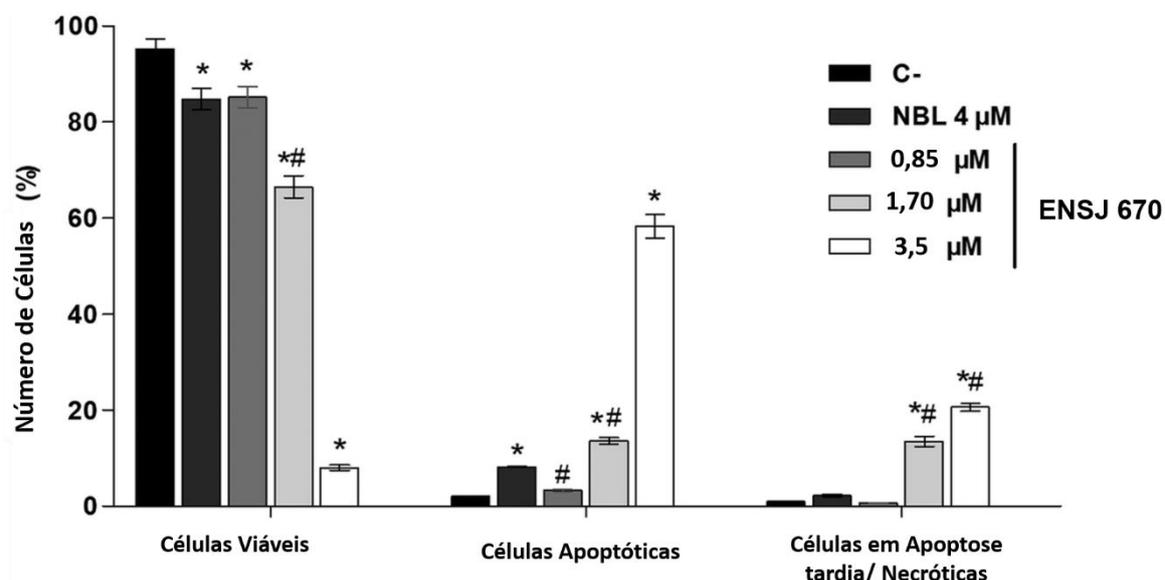
Como pode ser observado (Figura 25), houve diminuição significativa no número de células viáveis em todas as concentrações de ENSJ 670 (21) testadas em relação ao controle negativo. Observou-se também um aumento gradual no percentual de células apoptóticas proporcional ao aumento da concentração da o-quinona testada. O aumento foi significativo tanto em relação ao controle negativo quanto em relação à Nor- β -Lapachona (10). Foram detectadas células em processo

de apoptose tardia/ necrose apenas a partir da CI_{50} e os achados foram significativamente maiores que nos controles negativo e positivo. Através destes achados, evidencia-se a probabilidade de a molécula ENSJ 670 (21) utilizar-se do mecanismo de morte celular por apoptose.

Em estudo publicado no ano de 2008, Salustiano e colaboradores abordaram a síntese de quinonas híbridas- 1,4-naftoquinonas pentacíclicas e seus testes em células de pacientes resistentes à quimioterapia convencional. Os compostos foram avaliados quanto a sua capacidade de inviabilizar as células tumorais e, assim como a molécula em estudo, também passaram por avaliação da externalização da fosfatidilserina. O resultado encontrado demonstrou que as amostras eram capazes de induzir, em sua maioria, morte por apoptose e necrose, semelhantemente aos achados no presente estudo.

Datam da década de 90 os primeiros estudos que buscavam evidenciar os tipos de morte celular ocasionados pela *o*-quinona β -Lapachona (09) em sua atividade anticâncer e até os dias atuais, verifica-se o empenho de pesquisadores no propósito de evidenciar este aspecto e outros comportamentos mecanísticos desta molécula e seus derivados em uma série diversa de linhagens tumorais. Planchon estudou em 2001 o potencial apoptótico desta molécula em células tumorais prostáticas e inferiu que seu mecanismo está associado à interação com a enzima NQO1 (Planchon, 2001); Enquanto isso, Liu e colaboradores evidenciaram morte por apoptose por β -Lapachona em células tumorais de cólon humano, ocasionada pela geração de espécies reativas de oxigênio (Yue, et al., 2019); Bey e colaboradores (2006) demonstraram o potencial apoptótico da β -Lapachona, descrevendo uma série de eventos desencadeados por esta molécula, e que estão envolvidos na morte celular por apoptose.

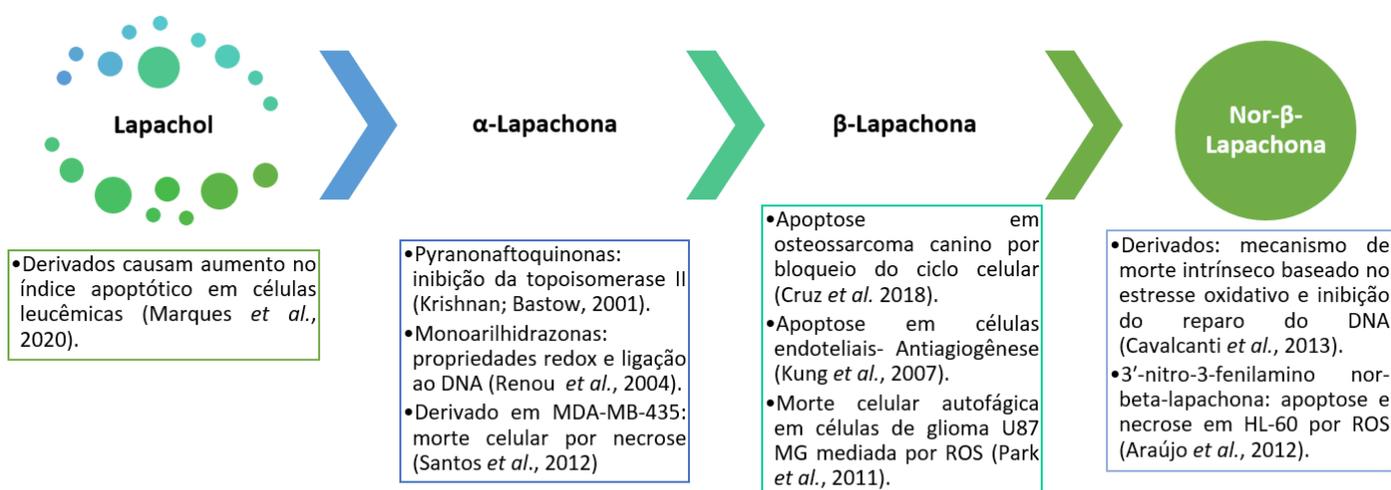
Figura 25. Efeito da ENSJ 670 (21) sobre a externalização da fosfatidilserina em células HCT-116 após 24h de tratamento, determinado por citometria de fluxo, utilizando Anexina-V-PE e 7-AAD. Os resultados estão representados em gráficos em barras e dot-plot.



Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram contados para cada experimento. *, $p < 0.05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. NBL: Nor-Beta-Lapachona.

Na Figura 26, estão descritos uma série de estudos nos quais o objetivo principal era estudar com profundidade a ação anticâncer dos derivados do lapachol (28), α -Lapachona (07), β -Lapachona (09) e Nor- β -Lapachona (10). Elencou-se os tipos de morte celular envolvidos nos mecanismos dos protótipos e seus derivados e, em sua maioria, foi evidenciado morte por apoptose ou necrose com espécies reativas de oxigênio envolvidas neste processo.

Figura 26. Quinonas naturais e sintéticas e seus mecanismos de morte em diversas linhagens de células tumorais.



Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Após apresentação de evidências sobre a implicação da ação de espécies reativas e suposto envolvimento de ROS nos mecanismos de morte de células tratadas com quinonas descritas em literatura, o presente trabalho investigou o papel das perturbações mitocondriais no efeito citotóxico do composto ENSJ 670 (21), avaliado através da sua capacidade de induzir alterações no potencial transmembrânico da mitocôndria ($\Delta\Psi_m$).

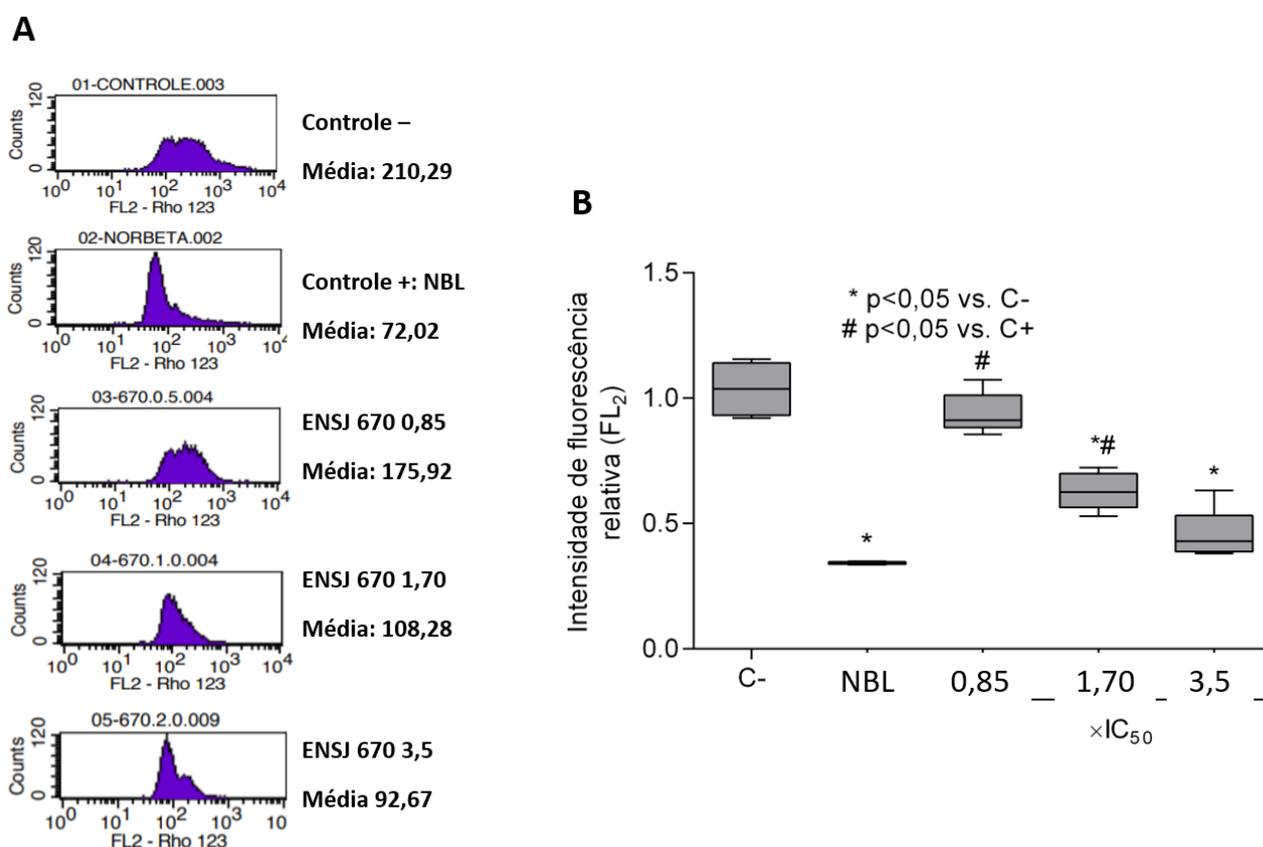
O teste foi realizado por citometria de fluxo através da incorporação do corante Rodamina 123 após 24h de tratamento. Neste ensaio utilizou-se três diferentes concentrações da molécula em estudo: metade da sua Cl_{50} (0,85 μ M), a própria Cl_{50} (1,75 μ M) e o dobro (3,5 μ M). Para parâmetro de comparação, também

foi mensurada a viabilidade de células não tratadas e células tratadas com a molécula protótipo que inspirou a *o*-quinona abordada neste estudo, a Nor- β -Lapachona (10).

O comportamento da *o*-quinona testada (ENSJ 670-21) apresenta-se similar ao controle negativo na menor concentração utilizada (0,85 μ M) e o pico formado mantém-se em posição semelhante ao mesmo, não havendo significância na comparação. Já nos resultados observados na CI_{50} (1,70 μ M), é possível tanto visualizar um aspecto diferenciado no histograma quanto no gráfico de barras e a diferença significativa em comparação com os controles negativo e positivo é evidente. No histograma, o gráfico desloca-se para a esquerda, deixando nítida a formação de um pico e diminuição da fluorescência, indicativa de alteração da função mitocondrial por despolarização. A maior concentração da ENSJ 670 (21) testada deixa ainda mais evidente a similaridade entre seu comportamento e o controle positivo, com formação perceptível de um pico à esquerda, reforçando o caráter de despolarização mitocondrial, similarmente aos achados no estudo anteriormente mencionados. Contudo, a despolarização verificada no controle positivo, NBL, a concentração de 20 μ M, foi considerada bastante elevada em comparação ao controle negativo.

Observando-se a Figura 27, infere-se que a molécula eleita como controle positivo (Nor- β -Lapachona-10) provoca alteração da intensidade de fluorescência relevante em relação ao controle negativo. Em seus estudos sobre a molécula controle, Cavalcanti e colaboradores (2013) concluíram que a diminuição de $\Delta\Psi_m$ induzida por ela indicou disfunção mitocondrial mediada por ROS em células de leucemia promielocítica. Assim, as alterações na função mitocondrial causadas pela exposição a essa naftoquinona poderiam ser as principais causas de morte celular. O estudo justifica que as EROs geradas *in situ* podem abrir poros de transição de permeabilidade com subsequente perda de $\Delta\Psi_m$, além de poderem causar danos celulares por apoptose, inativação de enzimas e liberação de citocromo c no citosol (PISANI *et al.*, 1986; LI *et al.*, 1997; CAVALCANTI *et al.*, 2013). No mesmo estudo, foi ainda levantada a hipótese de que parte das moléculas testadas causaria danos oxidativos no DNA pela geração de ROS e, de alguma forma, os tratamentos prejudicariam a atividade de reparo do DNA, desencadeando a apoptose.

Figura 27. Efeito da ENSJ670 (21) sobre a despolarização mitocondrial em células HCT-116, determinado por citometria de fluxo após 24h e 48h de tratamento. A concentração utilizada para o controle positivo NBL foi de 20 μ M.



Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram contados para cada experimento. *, p < 0.05 comparado ao controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

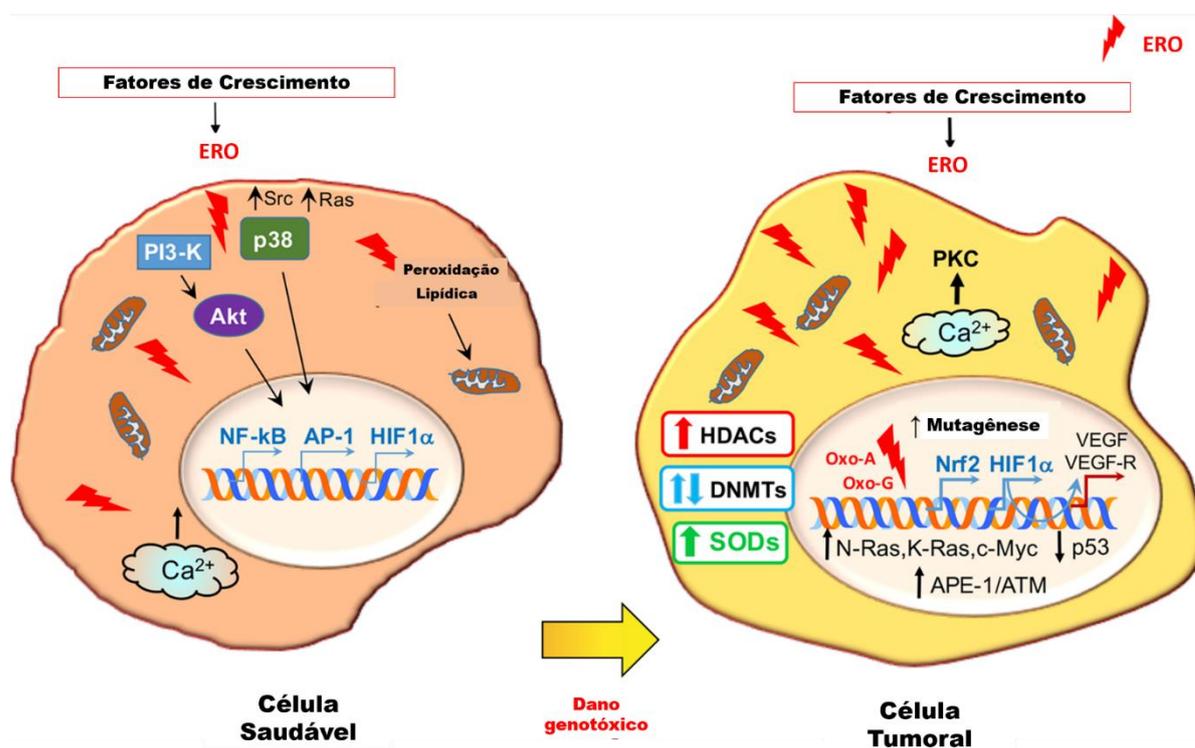
Em 2019 Shi e colaboradores debruçaram-se sobre os estudos de mecanismos de morte envolvendo a molécula mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP) em células INS-1. Os autores concluíram que a MEHP levaria ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e à regulação positiva da morte por autofagia. Adicionalmente, MEHP induziria o colapso do potencial transmembrana mitocondrial e liberação de citocromo c. Durante os estudos, testou-se o potencial citoprotetor da pirroloquinolina, uma quinona, e observou-se uma diminuição dos índices de morte celular após sua aplicação, o que reforça a hipótese de que, a depender da

concentração utilizada, as quinonas podem assumir um caráter mantenedor do equilíbrio celular.

Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelulares

Após constatadas evidências de que há participação de espécies reativas de oxigênio no mecanismo de morte celular induzido por naftoquinonas, de acordo com os estudos anteriormente mencionados, prosseguiu-se com a investigação sobre a geração destas espécies sobre células tratadas com a molécula em estudo, ENSJ 670 (21).

Figura 28. Um paralelo entre a produção de espécies reativas de oxigênio em células saudáveis e tumorais a partir do estímulo por fatores de crescimento. Adaptado de Perillo e colaboradores, 2020.



As principais cascatas de sinalização induzidas por EROs estimuladas por fator de crescimento estão destacadas na Figura 28, à esquerda. As mesmas vias influenciam o ciclo celular e afetam a atividade de fatores de transcrição e genes que

desempenham papéis na resposta celular ao microambiente hipóxico. As EROs também induzem a peroxidação lipídica com escoamento de elétrons nas mitocôndrias e a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. As principais consequências do estresse oxidativo em células cancerosas são ilustradas na Figura 28, à direita. EROs moderadamente elevadas induzem oncogenes e inibem genes supressores de tumor que, por sua vez, aumentam os níveis de EROs. A liberação de Ca^{2+} induz a PKC, enquanto a expressão de genes envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos e no estabelecimento de um sistema antioxidante potencializado é aumentada. EROs também ativam HDACs e têm um efeito duplo sobre DNMTs com resultados importantes para a expressão de oncogenes e genes supressores de tumor. As bases oxidadas desencadeiam mutações e envolvem enzimas de reparo do DNA (PERILLO *et al.*, 2020). Em resumo, a célula tumoral usa a produção aumentada, embora regulada de EROs como “combustível” para a instabilidade genômica.

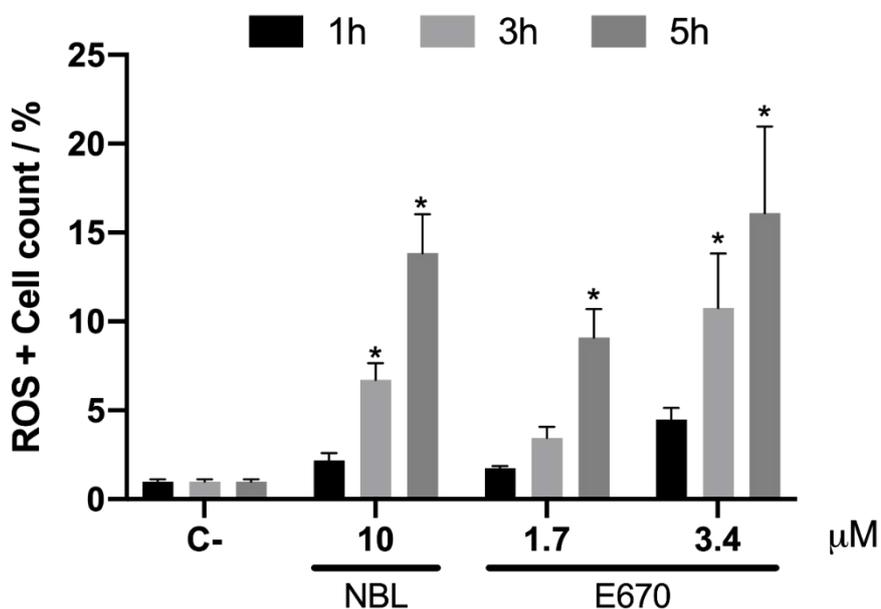
O efeito Warburg, também chamado de glicólise aeróbica, conhecido desde a década de 1920 (WARBURG; WIND; NEGELEIN, 1927; SIMABUCO *et al.*, 2018), é por definição o deslocamento apresentado pelas células tumorais da oxidação completa da glicose para uma oxidação incompleta a lactato, mesmo na presença de oxigênio. Essa observação pode ser considerada uma das marcas do câncer e mostra uma das alterações relacionadas ao metabolismo apresentadas pelas células tumorais. A principal consequência do efeito Warburg é o aumento do consumo de glicose nas células cancerígenas. As mesmas apresentam um comportamento metabólico alterado. Mesmo na presença de oxigênio, essas células oxidam a glicose em lactato, em um processo bem menos eficiente para gerar ATP e, portanto, consome mais glicose. Esse aparente paradoxo é explicado em parte por várias outras alterações no metabolismo que ocorrem além do efeito Warburg (SIMABUCO *et al.*, 2018). Como relacionado anteriormente, devido a uma série de fatores como extensiva estimulação e autoestimulação celular tumoral por fatores de crescimento e vigoroso metabolismo intrínseco, a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio é algo comum neste tipo de célula, elevando o limiar crítico de produção de EROs.

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular é um processo comum e muitas vezes fisiologicamente importante. As EROs podem ser produzidas durante o metabolismo celular, pela mitocôndria, e por sistemas enzimáticos distintos. No entanto, em células tumorais, onde o balanço redox já se

encontra em situação crítica (JAMIER *et al.*, 2010), uma elevação no conteúdo de EROs pode desencadear morte celular. Naftoquinonas são moléculas conhecidas pela produção de EROs devido a sua estrutura redox. De posse destas informações, o composto ENSJ 670 (21) foi avaliado quanto sua capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio.

Mensurou-se a produção de EROs intracelular usando o reagente CM-H2DCFDA, que pode reagir com diferentes tipos de EROs, incluindo peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e peroxinitrito. Conforme observado na Figura 25, o controle negativo não apresenta produção significativa de EROs, enquanto o controle positivo, NBL, apresentou significativa geração destas espécies a partir de 1 hora de incubação. A CI_{50} da quinona em estudo apresentou significativa geração de EROs apenas a partir do período de incubação de 5 horas, enquanto o dobro de sua concentração alcançou valor significativo em relação ao controle negativo a partir do tempo de 3 horas de incubação (Figura 29).

Figura 29. Efeito das naftoquinonas ENSJ670 (21) na produção de ROS em células HCT-116 determinado por citometria de fluxo utilizando o CM-H2DCFDA, após 1h, 3h e 5 horas de incubação.



Nor-β-Lapachona (10) na concentração de 20mM foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados para cada experimento. *, $p < 0.05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

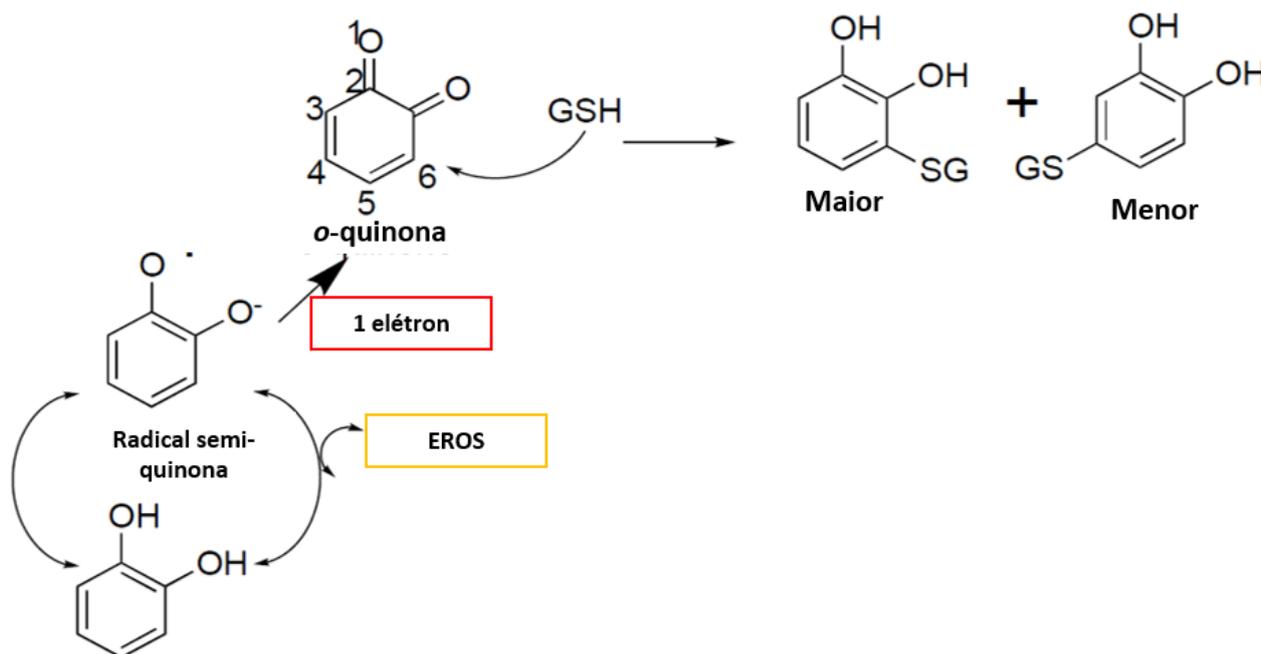
Observa-se ainda que tanto o controle positivo quanto a amostra em estudo induziram a formação de EROs intracelular de maneira tempo dependente, atingindo os picos de produção em 5 horas. A naftoquinona ENSJ 670 (21) apresentou também comportamento dependente de concentração, visto que, quanto maior a concentração utilizada nos tratamentos, maior o índice de produção de espécies reativas. Os resultados corroboram com os apanhados dos estudos anteriores, especialmente com os achados sobre a despolarização mitocondrial.

Um dos principais desafios no desenvolvimento de drogas antineoplásicas que erradicam células cancerígenas especificamente, com toxicidade mínima para células normais, é identificar as propriedades particulares do câncer. As células cancerosas sustentam um nível mais alto de espécies reativas de oxigênio, devido a alterações metabólicas e de sinalização e crescimento desenfreado. As células cancerosas também são dotadas de um poderoso ambiente redutor, devido à superprodução de antioxidantes como a glutatona (GSH) (PERILLO *et al.*, 2020). Portanto, o equilíbrio redox alterado é provavelmente a propriedade mais prevalente das células cancerígenas distintas das células normais, o que poderia servir como alvo terapêutico favorável. Por isso, a associação com estratégias de drug delivery poderia ser crucial para evitar efeitos adversos, aumentando, assim, a adesão a terapia antineoplásica.

Devido ao fato de as o-quinonas serem espécies eletrofílicas que muitas vezes não são detectadas, pois reagem rapidamente com uma variedade de nucleófilos via adição de Michael não enzimática, sua formação pode ser inferida através de seu aprisionamento por nucleófilos de tiol reativos, como a glutatona (Figura 30). Bolton, Dunlap e Dietz (2018) desenvolveram um pró-oxidante depletor de GSH, benzoiloxi dibenzil carbonato, denominado B2C, que foi capaz de diminuir rapidamente o GSH e elevar o estresse oxidativo a um nível limite acima do qual as células cancerígenas não podem sobreviver. B2C foi projetado para liberar quinona metídeo (QM), que rapidamente esgota GSH através de hidrólise mediada por esterase. B2C foi capaz de esgotar rapidamente GSH e induzir um nível avassalador de estresse oxidativo em células cancerosas, levando à ruptura mitocondrial, ativação de procaspase-3, PARP-1 e clivagem de Bcl-2. No estudo de modelos de xenoinxerto de tumor, o B2C injetado por via intravenosa causou morte celular apoptótica em tumores e suprimiu significativamente o crescimento do tumor. Essas descobertas fornecem uma nova visão sobre o desenho de fármacos anticâncer mais eficazes, que

exploram o equilíbrio redox alterado nas células cancerígenas, reforçando o papel das quinonas neste processo.

Figura 30. Interação Quinona- GSH com transição Quinona-Semiquinona e formação de espécies reativas de oxigênio durante o processo. Adaptado de Bolton, Dunlap e Dietz (2018)



Fisiologicamente, a geração de hidroquinonas induzida por espécies reativas de oxigênio nem sempre é uma etapa de desintoxicação, dependendo do potencial redox da hidroquinona, de se rearranjar para gerar eletrófilos reativos e da capacidade do sistema biológico específico de eliminar a hidroquinona antes ou depois da conjugação via glucuronidação ou sulfatação. Mesmo no caso bem estudado da menadiona, pequenas mudanças na estrutura da naftoquinona alteram a estabilidade da hidroquinona gerada e podem modular sua toxicidade. Derivados de 2-hidroxi e 2-amino 1,4-naftoquinona podem ser ativados por NQO1, mas curiosamente *in vivo*, não apenas a extensão da toxicidade pode ser modificada por pequenas alterações na estrutura em relação à menadiona, mas também no sítio-alvo (receptor) (IVANOVA *et al.*, 2018). A superóxido dismutase (SOD) também pode influenciar as taxas de autoxidação de hidroquinonas geradas por NQO1 e pode inibir

ou acelerar a autooxidação dependendo da estabilidade e da química redox da hidroquinona (ROGINSKY; BARSUKOVA, 2000). Os mecanismos subjacentes à morte de células tumorais variam, dependendo da hidroquinona gerada, mas a produção de intermediários eletrofílicos que arilam o DNA (mitomicina C, aziridnilbenzoquinonas), espécies reativas de oxigênio (β -lapachona, estreptonigrina, desoxiniboquinona) ou moléculas que são mais eficientes em inibir outro alvo celular (Ex: Hsp90) foram todos demonstrados (ROSS; SIEGEL, 2021).

A enzima NQO1 atua na proteção contra o estresse oxidativo. NAD(P)H: oxidorredutases aceptoras de quinonas (NQO's), como o próprio nome sugere, são eficientes na redução de quinonas endógenas e exógenas a hidroquinonas (ERNSTER, 1967; ROSS; SIEGEL, 2018). Esta relevante enzima biológica pode atuar fornecendo formas antioxidantes de substratos fisiológicos, incluindo ubiquinona e vitamina E quinona e geração de NAD⁺ para sirtuínas e PARP. A eliminação direta de superóxido por NQO1 também pode fornecer proteção contra o estresse oxidativo, particularmente onde os níveis de SOD celular são baixos. As funções de ligação macromolecular de NQO1 podem ser igualmente relevantes para uma resposta protetora celular. A ligação de NQO1 a proteínas pode estabilizá-las contra a degradação proteassomal 20S, enquanto a ligação de NQO1 ao mRNA pode modular a tradução de proteínas. Isso sugere que um papel importante para NQO1 quando induzido sob condições de estresse oxidativo é manter a estabilidade de proteínas críticas. P53 é um das proteínas protegidas por NQO1 contra a degradação proteassomal. Mudanças nas razões redox dos nucleotídeos de piridina alteram a conformação e a ligação de NQO1 a proteínas e mRNA, o que pode representar um mecanismo de sinalização no estresse oxidativo. A importância e funções da enzima citada foram elencadas na Figura 31 (ROSS; SIEGEL, 2018).

Docking Molecular: Conexão entre as naftoquinonas ENSJ 670 (21) e DY037 (13) e a enzima NQO1

A relação entre a produção de espécies reativas motivada pelo tratamento com quinonas e a regulação do processo de morte celular via NQO1 anteriormente descrita, motiva investigar com mais propriedade a interação entre estas moléculas.

Docking ou ancoragem molecular é um recurso utilizado para predição da melhor orientação de ajuste de um ligante em uma proteína. Essa perspectiva nos permite prever o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação das proteínas alvo, assim como explicar as interações moleculares. A sequência de *docking* envolve dois passos: (1) predição da conformação, posição, orientação do ligante dentro dos sítios e (2) avaliação da afinidade de ligação (MENG *et al.*, 2011). O *docking* pode também ser utilizado para realizar triagem virtual de volumosas bibliotecas de compostos, classificar resultados e propor hipóteses estruturais sobre como ligantes ligam-se aos alvos (MORRIS; LIM-WILBY, 2008; TROTT; OLSON, 2009). Essas predições podem ajudar a elevar a probabilidade de encontrar novos inibidores de proteínas-chave de patógenos, ao prever quão bem um composto pode conectar-se ao alvo, onde ele pode ligar-se, e que tipos de interações poderia formar no local de ligação, assim como identificar candidatos promissores para testes de laboratório.

Este método permite estudar como duas estruturas tridimensionais interagem uma com a outra, da melhor forma possível e tem sido muito utilizado para estudar como algumas moléculas podem interagir com enzimas e no planejamento de fármacos (REIS, 2008).

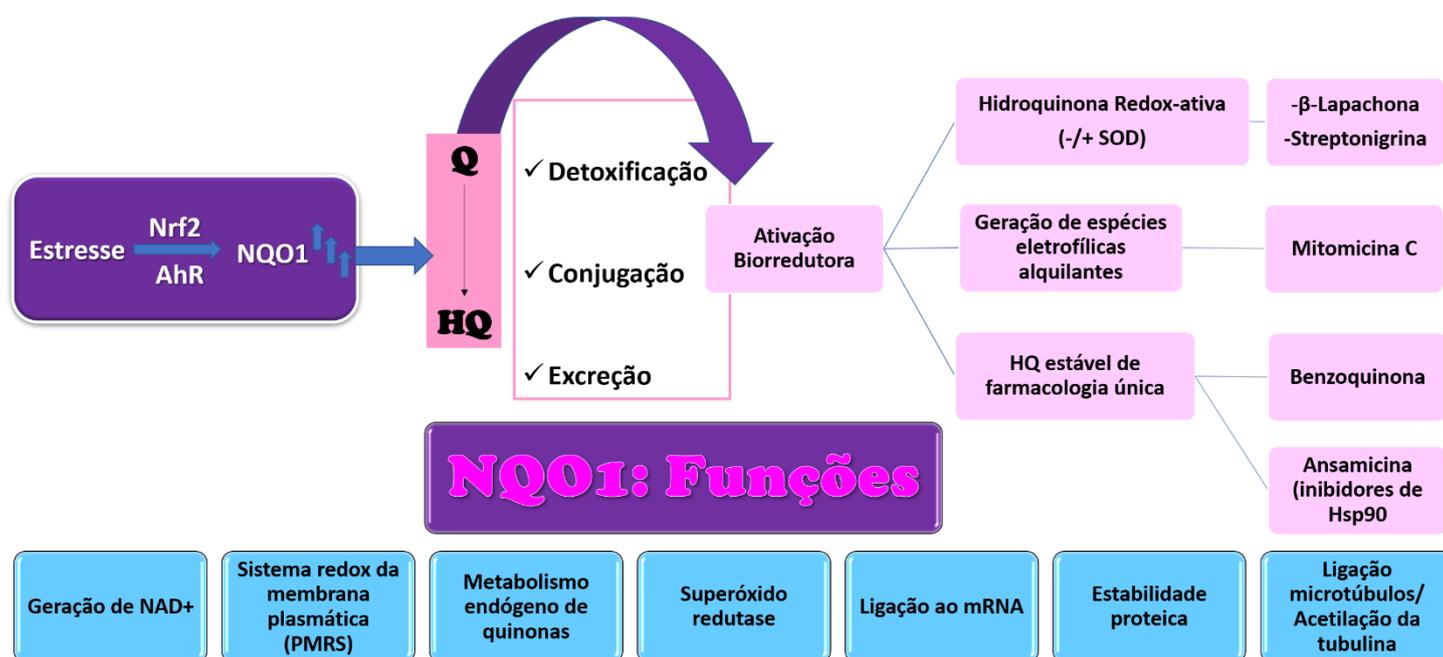
A NAD(P)H: quinona oxidoredutase 1 (NQO1) é uma redutase de dois elétrons homodimérica, dependente de flavina como co-fator, com capacidade de reduzir uma ampla gama de substratos. Em humanos, NQO1 é expressa em altos níveis no epitélio, endotélio e adipócitos, bem como em muitos tumores sólidos (SCHLAGER; POWIS, 1990; SIEGEL; ROSS, 2000; SIEGEL *et al.*, 2018).

Referida como DT-diaforase, a NQO1 é principalmente uma enzima citosólica e é caracterizada bioquimicamente por sua capacidade distinta de usar NADH ou NADPH como cofatores redutores. É frequentemente considerada como uma enzima desintoxicante devido à sua capacidade de reduzir quinonas reativas e quinonas iminas às suas formas de hidroquinonas menos ativas e menos tóxicas. NQO1 é uma enzima consideravelmente induzível que é regulada pela Sistema Nrf2/Keap1. Evidências de sua implicação nas atividades antioxidantes através da indução ou supressão dos níveis de NQO1 estão ligadas à diminuição e ao aumento da exposição ao estresse oxidativo, respectivamente (ATIA; ABDULLAH, 2020).

NQO1 tem sido tradicionalmente rotulada como uma quinona redutase, mas novos papéis para NQO1 estão surgindo onde esta enzima se liga e regula a

estabilidade de muitas moléculas biológicas importantes. Vários estudos foram publicados onde o NQO1 pode modular os níveis de proteínas reguladoras críticas, incluindo p53, p63, p73, PGC-1 α e, mais recentemente, Hif-1 α , protegendo essas proteínas da degradação proteossomal 20S (ASHER *et al.*, 2001). Na Figura 31, estão elencadas as características e funções desta tão importante enzima em amplo aspecto.

Figura 31. Representação dos processos biológicos em que a enzima NQO1 está envolvida e suas múltiplas funções.



NQO1 é constitutivamente expressa em uma variedade de tecidos em todo o corpo, mas é superexpresso em muitos tumores sólidos (JI *et al.*, 2017). Essas observações tornaram o NQO1 um alvo potencial para a ativação de certos agentes anticancerígenos biorredutores (NEMEIKAITÈ-ČÈNIENÈ *et al.*, 2020), como mitomicina C (PARKINSON *et al.*, 2013), EO9 (5-aziridinil-3-hidroximetil-2-(3-hidroxiprop-1-enil)-1-metilindol-4,7-diona) (HUSSEIN *et al.*, 2009), estreptonigrina (WALTON *et al.*, 1992; (PARKINSON *et al.*, 2013) , RH1 (2,5-diaziridinil-3-(hidroximetil)-6-metil-1,4-benzoquinona) (SCOTT *et al.*, 2011) e β -lapachona (SILVERS *et al.*, 2017).

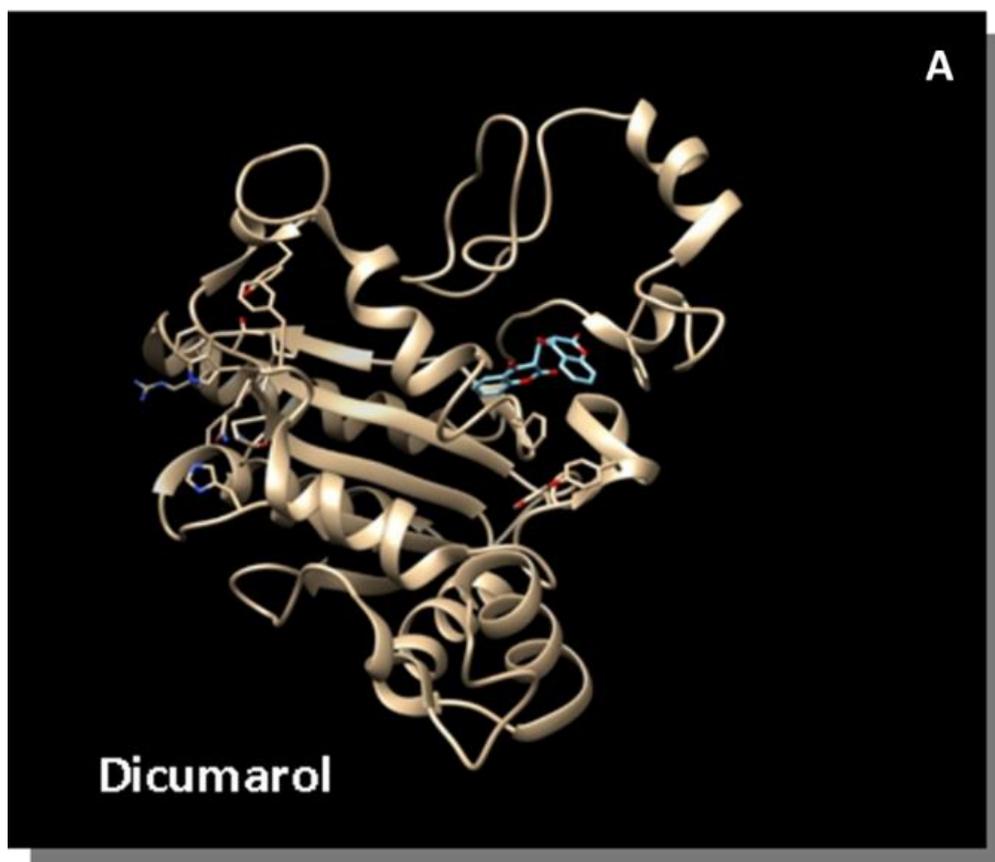
O dicumarol é frequentemente utilizado como inibidor farmacológico para estudar a função da NQO1 nas células. O anticoagulante exerce a função inibidora de

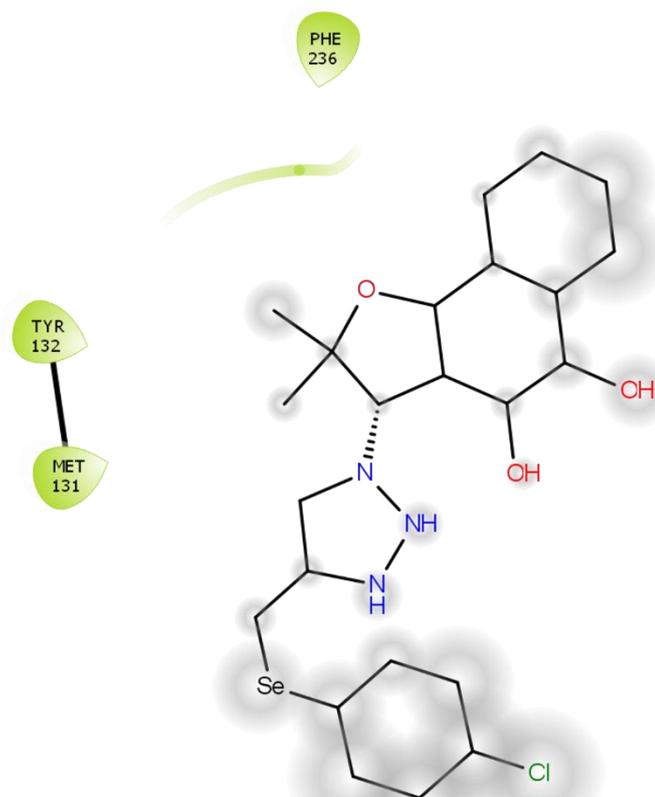
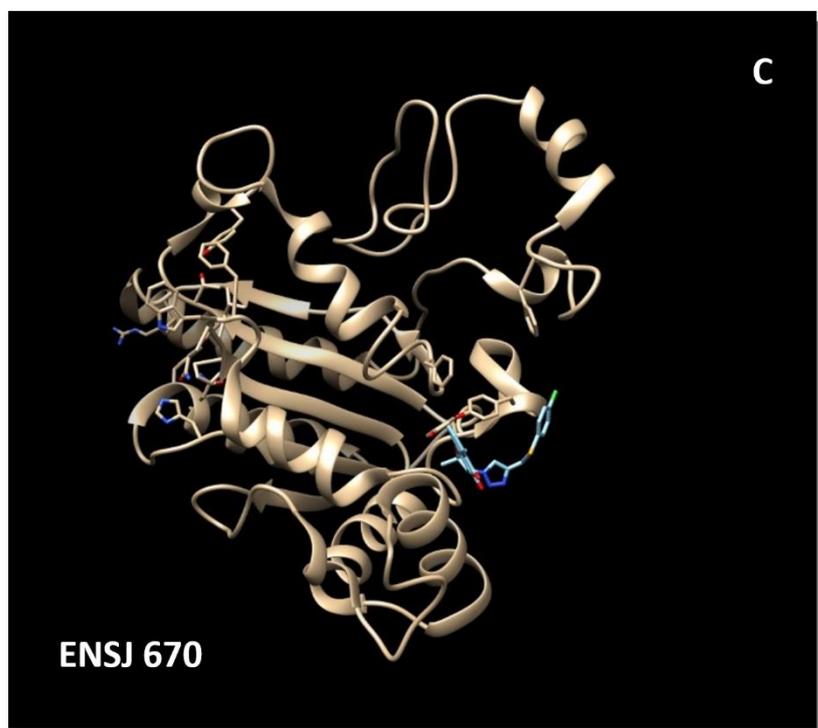
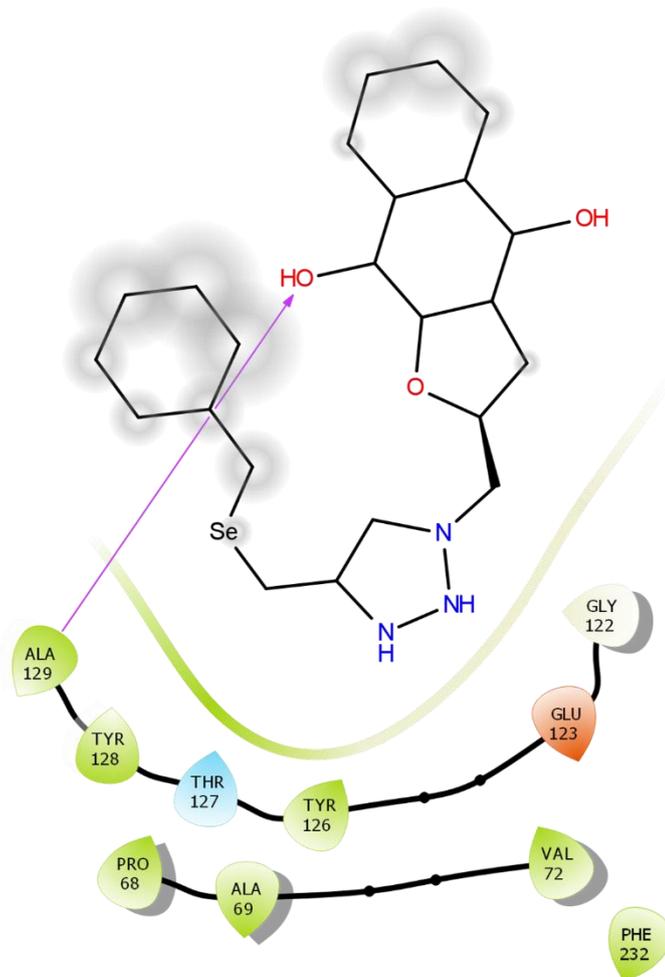
NQO1 sobrepondo-se parcialmente ao FAD, inibindo, assim, a transferência de elétrons da enzima para o substrato (SUN *et al.*, 2020). Embora sua atividade como inibidor enzimático seja descrita extensamente em literatura, seu desempenho parece não ser o ideal para a inibição, dada sua extensa ligação às proteínas (YACOBI; LAI; LEVY, 1975; SUN, Chong *et al.*), efeitos “fora do alvo”, como o desacoplamento mitocondrial (RASHED, 2021) e o aumento da produção de superóxido intracelular (ZHAO *et al.*, 2018). É, portanto, de interesse desenvolver novos inibidores de NQO1 que retenham a potência inibitória de NQO1 do dicumarol, mas não tenham seus efeitos fora do alvo desfavoráveis.

Uma vez descrita a importância fisiológica da referida enzima e sua comprovada relação com quinonas, optou-se por investigar as interações tridimensionais entre a NQO1 e duas das quinonas (uma de cada família) com os melhores potenciais antiproliferativos: DY037 (13) e ENSJ 670 (21). Utilizou-se o dicumarol como controle positivo, dado seu potencial de interação inibitório frente à molécula de interesse, já bem descrito em literatura (CHENG *et al.*, 2021). Para a representação das interações entre a enzima e as moléculas, as mesmas foram utilizadas em forma de hidroquinonas, sua forma mais estável.

Observando-se os sítios de ligação onde as moléculas se ligaram (Figura 32), infere-se que a molécula DY037 (13) apresenta comportamento similar ao padrão dicumarol. Já a ENSJ670, apresentou um padrão ligeiramente distinto das demais moléculas testadas.

Figura 32. Representação dos sítios onde se ligariam as amostras no teste de docking molecular in silico. A. Dicumarol; B. DY037 (13); C. ENSJ670 (21). As figuras 32b e 32c demonstram os aminoácidos aos quais cada molécula interagiria na enzima NQO1.





Como pode-se observar, a molécula DY037 interagiria com uma extensa série de resíduos de aminoácidos (Ala 129, Tyr 128, Thr 127, Tyr 126, Glu 123, Gly 122, Pro 68, Ala 69 e Val 72), o que pode estar relacionado ao seu maior potencial de interação. Já a amostra ENSJ670 (21) interagiria com a Tyr 132, Met 131 e Phe 232 e 236. Um apanhado comparativo entre os achados sobre as predições interativas das moléculas em estudo e de outros estudos encontra-se representado na Tabela 8.

Tabela 8. Apanhado entre as interações identificadas entre os aminoácidos da enzima NQO1, as moléculas em estudo (DY037 (13) e ENSJ 670 (21)) e outras moléculas que apresentam afinidade pela estrutura.

MOLÉCULAS	Aminoácidos											
Dicumarol (Zhang; <i>et al.</i> , 2018)	Trp105	Tyr126	Tyr128	Gly149	His161	Phe178						
Dicumarol (Shreevatsa <i>et al.</i> , 2021)	Phe106	Val108										
Orientina (Shreevatsa <i>et al.</i> , 2021)	Gly52	Tyr190										
Melatonina (Shreevatsa <i>et al.</i> , 2021)	Leu157	Asp266										
Trimetadiona	Trp105	Gly149	Gly150									
DY037	Ala129	Tyr128	Thr127	Tyr126	Glu123	Gly122	Pro68	Ala 69	Val 72			
ENSJ 670	Tyr132	Met131	Phe232	Phe236								
Isoplumbagina (Tsao <i>et al.</i> , 2020)	Tyr126	Tyr128	His161	Trp105	Phe106	Met131	Gly149	Gly150	Met154	His161	Phe178	Phe236

Shreevatsa e colaboradores (2021) pesquisaram sobre a afinidade de ligação entre diversas moléculas e a enzima NQO1. Os compostos fitoativos como Orientina, Trimethadiona, Alliin e algumas outras moléculas potentes derivadas de plantas de uma variedade de classes químicas mostraram melhor interação com a proteína NQO1, quando comparados ao inibidor de NQO1 padrão, Dicumarol. A compreensão do complexo mecanismo e funcionamento de NQO1 em estudos de câncer revela que essa proteína se apresenta tanto como supressora de tumor quanto

como promotora de tumor em diferentes contextos. Os estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular revelaram que o fitobioativo, Orientina, apresentou maior interação com NQO1. A Orientina é uma molécula de flavona com propriedades anticancerígenas e também apresenta propriedades anti-inflamatórias, neuroprotetoras, radioprotetoras, vasodilatadoras, cardioprotetoras, antivirais, antibacterianas, antidepressivas, antiadipogênese, antinociceptivas e várias propriedades antioxidantes (LAM *et al.*, 2016).

Utilizando a técnica de Molecular *Docking (in silico)*, o estudo mencionado analisou a interação entre a proteína NQO1 e moléculas ligantes. A molécula (ligante), Dicumarol, exibiu uma afinidade de ligação de -6,9 Kcal/mol e duas ligações de hidrogênio com a proteína NQO1 nos resíduos de ligação Phe 106 e Val 108, respectivamente. Da mesma forma, a melatonina exibe uma afinidade de ligação de -5,6 Kcal/mol e forma duas ligações de hidrogênio com Leu 157 e Asp 266, respectivamente. A Orientina mostra a afinidade de ligação de -6,6 Kcal/mol e forma duas ligações de hidrogênio com os resíduos de ligação Gly 52 e Tyr 190. Trimetadiona exibe uma afinidade de ligação de -6 Kcal/mol e forma quatro ligações de hidrogênio com os resíduos de ligação Trp 105, Gly 149 e Gly 150. Os resultados obtidos no estudo realizado concluíram que os aminoácidos críticos que auxiliam na formação de interações são Leu 220, Val 183 e Pro 219, que desempenham um papel proeminente no sítio de ligação não competitivo. Os estudos sobre flavonóides implicaram sua potência como agente antitumoral. A partir disso, levantou-se a hipótese de que o uso desses fitobioativos pode afetar a expressão de NQO1 em células cancerígenas. Os autores concluíram que as plantas ayurvédicas indianas consistem em vários tipos de moléculas de quinona, que têm uma potência de inibição de NQO1 (SHREEVATSA *et al.*, 2021).

Um outro estudo liderado por Tsao e colaboradores (2020) demonstraram a habilidade da *p*-quinona Isoplumbagina em se ligar ao sítio ativo enzimático de homodímeros NQO1 através de ligações de hidrogênio com resíduos Tyr126, Tyr128, ou His161 e interações de van der Waals com os resíduos Trp105, Phe106, Met131, Gly149, Gly150, Met154, His161, Phe178 e Phe236. Em comparação com a interação relatada em outro estudo entre NQO1 e seu inibidor dicumarol, os resíduos Trp 105, Tyr 126, Tyr 128, Gly 149, His 161 e Phe 178 estavam envolvidos (ZHANG; *et al.*, 2018).

A Tabela 9 representa numericamente a força de ligação entre as moléculas teste e a proteína/ enzima NQO1, estimado por *docking* molecular. Neste teste, utilizou-se, além do Dicumarol, moléculas análogas às moléculas-teste. É possível observar que a *p*-quinona DY037 (13) apresentou energia de ligação mais intensa que a *p*-quinona α -lapachona (07), e, a *o*-quinona ENSJ 670 (21), similarmente, demonstrou melhor potencial que o controle, a Nor- β -lapachona (10). Além disso, verifica-se também que, em comparação com o inibidor da NQO1, Dicumarol, e as duas moléculas teste apresentaram potencial de ligação significativo.

Tabela 9. Representação numérica da força de ligação entre as moléculas testadas e a enzima NQO1. O valor da energia de ligação ΔG é demonstrado em menos kcal/mol

Alvo	NQO1		
Mol	ΔG		Size
Dicumarol	-7,5	MÉDIA	-7,25
Dicumarol	-7	RELAÇÃO DROGA/CONTROLE	1,00
DY037	-7,8	MÉDIA	-7,90
DY037	-8	RELAÇÃO DROGA/CONTROLE	1,09
ENSJ670	-7,6	MÉDIA	-7,80
ENSJ670	-8	RELAÇÃO DROGA/CONTROLE	1,08
α -LAPACHONA	-6,1	MÉDIA	-6,10
α -LAPACHONA	-6,1	RELAÇÃO DROGA/CONTROLE	0,84
NOR- β -LAPACHONA	-6,4	MÉDIA	-6,40
NOR- β -LAPACHONA	-6,4	RELAÇÃO DROGA/CONTROLE	0,88

Viabilidade das Quinonas DY 037 (13) e ENSJ 670 (21) Após Indução da Inibição Enzimática da NQO1 por Dicumarol

Ao inferir a inibição causada por Dicumarol e afinidade das moléculas testadas *in silico* no ensaio anterior, procedeu-se com a mensuração indireta da atividade das quinonas em células HCT-116 quando incubadas com o inibidor enzimático Dicumarol e a molécula citoprotetora N-Acetilcisteína. O ensaio teve em

vista a comparação entre os grupos com e sem pré-tratamento. Utilizou-se a Menadiona como controle positivo neste ensaio.

Um dos papéis mais citados para NQO1 é sua ação protetora contra os efeitos deletérios oxidativos e arilantes das quinonas e muitos estudos utilizaram menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) em sistemas celulares e outros modelos para demonstrar estes fatos (NEBERT *et al.*, 2000; ATIA; ABDULLAH, 2020). O mecanismo de detoxificação de quinonas por NQO1 é baseado na redução direta, mediada por dois elétrons, de quinonas a hidroquinonas (LEE *et al.*, 2021) removendo quinonas eletrofílicas, ignorando radicais semiquinonas e a geração de espécies reativas de oxigênio por meio de reações de ciclagem redox. A estrutura cristalina e o mecanismo de redução de dois elétrons catalisada por NQO1 foram claramente delineados por Bianchet e colaboradores (A BIANCHET *et al.*, 2004; ROSS & SIEGEL, 2021).

Visando nortear a atividade das quinonas em estudo baseando a influência ou não da enzima NQO1 sobre sua ação antiproliferativa, dividiu-se o experimento em três grupos. Inicialmente três placas foram produzidas e nelas inseridas células HCT-116 em concentração padrão. A primeira e segunda placas foram mantidas por 48 horas em estufa. Apenas no dia seguinte, após adesão celular, incubou-se a primeira placa com dicumarol por 4 horas em uma concentração que não afetasse as células tumorais, de maneira a influenciar no resultado da toxicidade. Após incubação, foi realizada a lavagem da placa com PBS e seguiu-se o tratamento convencional das duas placas em diluição seriada com os compostos (DY037 (13), ENSJ670 (21) e Menadiona. A terceira placa foi incubada por 24 horas para adesão celular e após este período foi pré-tratada por 24 horas com N-Acetilcisteína. Após incubação, foi realizada a lavagem da placa com PBS e seguiu-se o tratamento convencional das duas placas em diluição seriada com os compostos (DY037 (13), ENSJ670 (21) e Menadiona.

Ao conflitar os resultados obtidos dos diferentes tratamentos (Tabela 10), observa-se, inicialmente, que o comportamento da menadiona pode ser modulado, como citado no parágrafo anterior, a partir da supressão da enzima NQO1, neste caso com o possível bloqueio pelo Dicumarol, ou de medidas citoprotetoras como o uso da NAC. É possível verificar na Tabela 10 que a CI_{50} que a menadiona apresentou em células de cólon no grupo sem tratamento (39,36 μ M) é praticamente duas vezes maior que no grupo tratado com Dicumarol (22,29 μ M) e que a CI_{50} em células “protegidas” aumentou em pelo menos 20% (48,45 μ M). As moléculas-teste

demonstraram resultados similares aos do controle no sentido de diminuir ou aumentar as suas CI_{50} nos pré-tratamentos. Como já demonstrado anteriormente pelo ensaio do MTT em 24 horas, mesmo sem os pré-tratamentos, A *p*-quinona DY037 (13) apresentou resultados de CI_{50} mais elevados que a *o*-quinona ENSJ 670. A *p*-quinona testada em HCT-116 sem nenhum pré-tratamento demonstrou uma concentração inibitória de 30,64 μ M. Após o tratamento com Dicumarol, a mesma molécula passou a apresentar uma CI_{50} quase três vezes menor (11,05 μ M) e após tratamento com o fator citoprotetor, sua CI_{50} elevou-se em até 30% (42,72 μ M). Estes achados demonstram que pode haver influência da ação das quinonas de acordo com a modulação dos eventos redox e da proteção celular conferida pela enzima NQO1. Os resultados verificados em relação a ENSJ 670 (21) são similares em proporção aos encontrados na outra quinona testada. Sua CI_{50} foi reduzida à metade em células pré-tratadas com Dicumarol, bem como houve um aumento da mesma em células tratadas com NAC.

Tabela 10. Demonstração da modulação enzimática da NQO1 prevista através de um grupo de células tratadas apenas com as amostras teste ou pré-tratadas com Dicumarol ou N-Acetilcisteína.

MODULAÇÃO DA ENZIMA NQO1 * CI_{50} em μ M			
COMPOSTOS	NENHUM PRÉ TRATAMENTO	PRÉ- TRATAMENTO NAC	PRÉ-TRATAMENTO DICUMAROL
DY037	30,64 (26,11-35,94)	42,72 (26,88-67,89)	11,05 (6,840-17,85)
ENSJ 670	6,66 (5,65-7,87)	8,79 (6,19-12,63)	2,96 (2,27-3,87)
MENADIONA	39,36 (36,89-42,01)	48,45 (42,63-55,16)	22,29 (19,42-25,77)
		Proteção antioxidante	Inibição da enzima NQO1

Os resultados em todas as moléculas testadas revelam um aumento das concentrações inibitórias no pré-tratamento com o NAC, assim como uma diminuição das mesmas em placas pré-tratadas com Dicumarol, o que pode ser indicativo de que

a proteção antioxidante somada à atividade da NQO1 ajudam a célula a melhor administrar os eventos oxidativos e também que ao tentar inibir a enzima NQO1 evidencia-se seu importante papel na proteção de eventos celulares citotóxicos, como já bem descrito anteriormente.

Uma grande variedade de estudos evidencia a relevância da NQO1 em diversos processos orgânicos, tanto em células normais quanto em células em processo de morte e carcinogênese; dentre eles: Ahn e colaboradores (2006) relataram que NQO1 foi necessária para o fator de necrose tumoral (TNF) e outros estímulos inflamatórios induzidos pela ativação de IKK, NF- κ B, JNK, p38 MAPK, p44/p42 MAPK e Akt. Além disso, as expressões induzidas por TNF do gene direcionado a NF- κ B implicado na proliferação celular, antiapoptose e invasão também foram correlacionadas com os níveis de NQO1, e esses resultados foram validados em camundongos nocaute de NQO1 (AHN *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2020). Além disso, foi demonstrado que NQO1 pode atuar como chaperona, prevenindo a degradação mediada por proteassoma do fator α induzível por hipóxia (HIF-1 α) e indicando que seus efeitos promotores de tumor estão em parte associados ao HIF-1 α . De fato, foi evidenciado que o knockdown de NQO1 mediado por RNAi suprime a sinalização de HIF-1 α e o crescimento tumoral de células humanas de câncer colorretal e de mama (OH *et al.*, 2016).

Madajewski e colaboradores (2015) determinaram que o NQO1 é crítico para o crescimento do tumor em locais de câncer de pulmão de células não pequenas primárias e secundárias porque a depleção da expressão de NQO1 *in vitro* causa um aumento na formação de EROs, inibe o crescimento independente de ancoragem, aumenta a sensibilização para morte celular por anoikis e diminui invasão celular. Esse resultado foi confirmado em um modelo de xenoenxerto de tumor pulmonar. É importante notar que a superexpressão de NQO1 está ligada a fenótipos de células-tronco cancerígenas, pois a depleção de NQO1 diminui significativamente a proporção de células cancerígenas com alto teor de aldeído desidrogenase (ALDH) na população tumoral (MADAJEWSKI *et al.*, 2015)

Buranrat e colaboradores (2010) evidenciaram que a inibição de NQO1 com dicumarol potencializou intensamente a citotoxicidade da gencitabina para colangiocarcinoma, um tipo raro de câncer de fígado. Além disso, linhagens celulares *knockdown* de RNAi e *knock-in* NQO1 foram usadas para validar o papel de NQO1 na resistência à quimioterapia. Os resultados mostraram que o *knockdown* de NQO1

sensibiliza o colangiosarcoma para a uma série de agentes quimioterápicos comumente utilizados, incluindo 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicina e gencitabina, enquanto quando a NQO1 se encontra superexpressa, confere uma proteção das células frente aos mesmos agentes quimioterápicos, indicando a possibilidade de terapia combinada utilizando-se agentes citotóxicos tradicionais de amplo espectro (Zeekpudsa *et al.*, 2014). A inibição de NQO1 por RNAi inibe significativamente a capacidade de formação de colônias de células tumorais hepáticas e células paradas na fase G1, causando inibição da proliferação celular por aumento da expressão de p21 e diminuição da expressão de ciclina D1. Significativamente, o silenciamento de NQO1 também suprime a metástase de colangiossarcoma por aumento da expressão de inibidores teciduais de metaloproteinasas 1 (TIMP1) e diminuição da expressão de matrix metaloproteinase 9 (MMP9). (BUTSRI *et al.*, 2017). Desta forma, a NQO1 desempenha um papel importante na sobrevivência, proliferação, invasão, metástase e angiogênese das células cancerígenas, bem como na quimiossensibilidade, por meio da interação com várias vias de sinalização oncogênica.

A partir das análises apresentadas e comparação com dados já demonstrados em literatura, infere-se que a amostra ENSJ670 (21) demonstra potencial antitumoral interessante. No entanto, devido à falta de seletividade entre células cancerosas e não cancerosas, o derivado avaliado pode ter potencial terapêutico limitado como agente anticancerígeno se administrado como monoterapia, contudo, pode ser útil em combinação com outros agentes antitumorais. Uma estratégia para superar a toxicidade intrínseca das quinonas pode ser o uso de derivados mais estáveis em seu estado reduzido e, portanto, menos propensos a iniciar a formação de radicais e danificar células indiscriminadamente. Portanto, essas ideias do mecanismo também reforçam a necessidade de mais estudos com outros derivados de nor- β -lapachona (10) para determinar a relação estrutura-atividade entre as atividades terapêutica e toxicológica. Em linhas gerais, este trabalho é uma importante contribuição para o desenvolvimento de novos medicamentos antitumorais do grupo lapachona, substância atualmente em múltiplos ensaios clínicos de fase II como monoterapia e em combinação com outros medicamentos citotóxicos.

Além disso, seria interessante no futuro analisar os dados biológicos por meio de modelagem farmacofórica e estudos de QSAR 3D (relação estrutura-atividade quantitativa) para elucidar e fundamentar o mecanismo de ação em comparação com os resultados de estudos de *docking* molecular e dinâmica

molecular, inclusive, abordando elementos anteriores e posteriores à NQO1 na via estudada, como NRF2 e Superóxido dismutase (SOD) considerando o inibidor padrão, o Dicumarol.

CONCLUSÕES

O estudo revelou dados representativos sobre a possibilidade de síntese de quinonas associadas a triazóis com presença de calcogênios (selênio e enxofre), hibridizados através de química *click*, e demonstrou atividade antiproliferativa da molécula ENSJ670 (21), uma molécula híbrida com grupo substituinte cloro, detentora de potente atividade antitumoral *in vitro* no tratamento de células de câncer de cólon (HCT-116), de maneira dependente de concentração. Apresenta seletividade para linhagens tumorais, nas quais induz morte celular por apoptose associada a um aumento do estresse oxidativo e possível interação com a enzima NQO1. Salienta-se a importância de futuros estudos *in vivo* para avaliação do potencial terapêutico desta molécula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A ALY, Ashraf; A HASSAN, Alaa; MOHAMED, Nasr K; RAMADAN, Mohamed; EL-AAL, Amal s Abd; BRÄSE, Stefan; NIEGER, Martin. Synthesis of quinone-based heterocycles of broad-spectrum anticancer activity. Journal Of Chemical Research, [S.L.], p. 174751982095973, 24 nov. 2020. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1747519820959737>.

A BIANCHET, Mario; FAIG, Margarita; AMZEL, L.Mario. Structure and Mechanism of NAD[P]H: quinone acceptor oxidoreductases (nqo). Methods In Enzymology, [S.L.], p. 144-174, 2004. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(04\)82009-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(04)82009-3).

AGUDELO, Daniel; BOURASSA, Philippe; BÉRUBÉ, Gervais; TAJMIR-RIahi, Heidar-Ali. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: structural features and biological implications. International Journal Of Biological Macromolecules, [S.L.], v. 66, p. 144-150, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.028>.

AHN, Kwang Seok; SETHI, Gautam; JAIN, Abhinav K.; JAISWAL, Anil K.; AGGARWAL, Bharat B.. Genetic Deletion of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 abrogates activation of nuclear factor-kb, ikb α kinase, c-jun n-terminal kinase, akt, p38, and p44/42 mitogen-activated protein kinases and potentiates apoptosis. Journal Of Biological Chemistry, [S.L.], v. 281, n. 29, p. 19798-19808, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m601162200>.

AIRES, André de Lima; XIMENES, Eulália Camelo Pessoa Azevedo; SILVA, Renata Alexandre Ramos; BARBOSA, Vanessa Xavier; GÓES, Alexandre José da Silva; PEIXOTO, Christina Alves; SOUZA, Valdênia Maria Oliveira; ALBUQUERQUE, Mônica Camelo Pessôa de Azevedo. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult Schistosoma mansoni BH strain worms. Experimental Parasitology, [S.L.], v. 142, p. 83-90, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.010>.

Akai, Nobuyuki, et al. "Water Assisted Photo-Oxidation from Hydroquinone to p-Benzoquinone in a Solid Ne Matrix". Journal of Photochemistry and Photobiology A:

Chemistry, vol. 223, no 2–3, setembro de 2011, p. 182–88. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.08.016>.

ALLEN, Elizabeth; JABOUILLE, Arnaud; RIVERA, Lee B.; LODEWIJCKX, Inge; MISSIAEN, Rindert; STERI, Veronica; FEYEN, Kevin; TAWNEY, Jaime; HANAHAN, Douglas; MICHAEL, Iacovos P.. Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. *Science Translational Medicine*, [S.L.], v. 9, n. 385, p. 1-13, 12 abr. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aak9679>.

ALVES, Ana Catarina et al. Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: insights from in vitro and in silico studies. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-11, 24 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-06445-z>.

Alves, Giullyane Gonçalves, e Thiago Pereira de Abreu. “ESTRESSE OXIDATIVO E SUA INFLUÊNCIA NA PATOGÊNESE DA DOENÇA DE ALZHEIMER”. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, vol. 7, no 9, setembro de 2021, p. 915–28. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.51891/rease.v7i9.2294>.

Antonioni, Ambra, et al. “Redox Homeostasis in Sport: Do Athletes Really Need Antioxidant Support?” *Research in Sports Medicine*, vol. 27, no 2, abril de 2019, p. 147–65. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1080/15438627.2018.1563899>.

ARAÚJO, A.J.; SOUZA, A.A. de; SILVA JÚNIOR, E.N. da; MARINHO-FILHO, J.D.B.; MOURA, M.A.B.F. de; ROCHA, D.D.; VASCONCELLOS, M.C.; COSTA, C.O.; PESSOA, C.; MORAES, M.O. de. Growth inhibitory effects of 3'-nitro-3-phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: a redox-dependent mechanism. *Toxicology In Vitro*, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 585-594, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.02.003>.

Armendáriz-Vidales, Georgina, et al. “Nature of Electrogenerated Intermediates in Nitro-Substituted Nor- β -Lapachones: The Structure of Radical Species during Successive Electron Transfer in Multiredox Centers”. *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 79, no 11, junho de 2014, p. 5201–08. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1021/jo500787q>.

ARMENDÁRIZ-VIDALES, Georgina; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, Lindsay S.; GONZÁLEZ, Felipe J.; SOUZA, Antonio A. de; ABREU, Fabiane C. de; JARDIM, Guilherme A. M.; SILVA, Eufrânio N. da; GOULART, Marília O. F.; FRONTANA, Carlos. Nature of Electrogenerated Intermediates in Nitro-Substituted Nor- β -lapachones: the structure of radical species during successive electron transfer in multiredox centers. *The Journal Of Organic Chemistry*, [S.L.], v. 79, n. 11, p. 5201-5208, 7 maio 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo500787q>.

ASHER, Gad; LOTEM, Joseph; COHEN, Batya; SACHS, Leo; SHAUL, Yosef. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 1188-1193, 23 jan. 2001. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.98.3.1188>.

Asaf Roy, Blum Shany, Miller-Lotan Rachel and Levy P. Andrew, BXT-51072 and the Prevention of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury, *Letters in Drug Design & Discovery* 2007; 4(2). <https://dx.doi.org/10.2174/157018007779422479>.

ATIA, Ahmed; ABDULLAH, Azman. NQO1 Enzyme and its Role in Cellular Protection; an Insight. *Iberoamerican Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 4, p. 306-313, 4 jun. 2020. Zenodo. <http://dx.doi.org/10.5281/ZENODO.3877528>.

ATIA, Ahmed; ALRAWAIQ, Nadia; ABDULLAH, Azman. A Review of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (nqo1); a multifunctional antioxidant enzyme. *Journal Of Applied Pharmaceutical Science*, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 118-122, 30 dez. 2014. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <http://dx.doi.org/10.7324/japs.2014.41220>.

AZZI, Angelo. α -Tocopherol in the Pathogenesis of Atherosclerosis: one molecule, several functions. *Antioxidant And Redox Regulation Of Genes*, [S.L.], p. 359-379, 2000. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012636670-9/50018-0>.

BAHIA, Samara Ben B. B.; REIS, Wallace J.; JARDIM, Guilherme A. M.; SOUTO, Francielly T.; SIMONE, Carlos A. de; GATTO, Claudia C.; MENNA-BARRETO, Rubem F. S.; CASTRO, Solange L. de; CAVALCANTI, Bruno C.; PESSOA, Claudia. Molecular hybridization as a powerful tool towards multitarget quinoidal systems: synthesis, trypanocidal and antitumor activities of naphthoquinone-based 5-iodo-1,4-

disubstituted-, 1,4- and 1,5-disubstituted-1,2,3-triazoles. *Medchemcomm*, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 1555-1563, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6md00216a>.

Barbosa, Kiriague Barra Ferreira, et al. "Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios". *Revista de Nutrição*, vol. 23, no 4, agosto de 2010, p. 629–43. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

Barbosa, Kiriague Barra Ferreira, et al. "Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios". *Revista de Nutrição*, vol. 23, no 4, agosto de 2010, p. 629–43. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

Barreiro, E. J.; da Silva, J. E. M.; Fraga, C. A. M.; *Quim. Nova* 1996, 19, 641.

BEARNAIS-BARBRY, Stéphane. **Etude de la photoréactivité de la méthoxy-p-quinone et de phényl-p-benzoquinones en solution**. 2001. 155 f. Tese (Doutorado) - Curso de Chimie Organique, Ecole Doctorale Des Sciences Chimiques, Université Sciences Et Technologies - Bordeaux I, Bordeaux, 2001. Disponível em: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006202/document>. Acesso em: 02 ago. 2021.

BEY, Erik A.; WUERZBERGER-DAVIS, Shelly M.; PINK, John J.; YANG, Chin-Rang; ARAKI, Shinako; REINICKE, Kathryn E.; BENTLE, Melissa S.; DONG, Ying; CATALDO, Eva; CRISWELL, Tracy L.. Mornings with art, lessons learned: feedback regulation, restriction threshold biology, and redundancy govern molecular stress responses. *Journal Of Cellular Physiology*, [S.L.], v. 209, n. 3, p. 604-610, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20783>.

BIRBEN, Esra; SAHINER, Umit Murat; SACKESEN, Cansin; ERZURUM, Serpil; KALAYCI, Omer. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>.

BOLTON, Judy L.; DUNLAP, Tareisha L.; DIETZ, Birgit M.. Formation and biological targets of botanical o-quinones. *Food And Chemical Toxicology*, [S.L.], v. 120, p. 700-707, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.050>.

BOLTON, Judy L.; DUNLAP, Tareisha. Formation and Biological Targets of Quinones: cytotoxic versus cytoprotective effects. *Chemical Research In Toxicology*, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 13-37, 29 set. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00256>.

BONANDI, Elisa; CHRISTODOULOU, Michael S.; FUMAGALLI, Gaia; PERDICCHIA, Dario; RASTELLI, Giulio; PASSARELLA, Daniele. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. *Drug Discovery Today*, [S.L.], v. 22, n. 10, p. 1572-1581, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.014>.

Brandão, Geraldo Célio, et al. "Antimalarial Naphthoquinones. Synthesis via *Click* Chemistry, in Vitro Activity, Docking to Pf DHODH and SAR of Lapachol-Based Compounds". *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 145, fevereiro de 2018, p. 191–205. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.051>.

BRANDÃO, Hugo N.; DAVID, Juceni P.; COUTO, Ricardo D.; NASCIMENTO, Jorge A. P.; DAVID, Jorge M.. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, [S.L.], v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000600026>.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

BUI, Jack D; SCHREIBER, Robert D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?. *Current Opinion In Immunology*, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 203-208, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2007.02.001>.

BURANRAT, Benjaporn. Dicoumarol enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in high NQO1-expressing cholangiocarcinoma cells. *World Journal Of Gastroenterology*, [S.L.], v. 16, n. 19, p. 2362, 2010. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i19.2362>.

BUTSRI, Siriwoot; KUKONGVIRIYAPAN, Veerapol; SENGGUNPRAI, Laddawan; KONGPETCH, Sarinya; ZEEKPUDSA, Ponsilp; PRAWAN, Auemduan. Downregulation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 inhibits proliferation, cell cycle

and migration of cholangiocarcinoma cells. *Oncology Letters*, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 4540-4548, 29 mar. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2017.5951>.

CALLAHAN, M K; WILLIAMSON, P; A SCHLEGEL, R. Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death & Differentiation*, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 645-653, 27 jun. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4400690>.

CAMPOS-XOLALPA, Nimsi; PÉREZ-RAMOS, Julia; ESQUIVEL-CAMPOS, Ana; PÉREZ-GONZÁLEZ, Cuauhtemoc; SÁNCHEZ-PÉREZ, Leonor; PÉREZ-GUTIÉRREZ, Salud. Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Quinones Isolated from Different Organism. *Cytotoxicity [Working Title]*, [S.L.], p. 1-37, 27 jan. 2021. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.95598>.

Cappetta, D.; De Angelis, A.; Sapio, L.; Prezioso, L.; Illiano, M.; Quaini, F.; Rossi, F.; Berrino, L.; Naviglio, S.; Urbanek, K. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 2017. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

CAPPETTA, Donato; ANGELIS, Antonella de; SAPIO, Luigi; PREZIOSO, Lucia; ILLIANO, Michela; QUAINI, Federico; ROSSI, Francesco; BERRINO, Liberato; NAVIGLIO, Silvio; URBANEK, Konrad. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: a common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1521020>.

CARMELIET, Peter; JAIN, Rakesh K.. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, [S.L.], v. 473, n. 7347, p. 298-307, maio 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10144>.

CAVALCANTI, Bruno C.; CABRAL, Igor O.; RODRIGUES, Felipe A. R.; BARROS, Francisco W. A.; ROCHA, Danilo D.; MAGALHÃES, Hemerson I. F.; MOURA, Dinara J.; SAFFI, Jenifer; HENRIQUES, João A. P.; CARVALHO, Tatiane S. C.. Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of dna repair. *Journal Of The*

Brazilian Chemical Society, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 145-163, jan. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532013000100019>.

CHAVEZ, Carolina et al. The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects DNA from hydroxyl radicals. eLIFE, San Diego, p. 1-20, 01 out. 2019. <https://doi.org/10.7554/eLife.47682.001>

CHEN, Daniel S.; MELLMAN, Ira. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature, [S.L.], v. 541, n. 7637, p. 321-330, jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature21349>.

CHEN, Run-Ze; YANG, Fei; ZHANG, Min; SUN, Zhi-Gang; ZHANG, Nan. Cellular and Molecular Mechanisms of Pristimerin in Cancer Therapy: recent advances. Frontiers In Oncology, [S.L.], v. 11, p. 1-19, 7 maio 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.671548>.

CHEN, Xueping. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**. Manitoba, p. 376-386. fev. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4350122/pdf/NRR-7-376.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2021.

CHENG, Sheng-Tao; HU, Jie-Li; REN, Ji-Hua; YU, Hai-Bo; ZHONG, Shan; WONG, Vincent Kam Wai; LAW, Betty Yuen Kwan; CHEN, Wei-Xian; XU, Hong-Mei; ZHANG, Zhen-Zhen. Dicoumarol, an NQO1 inhibitor, blocks cccDNA transcription by promoting degradation of HBx. Journal Of Hepatology, [S.L.], v. 74, n. 3, p. 522-534, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.019>.

COSTA, Marcília P.; FEITOSA, Anderson C. S.; OLIVEIRA, Fátima C. E.; CAVALCANTI, Bruno C.; DIAS, Gleiston G.; CAETANO, Ewerton W. S.; SALES, Francisco A. M.; FREIRE, Valder N.; FIORE, Stefano di; FISCHER, Rainer. Encapsulation of nor- β -lapachone into poly(d,l)-lactide-co-glycolide (PLGA) microcapsules: full characterization, computational details and cytotoxic activity against human cancer cell lines. Med. Chem. Commun., [S.L.], v. 8, n. 10, p. 1993-2002, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7md00196g>.

CRUZ, Eduardo Henrique Guimarães da. UMA NOVA ABORDAGEM NO DESENVOLVIMENTO DE POTENTES QUINONAS BIOATIVAS CONTENDO DOIS CENTROS REDOX:: síntese e aspectos mecanísticos. 2017. 235 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

Cruz, Vanessa S., et al. "β Lapachone blocks the cell cycle and induces apoptosis in canine osteosarcoma cells". *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 38, no 12, dezembro de 2018, p. 2224–32. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5524>.

SILVA JÚNIOR, Eufrânio N. da; GUIMARÃES, Tiago T.; MENNA-BARRETO, Rubem F.s.; PINTO, Maria do Carmo F.R.; SIMONE, Carlos A. de; PESSOA, Claudia; CAVALCANTI, Bruno C.; SABINO, José R.; ANDRADE, Carlos Kleber Z.; GOULART, Marília O.F.. The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: synthesis of imidazolic anthraquinones, nor-β-lapachone derivatives and β-lapachone-based 1,2,3-triazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 3224-3230, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.029>.

SILVA, Eufrânio N. da; MELO, Isadora M.M. de; DIOGO, Emilay B.T.; COSTA, Verenice A.; SOUZA FILHO, José D. de; VALENÇA, Wagner O.; CAMARA, Celso A.; OLIVEIRA, Ronaldo N. de; ARAUJO, Alexandre S. de; EMERY, Flávio S.. On the search for potential anti-*Trypanosoma cruzi* drugs: synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-methylamino and 1,2,3-triazolic naphthoquinoidal compounds obtained by click chemistry reactions. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 52, p. 304-312, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.039>.

DANHIER, Pierre; BAŃSKI, Piotr; PAYEN, Valéry L; GRASSO, Debora; IPPOLITO, Luigi; SONVEAUX, Pierre; PORPORATO, Paolo e. Cancer metabolism in space and time: beyond the warburg effect. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Bioenergetics*, [S.L.], v. 1858, n. 8, p. 556-572, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.02.001>.

de Castro, Solange L., et al. "Synthesis of Quinoidal Molecules: Strategies towards Bioactive Compounds with an Emphasis on Lapachones". *European Journal of*

Medicinal Chemistry, vol. 69, novembro de 2013, p. 678–700. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.07.057>.

DECKER, M.. Hybrid Molecules Incorporating Natural Products: applications in cancer therapy, neurodegenerative disorders and beyond. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 10, p. 1464-1475, 1 abr. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986711795328355>.

Devi Bala, Balasubramanian, et al. “Sequential Synthesis of Amino-1,4-Naphthoquinone-Appended Triazoles and Triazole-Chromene Hybrids and Their Antimycobacterial Evaluation”. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 85, outubro de 2014, p. 737–46. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.009>.

DEVI, S.s.; MEHENDALE, H.M.. Quinone. *Encyclopedia Of Toxicology*, [S.L.], p. 26-28, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00350-x>.

Dheer, Divya, et al. “Medicinal Attributes of 1,2,3-Triazoles: Current Developments”. *Bioorganic Chemistry*, vol. 71, abril de 2017, p. 30–54. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.01.010>.

DIAS, Rosane Borges. ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL. 2018. 103 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Patologia, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

do Nascimento, Wilson, et al. “Synthesis of 2-(1H-1,2,3-Triazol-1-Yl)-1,4-Naphthoquinones from 2-Azido-1,4-Naphthoquinone and Terminal Alkynes”. *Synthesis*, vol. 2011, no 20, outubro de 2011, p. 3220–24. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1055/s-0030-1260172>.

EREZ, Ayelet; DEBERARDINIS, Ralph J.. Metabolic dysregulation in monogenic disorders and cancer — finding method in madness. *Nature Reviews Cancer*, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 440-448, 18 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3949>.

ERNSTER, Lars. [56] DT diaphorase. Methods In Enzymology, [S.L.], p. 309-317, 1967. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10059-1](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(67)10059-1).

FISCHER, Hartmut; DEREU, Norbert. Mechanism of the Catalytic Reduction of Hydroperoxides by Ebselen: a selenium - 77 nmr study. Bulletin Des Sociétés Chimiques Belges, [S.L.], v. 96, n. 10, p. 757-768, 1 set. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bscb.19870961006>.

Flowers, Lynn, et al. "DNA Strand Scission by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon o - Quinones: Role of Reactive Oxygen Species, Cu(II)/Cu(I) Redox Cycling, and o - Semiquinone Anion Radicals ,". Biochemistry, vol. 36, no 28, julho de 1997, p. 8640–48. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1021/bi970367p>.

GALLUZZI, Lorenzo; BUQUÉ, Aitziber; KEPP, Oliver; ZITVOGEL, Laurence; KROEMER, Guido. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. Cancer Cell, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 690-714, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.012>.

Gandhi, Sonia, e Andrey Y. Abramov. "Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration". Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2012, 2012, p. 1–11. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1155/2012/428010>.

GARKAVTSEV, I.; CHAUHAN, V. P.; WONG, H. K.; MUKHOPADHYAY, A.; GLICKSMAN, M. A.; PETERSON, R. T.; JAIN, R. K.. Dehydro- -lapachone, a plant product with antivasular activity. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, [S.L.], v. 108, n. 28, p. 11596-11601, 27 jun. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1104225108>.

Gholampour, Maryam, et al. "Click Chemistry-Assisted Synthesis of Novel Aminonaphthoquinone-1,2,3-Triazole Hybrids and Investigation of Their Cytotoxicity and Cancer Cell Cycle Alterations". Bioorganic Chemistry, vol. 88, julho de 2019, p. 102967. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102967>.

Glorieux, C., Sandoval, J. M., Dejeans, N., Ameye, G., Poirel, H. A., Verrax, J., & Calderon, P. B. (2016). Overexpression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and genomic gain of the NQO1 locus modulates breast cancer cell sensitivity to quinones. Life Sciences, 145, 57–65. doi:10.1016/j.lfs.2015.12.017

Gontijo, Vanessa Silva, et al. "Molecular Hybridization as a Tool in the Design of Multi-Target Directed Drug Candidates for Neurodegenerative Diseases". *Current Neuropharmacology*, vol. 18, no 5, maio de 2020, p. 348–407. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.2174/1385272823666191021124443>.

Griffith, Owen W. "Biologic and Pharmacologic Regulation of Mammalian Glutathione Synthesis". *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, no 9–10, novembro de 1999, p. 922–35. DOI.org (Crossref), [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00176-8).

Guimarães, Tiago T., et al. "Potent Naphthoquinones against Antimony-Sensitive and -Resistant Leishmania Parasites: Synthesis of Novel α - and nor- α -Lapachone-Based 1,2,3-Triazoles by Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition". *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 63, maio de 2013, p. 523–30. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.038>.

Haefeli, Roman H., et al. "NQO1-Dependent Redox Cycling of Idebenone: Effects on Cellular Redox Potential and Energy Levels". *PLoS ONE*, organizado por Annalisa Pastore, vol. 6, no 3, março de 2011, p. e17963. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017963>.

HALLIWELL, B.. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 25 out. 2007. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bst0351147>.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C.. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5. ed. Oxford: Oxford Academic, 2015.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>.

HE, Yi; JING, Yizhou; WEI, Fang; TANG, Yanyan; YANG, Liting; LUO, Jia; YANG, Pei; NI, Qianxi; PANG, Jinmeng; LIAO, Qianjin. Long non-coding RNA PVT1 predicts poor prognosis and induces radioresistance by regulating DNA repair and cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death & Disease*, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1-13, fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0265-y>.

HERNÁNDEZ, Dulce María; MOURA, Maria Aline B. F. de; VALENCIA, Drochss Pettry; GONZÁLEZ, Felipe J.; GONZÁLEZ, Ignacio; ABREU, Fabiane C. de; SILVA JÚNIOR, Eufrânio N. da; FERREIRA, Vitor F.; PINTO, Antônio Ventura; GOULART, Marília O. F.. Inner reorganization during the radical–biradical transition in a nor- β -lapachone derivative possessing two redox centers. *Organic & Biomolecular Chemistry*, [S.L.], v. 6, n. 18, p. 3414, 2008. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b806271d>.

HUSSEIN, D; HOLT, S V; BROOKES, K e; KLYMENKO, T; ADAMSKI, J K; A HOGG,; ESTLIN, E J; WARD, T; DIVE, C; MAKIN, G W J. Preclinical efficacy of the bioreductive alkylating agent RH1 against paediatric tumours. *British Journal Of Cancer*, [S.L.], v. 101, n. 1, p. 55-63, 2 jun. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605100>.

Ighodaro, Osasenaga Macdonald. “Molecular Pathways Associated with Oxidative Stress in Diabetes Mellitus”. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 108, dezembro de 2018, p. 656–62. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058>.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019.

Ivanova D, Bakalova R, Lazarova D, Gadjeva V, Zhelev Z. The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies. *Adv Clin Exp Med*. 2013 Nov-Dec;22(6):899-908. PMID: 24431321.

JADVAR, Hossein; ALAVI, Abass; GAMBHIR, Sanjiv S.. 18F-FDG Uptake in Lung, Breast, and Colon Cancers: molecular biology correlates and disease characterization. *Journal Of Nuclear Medicine*, [S.L.], v. 50, n. 11, p. 1820-1827, 16 out. 2009. Society of Nuclear Medicine. <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.108.054098>.

Jali, Bigyan R., et al. “A Brief Review: Biological Implications of Naphthoquinone Derivatives”. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, vol. 11, no 8, 2018, p. 3698. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00679.0>.

JALI, Bigyan R.; BEHURA, R.; BARIK, Soumya. R.; PARVEEN, S.; MOHANTY, Spandan. P.; DAS, R.. A Brief Review: biological implications of naphthoquinone

derivatives. Research Journal Of Pharmacy And Technology, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 3698, 2018. A and V Publications. <http://dx.doi.org/10.5958/0974-360x.2018.00679.0>.

JAMIER, Vincent; BA, Lalla A.; JACOB, Claus. Selenium- and Tellurium-Containing Multifunctional Redox Agents as Biochemical Redox Modulators with Selective Cytotoxicity. Chemistry - A European Journal, [S.L.], v. 16, n. 36, p. 10920-10928, 30 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201000884>.

Jardim, Guilherme A. M., et al. "Synthesis of a Phenazine-Based 1,2,3-Triazole from Naturally Occurring Naphthoquinone Designed as a Probe for Cd²⁺ Ions: Synthesis of Phenazine-Based 1,2,3-Triazole". European Journal of Organic Chemistry, vol. 2015, no 4, fevereiro de 2015, p. 703–09. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/ejoc.201403011>.

Jardim, Guilherme, et al. "Synthesis of Selenium-Quinone Hybrid Compounds with Potential Antitumor Activity via Rh-Catalyzed C-H Bond Activation and *Click* Reactions". Molecules, vol. 23, no 1, dezembro de 2017, p. 83. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/molecules23010083>.

JI, Meiyong; JIN, Aihua; SUN, Jie; CUI, Xuelian; YANG, Yang; CHEN, Liyan; LIN, Zhenhua. Clinicopathological implications of NQO1 overexpression in the prognosis of pancreatic adenocarcinoma. Oncology Letters, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 2996-3002, 7 mar. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2017.5821>.

Jiang, Xiangyi, et al. "Recent Applications of *Click* Chemistry in Drug Discovery". Expert Opinion on Drug Discovery, vol. 14, no 8, agosto de 2019, p. 779–89. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1614910>.

KALGUTKAR, Amit; GARDNER, Iain; OBACH, R.; SHAFFER, Christopher; CALLEGARI, Ernesto; HENNE, Kirk; MUTLIB, Abdul; DALVIE, Deepak; LEE, Jae; NAKAI, Yasuhiro. A Comprehensive Listing of Bioactivation Pathways of Organic Functional Groups. Current Drug Metabolism, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 161-225, 1 jun. 2005. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389200054021799>.

KAUSAR, Saima; WANG, Feng; CUI, Hongjuan. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases.

Cells, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 1-19, 17 dez. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells7120274>.

KLAUNIG, J e; XU, Y; ISENBERG, J s; BACHOWSKI, S; KOLAJA, K L; JIANG, J; STEVENSON, D e; WALBORG, E F. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. Environmental Health Perspectives, [S.L.], v. 106, n. 1, p. 289-295, fev. 1998. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.98106s1289>.

KNECHT, Andrea L.; GOODALE, Britton C.; TRUONG, Lisa; SIMONICH, Michael T.; SWANSON, Annika J.; MATZKE, Melissa M.; ANDERSON, Kim A.; WATERS, Katrina M.; TANGUAY, Robert L.. Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 271, n. 2, p. 266-275, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.006>.

Kolb, Hartmuth C., et al. "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions". *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, no 11, junho de 2001, p. 2004–21. DOI.org (Crossref), [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).

KRISHNAN, Preethi; BASTOW, Kenneth F.. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives α -lapachone and β -lapachone. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 187-198, 19 mar. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s002800000221>.

KROEMER, Guido; SENOVILLA, Laura; GALLUZZI, Lorenzo; ANDRÉ, Fabrice; ZITVOGEL, Laurence. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nature Medicine*, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 1128-1138, out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3944>.

KUNG, Hsiu-Ni; CHIEN, Chung-Liang; CHAU, Gar-Yang; DON, Ming-Jaw; LU, Kuo-Shyan; CHAU, Yat-Pang. Involvement of NO/cGMP signaling in the apoptotic and anti-angiogenic effects of β -lapachone on endothelial cells in vitro. *Journal Of Cellular Physiology*, [S.L.], v. 211, n. 2, p. 522-532, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20963>.

KUNG, Hsiu-Ni; WENG, Tsai-Yun; LIU, Yu-Lin; LU, Kuo-Shyan; CHAU, Yat-Pang. Sulindac Compounds Facilitate the Cytotoxicity of β -Lapachone by Up-Regulation of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase in Human Lung Cancer Cells. *Plos One*, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1-15, 5 fev. 2014. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088122>.

LAM, Kit Ying; LING, Anna Pick Kiong; KOH, Rhun Yian; WONG, Ying Pei; SAY, Yee How. A Review on Medicinal Properties of Orientin. **Advances In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 2016, p. 1-9, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4104595>.

LEE, Jong Hyun; MOHAN, Chakrabhavi Dhananjaya; SHANMUGAM, Muthu K.; RANGAPPA, Shobith; SETHI, Gautam; SIVEEN, Kodappully Sivaraman; CHINNATHAMBI, Arunachalam; ALAHMADI, Tahani Awad; ALHARBI, Sulaiman Ali; BASAPPA, Salundi. Vitexin abrogates invasion and survival of hepatocellular carcinoma cells through targeting STAT3 signaling pathway. *Biochimie*, [S.L.], v. 175, p. 58-68, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.006>.

LEE, Wang-Soo; HAM, Woojin; KIM, Jaetaek. Roles of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 in diverse diseases. *Life*, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1301, 26 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/life11121301>.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman; 2013.

LI, Peng et al. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, [S.L.], v. 91, n. 4, p. 479-489, nov. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80434-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80434-1).

Li, Xiangde, et al. "Polyphyllin VII induces apoptosis and autophagy via mediating H₂O₂ levels and the JNK pathway in human osteosarcoma U2OS cells". *Oncology Reports*, vol. 45, no 1, novembro de 2020, p. 180–90. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3892/or.2020.7866>.

Liu, Yue, et al. "Peroxiredoxin V Reduces β -Lapachone-Induced Apoptosis of Colon Cancer Cells". *Anticancer Research*, vol. 39, no 7, julho de 2019, p. 3677–86. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.21873/anticancer.13516>.

Liu, Zai-Qun. "Enhancing Antioxidant Effect against Peroxyl Radical-Induced Oxidation of DNA: Linking with Ferrocene Moiety!" *The Chemical Record*, vol. 19, no 12, dezembro de 2019, p. 2385–97. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/tcr.201800201>.

MACHADO, Tallita Marques. PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTICÂNCER DE DERIVADOS DE LAPACHOL E UMBELIFERONA. 2018. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

MADAJEWSKI, Brian; BOATMAN, Michael A.; CHAKRABARTI, Gaurab; BOOTHMAN, David A.; BEY, Erik A.. Depleting Tumor-NQO1 Potentiates Anoikis and Inhibits Growth of NSCLC. *Molecular Cancer Research*, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 14-25, 9 nov. 2015. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-15-0207-t>.

MANICKAM, Manoj; BOGGU, Pulla Reddy; CHO, Jungsuk; NAM, Yeo Jin; LEE, Seung Jin; JUNG, Sang-Hun. Investigation of chemical reactivity of 2-alkoxy-1,4-naphthoquinones and their anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, [S.L.], v. 28, n. 11, p. 2023-2028, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.060>.

MANISALIDIS, Ioannis; STAVROPOULOU, Elisavet; STAVROPOULOS, Agathangelos; BEZIRTZOGLU, Eugenia. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: a review. *Frontiers In Public Health*, [S.L.], v. 8, p. 1-39, 20 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2020.00014>.

MARINELLO, Jessica et al. Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: from early studies to new perspectives. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 3480, 6 nov. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19113480>.

Marques, Lucas Bonfim, et al. "Lapachol Acetylglycosylation Enhances Its Cytotoxic and Pro-Apoptotic Activities in HL60 Cells". *Toxicology in Vitro*, vol. 65, junho de 2020, p. 104772. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104772>.

MARR, J. J.; DOCAMPO, R.. Chemotherapy for Chagas' Disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. *Clinical Infectious Diseases*, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 884-903, 1 nov. 1986. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/8.6.884>.

MARTÍN-NAVARRO, Carmen M.; LÓPEZ-ARENCIBIA, Atteneri; LORENZO-MORALES, Jacob; ORAMAS-ROYO, Sandra; HERNÁNDEZ-MOLINA, Rita; ESTÉVEZ-BRAUN, Ana; RAVELO, Ángel G.; VALLADARES, Basilio; PIÑERO, José E.. Acanthamoeba castellanii Neff: in vitro activity against the trophozoite stage of a natural sesquiterpene and a synthetic cobalt(ii):lapachol complex. *Experimental Parasitology*, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 106-108, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.12.015>.

MARTINS-TEIXEIRA, Maristela B.; CARVALHO, Ivone. Antitumour Anthracyclines: progress and perspectives. *Chemmedchem*, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 933-948, 7 maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202000131>.

MENG, Xuan-Yu; ZHANG, Hong-Xing; MEZEI, Mihaly; CUI, Meng. Molecular Docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 146-157, 1 jun. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/157340911795677602>.

MICALLEF, Isaac; BARON, Byron. Doxorubicin: An Overview of the Anti-Cancer and Chemoresistance Mechanisms. *Annals Of Clinical Toxicology, Malta*, v. 3, n. 2, p. 1-12, 23 nov. 2020.

MOISEEVA, A. A.. Anthracycline Derivatives and Their Anticancer Activity. *Ineos Open*, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 9-18, fev. 2019. A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences - INEOS RAS. <http://dx.doi.org/10.32931/io1902r>.

MORRIS, Garrett M.; LIM-WILBY, Marguerita. Molecular Docking. *Methods In Molecular Biology*, [S.L.], p. 365-382, 2008. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19.

NASCIMENTO, Vanessa; CORDEIRO, Pâmella da Silva; SILVA, Rafael Cordeiro e. Ebselen: a brief review of its antioxidant capacity and biological applications. *Revista Virtual de Química*, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1894-1907, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20190132>.

NEBERT, Daniel W et al. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 65-85, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00310-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00310-x).

NEMEIKAITĖ-ČE NIENĖ, Aušra; FARLAUSKAS, Jonas; MISEVIČIENĖ, Lina; MAROZIENĖ, Audronė; JONUŠIENĖ, Violeta; LESANAVIČIUS, Mindaugas; ČENAS, Narimantas. Aerobic Cytotoxicity of Aromatic N-Oxides: the role of nad(p)h. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 21, n. 22, p. 8754, 19 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21228754>.

NIAZ, Kamal; KHAN, Fazlullah; SHAH, Muhammad Ajmal. Analysis of quinonoids. **Recent Advances In Natural Products Analysis**, [S.L.], p. 749-766, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816455-6.00025-1>.

NOGUEIRA, Cristina W.; ZENI, Gilson; ROCHA, João B. T.. Organoselenium and Organotellurium Compounds: •• toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 104, n. 12, p. 6255-6286, 3 nov. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr0406559>.

OCTAVIA, Yanti; TOCCHETTI, Carlo G.; GABRIELSON, Kathleen L.; JANSSENS, Stefan; CRIJNS, Harry J.; MOENS, An L.. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal Of Molecular And Cellular Cardiology**, [S.L.], v. 52, n. 6, p. 1213-1225, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>.

OH, Eun-Taex; KIM, Jung-Whan; KIM, Joon Mee; KIM, Soo Jung; LEE, Jae-Seon; HONG, Soon-Sun; GOODWIN, Justin; RUTHENBORG, Robin J.; JUNG, Myung Gu; LEE, Hae-June. NQO1 inhibits proteasome-mediated degradation of HIF-1 α . **Nature Communications**, Incheon, v. 7, n. 1, p. 1-14, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13593>.

ØVERBYE, Anders; HOLSÆTER, Ann Mari; FUSSER, Markus; IKALKO-BASNET, Nataša; IVERSEN, Tore-Geir; TORGENSEN, Maria Lyngaas; SØNSTEVOLD, Tonje; ENGEBRAATEN, Olav; FLATMARK, Kjersti; MÆLANDSMO, Gunhild Mari. Ceramide-containing liposomes with doxorubicin: time and cell-dependent effect of c6 and c12 ceramide. *Oncotarget*, [S.L.], v. 8, n. 44, p. 76921-76934, 12 ago. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.20217>.

PADILHA, Marcos Daniel Mendes; COSTA, Ludmilla Ferreira. ASPECTOS MOLECULARES DA IMUNOTERAPIA E EFICÁCIA IMUNOMODULADORA DOS CHECKPOINTS COMO TERAPIAS ANTI-CÂNCER. *Saúde em Foco: Temas Contemporâneos - Volume 3*, [S.L.], p. 102-114, 2020. Editora Científica Digital. <http://dx.doi.org/10.37885/201001771>.

Panis, Carolina, et al. "Níveis De Estresse Oxidativo Ao Diagnóstico E Sua Associação Com O Perfil De Sobrevida Em Pacientes Portadoras De Câncer De Mama Operáveis Em Estádios Iniciais: Um Estudo Piloto". *Acta Elit Salutis*, vol. 4, no 1, junho de 2021, p. 1–13. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.48075/aes.v4i1.27415>.

PARDEE, Arthur; LI, You; LI, Chiang. Cancer Therapy with β -Lapachone. *Current Cancer Drug Targets*, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 227-242, 1 set. 2002. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568009023333854>.

PARK, Eun Jung; CHOI, Kyeong Sook; KWON, Taeg Kyu. β -Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. *Chemico-Biological Interactions*, [S.L.], v. 189, n. 1-2, p. 37-44, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.10.013>.

PARKINSON, Elizabeth I. et al. Efficient NQO1 Substrates are Potent and Selective Anticancer Agents. *Acs Chemical Biology*, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 2173-2183, 22 ago. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cb4005832>.

PARKINSON, Elizabeth I.; BAIR, Joseph S.; CISMESIA, Megan; HERGENROTHER, Paul J.. Efficient NQO1 Substrates are Potent and Selective Anticancer Agents. *Acs Chemical Biology*, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 2173-2183, 22 ago. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cb4005832>.

PAULSEN, Candice E.; CARROLL, Kate S.. Cysteine-Mediated Redox Signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical Reviews*, [S.L.], v. 113, n. 7, p. 4633-4679, 20 mar. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr300163e>.

PAVLOVA, Natalya N.; THOMPSON, Craig B.. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 27-47, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.

Peoples, Jessica N., et al. "Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Heart Disease". *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 51, no 12, dezembro de 2019, p. 1–13. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7>.

Pereyra, Carolina Escardó, et al. "The Diverse Mechanisms and Anticancer Potential of Naphthoquinones". *Cancer Cell International*, vol.19, no 1, dezembro de 2019, p. 207. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0925-8>.

PERILLO, Bruno et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 192-203, fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>.

PERRYMAN, Alexander L.; YU, Weixuan; WANG, Xin; EKINS, Sean; FORLI, Stefano; LI, Shao-Gang; FREUNDLICH, Joel S.; TONGE, Peter J.; OLSON, Arthur J.. A Virtual Screen Discovers Novel, Fragment-Sized Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis InhA. *Journal Of Chemical Information And Modeling*, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 645-659, 17 fev. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci500672v>.

PISANI, David E. et al. Relationship between inhibition of mitochondrial respiration by naphthoquinones, their antitumor activity, and their redox potential. *Biochemical Pharmacology*, [S.L.], v. 35, n. 21, p. 3791-3798, nov. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90666-0](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(86)90666-0).

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 97, p. 55-74, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

Planchon, Sarah M., et al. "β-Lapachone-Induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Involvement of NQO1/Xip3". *Experimental Cell Research*, vol. 267, no 1, julho de 2001, p. 95–106. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5234>.

POLJŁAK, Borut; DAHMANE, Raja. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research And Practice*, [S.L.], v. 2012, p. 1-4, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/135206>.

PRASHER, Parteek; SHARMA, Mousmee; ZACCONI, Flavia; GUPTA, Gaurav; ALJABALI, Alaa A.A.; MISHRA, Vijay; TAMB UWALA, Murtaza M.; KAPOOR, Deepak N.; NEGI, Poonam; PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli. Synthesis and Anticancer Properties of 'Azole' Based Chemotherapeutics as Emerging Chemical Moieties: a comprehensive review. *Current Organic Chemistry*, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 654-668, mar. 2021. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1385272824999200820152501>.

Qiu, Han-Yue, et al. "Naphthoquinones: A Continuing Source for Discovery of Therapeutic Antineoplastic Agents". *Chemical Biology & Drug Design*, vol. 91, no 3, março de 2018, p. 681–90. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1111/cbdd.13141>.

QIU, Han-Yue; WANG, Peng-Fei; LIN, Hong-Yan; TANG, Cheng-Yi; ZHU, Hai-Liang; YANG, Yong-Hua. Naphthoquinones: a continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. *Chemical Biology & Drug Design*, [S.L.], v. 91, n. 3, p. 681-690, 28 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13141>.

RASHED, Khaled Nabih Zaki. Biological Evidences of Dicoumarol: a review. *Plantae Scientia*, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 121-124, 22 mar. 2021. Plantae Scientia. <http://dx.doi.org/10.32439/ps.v4i2.121-124>.

RENOU, S. G.; ASIS, S. E.; ABASOLO, M. I.; BEKERMANN, D. G.; BRUNO, A. M.. Monoarylhydrazones of α-Lapachone: synthesis, chemical properties and antineoplastic activity.. *Cheminform*, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 690-695, 10 fev. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chin.200406220>.

RIVANKAR, Sangeeta. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal Of Cancer Research And Therapeutics*, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 853, 2014. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.139267>.

ROGINSKY, Vitaly; BARSUKOVA, Tatyana. Kinetics of oxidation of hydroquinones by molecular oxygen. Effect of superoxide dismutase. *Journal Of The Chemical Society, Perkin Transactions 2*, [S.L.], n. 7, p. 1575-1582, 2000. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b000538j>.

ROSS, David; SIEGEL, David. NQO1 in protection against oxidative stress. *Current Opinion In Toxicology*, [S.L.], v. 7, p. 67-72, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.005>.

ROSS, David; SIEGEL, David. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. *Redox Biology*, [S.L.], v. 41, p. 101950, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2021.101950>.

Salehi, Bahare, et al. "Antioxidants: Positive or Negative Actors?" *Biomolecules*, vol. 8, no 4, outubro de 2018, p. 124. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/biom8040124>.

Salehi, Bahare, et al. "Avocado–Soybean Unsaponifiables: A Panoply of Potentialities to Be Exploited". *Biomolecules*, vol. 10, no 1, janeiro de 2020, p. 130. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/biom10010130>.

SANTOS, Evelyne Alves dos. Estudo da atividade citotóxica da alfa-lapachona e seu derivado tetrahidropirano. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SATOH, Takumi; MCKERCHER, Scott R.; LIPTON, Stuart A.. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radical Biology And Medicine*, [S.L.], v. 65, p. 645-657, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.022>.

SCARPA, Emanuele S.; BONFILI, Laura; ELEUTERI, Anna M.; LATEANA, Anna; BRUGÈ, Francesca; BERTOLI, Enrico; LITTARRU, Gian Paolo; CACCIAMANI, Tiziana. ATP independent proteasomal degradation of NQO1 in BL cell lines. *Biochimie*, [S.L.], v. 94, n. 5, p. 1242-1249, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.014>.

SCHLAGER, John J.; POWIS, Garth. Cytosolic NAD(P)H: (quinone-acceptor)oxidoreductase in human normal and tumor tissue. *International Journal Of Cancer*, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 403-409, 15 mar. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910450304>.

SCOTT, Katherine Ann; BARNES, John; WHITEHEAD, Roger Clive; STRATFORD, Ian James; NOLAN, Karen Ann. Inhibitors of NQO1: identification of compounds more potent than dicoumarol without associated off-target effects. *Biochemical Pharmacology*, [S.L.], v. 81, n. 3, p. 355-363, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.10.011>.

SHARIFI-RAD, Mehdi; KUMAR, Nanjangud V. Anil; ZUCCA, Paolo; VARONI, Elena Maria; DINI, Luciana; PANZARINI, Elisa; RAJKOVIC, Jovana; FOKOU, Patrick Valere Tsouh; AZZINI, Elena; PELUSO, Ilaria. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers In Physiology*, [S.L.], v. 11, p. 1-21, 2 jul. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>.

SHARMA, A.; RAJAPPA, M.; SAXENA, A.; SHARMA, M.. Antioxidant status in advanced cervical cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiation. *British Journal Of Biomedical Science*, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 23-27, jan. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09674845.2007.11732751>.

SHREEVATSA, Bhargav; DHARMASHEKARA, Chandan; SWAMY, Vikas Halasumane; GOWDA, Meghana V.; ACHAR, Raghu Ram; KAMESHWAR, Vivek Hamse; THIMMULAPPA, Rajesh Kumar; SYED, Asad; ELGORBAN, Abdallah M.; AL-REJAIE, Salim S.. Virtual Screening for Potential Phytobioactives as Therapeutic Leads to Inhibit NQO1 for Selective Anticancer Therapy. *Molecules*, [S.L.], v. 26, n. 22, p. 6863, 14 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26226863>.

SIEGEL, David; DEHN, Donna D.; BOKATZIAN, Samantha S.; QUINN, Kevin; BACKOS, Donald S.; FRANCESCO, Andrea di; BERNIER, Michel; REISDORPH, Nichole; CABO, Rafael de; ROSS, David. Redox modulation of NQO1. *Plos One*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-17, 3 jan. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0190717>.

SIEGEL, David; ROSS, David. Immunodetection of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (nqo1) in human tissues¹¹this work is dedicated to the memory of professor lars ernster, who provided us with enthusiastic support, scientific insight, and constant encouragement in our many interactions.. *Free Radical Biology And Medicine*, [S.L.], v. 29, n. 3-4, p. 246-253, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00310-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00310-5).

SIES, Helmut; PARNHAM, Michael J.. Potential therapeutic use of ebselen for COVID-19 and other respiratory viral infections. *Free Radical Biology And Medicine*, [S.L.], v. 156, p. 107-112, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.032>.

SILVA, Milton N. da; FERREIRA, Vítor F.; SOUZA, Maria Cecília B. V. de. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. *Química Nova*, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 407-416, maio 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000300019>.

SILVA, Raphael S.F.; LEITÃO, Gilda G.; BRUM, Thiago B.; LOBATO, Ana Paula G.; PINTO, Maria do Carmo F.R.; PINTO, Antonio V.. Applications of counter-current chromatography in organic synthesis purification of heterocyclic derivatives of lapachol. *Journal Of Chromatography A*, [S.L.], v. 1151, n. 1-2, p. 197-202, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.066>.

SILVERS, Molly A.; DEJA, Stanislaw; SINGH, Naveen; EGNATCHIK, Robert A.; SUDDERTH, Jessica; LUO, Xiuquan; BEG, Muhammad S.; BURGESS, Shawn C.; DEBERARDINIS, Ralph J.; BOOTHMAN, David A.. The NQO1 bioactivatable drug, β -lapachone, alters the redox state of NQO1+ pancreatic cancer cells, causing perturbation in central carbon metabolism. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 292, n. 44, p. 18203-18216, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m117.813923>.

SIMABUCO, Fernando M.; MORALE, Mirian G.; PAVAN, Isadora C.B.; MORELLI, Ana P.; SILVA, Fernando R.; TAMURA, Rodrigo E.. P53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget*, [S.L.], v. 9, n. 34, p. 23780-23823, 4 maio 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.25267>.

SOUSA, Eliane Teixeira; LOPES, Wilson A.; ANDRADE, Jailson B. de. SOURCES, FORMATION, REACTIVITY AND DETERMINATION OF QUINONES IN THE ATMOSPHERE. *Química Nova*, Salvador, Bahia, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160034>.

SOUZA, Cynthia Domingues de; FELFILI, Jeanine Maria. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 135-142, mar. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062006000100013>.

SOUZA, Jéssica Pauline Coelho. O uso do alfa herpesvírus humano 1 oncolítico como estratégia terapêutica no controle de células metastáticas do câncer de mama. 2019. 133 f. TCC (Doutorado) - Curso de Especialização em Microbiologia, Icb - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/32820>. Acesso em: 04 set. 2021.

SULLIVAN, Lucas B; CHANDEL, Navdeep s. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism*, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-12, 28 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>.

SUN, Chong et al. A pharmacological review of dicoumarol: an old natural anticoagulant agent. *Pharmacological Research*, [S.L.], v. 160, p. 105193, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105193>.

TAFANI, Marco; SANSONE, Luigi; LIMANA, Federica; ARCANGELI, Tania; SANTIS, Elena de; POLESE, Milena; FINI, Massimo; RUSSO, Matteo A.. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, [S.L.], v. 2016, p. 1-18, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3907147>.

TAKASAGO, T.; PETERS, E. E.; GRAHAM, D. I.; MASAYASU, H.; MACRAE, I. M.. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *British Journal Of Pharmacology*, [S.L.], v. 122, n. 6, p. 1251-1256, nov. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0701426>.

Takayama, Yukiya, et al. "Click Chemistry as a Tool for Cell Engineering and Drug Delivery". *Molecules*, vol. 24, no 1, janeiro de 2019, p. 172. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/molecules24010172>.

TANDON, Vishnu Kumar; KUMAR, Sandeep. Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. *Expert Opinion On Therapeutic Patents*, [S.L.], v. 23, n. 9, p. 1087-1108, 8 maio 2013. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2013.798303>.

TASDELEN, Mehmet Atilla; KISKAN, Baris; YAGCI, Yusuf. Externally stimulated click reactions for macromolecular syntheses. **Progress In Polymer Science**, [S.L.], v. 52, p. 19-78, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.09.003>.

TEHRANI, Maliheh Barazandeh; EMANI, Parisa; REZAEI, Zahra; KHOSHNEVISZADEH, Mahsima; EBRAHIMI, Mohaddeseh; EDRAKI, Najmeh; MAHDAVI, Mohammad; LARIJANI, Bagher; RANJBAR, Sara; FOROUMADI, Alireza. Phthalimide-1,2,3-triazole hybrid compounds as tyrosinase inhibitors; synthesis, biological evaluation and molecular docking analysis. *Journal Of Molecular Structure*, [S.L.], v. 1176, p. 86-93, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.08.033>.

THOMSON, Ronald H.. Distribution of naturally occurring quinones. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 70-73, abr. 1991. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01974983>.

Thomson, R. H. *Em Naturally Occurring Quinones*; Academic Press: New York, 1971;

Thompson, R. H. *Em Naturally Occuring Quinones IV: Recents Advances*; Champman & Hall: London, 1997.

THOMSON, R. H.. *Naturally Occurring Quinones IV*. Springer Netherlands, [S.L.], v. 4, p. 1-746, 1996. Springer Netherlands. <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-1551-0>.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J.. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal Of Computational Chemistry*, [S.L.], p. 1-12, 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334>.

TSAO, Yen-Chi; CHANG, Yu-Jung; WANG, Chun-Hsien; CHEN, Linyi. Discovery of Isoplumbagin as a Novel NQO1 Substrate and Anti-Cancer Quinone. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 4378, 19 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21124378>.

TSIZIN, Yu. S.; CHERNYAK, S. A.. Biologically active heterocyclic quinones (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 435-445, jun. 1982. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00759748>.

Uzma, Nazia, et al. "Hepatoprotective, Immunomodulatory, and Anti-Inflammatory Activities of Selenocystine in Experimental Liver Injury of Rats". *Biological Trace Element Research*, vol. 142, no 3, setembro de 2011, p. 723–34. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8807-x>.

VANOVA, Donika; ZHELEV, Zhivko; GETSOV, Plamen; NIKOLOVA, Biliana; AOKI, Ichio; HIGASHI, Tatsuya; BAKALOVA, Rumiana. Vitamin K: redox-modulation, prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect. *Redox Biology*, [S.L.], v. 16, p. 352-358, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.013>.

VYAS, Sejal; ZAGANJOR, Elma; HAIGIS, Marcia C.. Mitochondria and Cancer. *Cell*, [S.L.], v. 166, n. 3, p. 555-566, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002>.

VYAS, Sejal; ZAGANJOR, Elma; HAIGIS, Marcia C.. Mitochondria and Cancer. *Cell*, [S.L.], v. 166, n. 3, p. 555-566, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002>.

WALLACE, Douglas C.. Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 685-698, 24 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3365>.

WALTON, Michael I.; BIBBY, Michael C.; DOUBLE, John A.; PLUMB, Jane A.; WORKMAN, Paul. DT-diaphorase activity correlates with sensitivity to the indoloquinone EO9 in mouse and human colon carcinomas. *European Journal Of Cancer*, [S.L.], v. 28, n. 10, p. 1597-1600, jan. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049\(92\)90049-8](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049(92)90049-8).

Wang, Xueshun, et al. "Discovery of Bioactive Molecules from CuAAC *Click*-Chemistry-Based Combinatorial Libraries". *Drug Discovery Today*, vol. 21, no 1, janeiro de 2016, p. 118–32. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.08.004>.

Wang, Lei, et al. "Selenium-Containing Thioredoxin Reductase Inhibitor Ethaselen Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer to Radiotherapy". *Anti-Cancer Drugs*, vol. 22, no 8, setembro de 2011, p. 732–40. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32834618bc>.

Wang, Zhiren, et al. "Design, Synthesis, and Evaluation of Multitarget-Directed Selenium-Containing Clioquinol Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease". *ACS Chemical Neuroscience*, vol. 5, no 10, outubro de 2014, p. 952–62. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1021/cn500119g>.

WARBURG, Otto; WIND, Franz; NEGELEIN, Erwin. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *Journal Of General Physiology*, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 519-530, 7 mar. 1927. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.

Xia, Jiahao, et al. "Selenium-Functionalized Graphene Oxide That Can Modulate the Balance of Reactive Oxygen Species". *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no 25, junho de 2017, p. 21413–21. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1021/acsami.7b05951>.

XIA, Mengfang; ZHANG, Yazhuo; JIN, Ke; LU, Zitong; ZENG, Zhaoyang; XIONG, Wei. Communication between mitochondria and other organelles: a brand-new perspective on mitochondria in cancer. *Cell & Bioscience*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-19, 19 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13578-019-0289-8>.

YACOBI, Avraham; LAI, Chii-Ming; LEVY, Gerhard. Comparative Pharmacokinetics of Coumarin Anticoagulants XV: relationship between pharmacokinetics of dicumarol and warfarin in rats. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, [S.L.], v. 64, n. 12, p. 1995-1998, dez. 1975. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600641220>.

YOO, Donghyuck et al. Glutathione-Depleting Pro-Oxidant as a Selective Anticancer Therapeutic Agent. *Acs Omega*, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 10070-10077, 10 jun. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b00140>.

Zaidieh, Tarek, et al. “ROS as a Novel Indicator to Predict Anticancer Drug Efficacy”. *BMC Cancer*, vol. 19, no 1, dezembro de 2019, p. 1224. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6438-y>.

Zeekpudsa P, Kukongviriyapan V, Senggunprai L, Sripa B, Prawan A. Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014 Jan 24;33(1):11. doi: 10.1186/1756-9966-33-11.

ZHANG, Kuojun; CHEN, Dong; MA, Kun; WU, Xiaoxing; HAO, Haiping; JIANG, Sheng. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (nqo1) as a therapeutic and diagnostic target in cancer. *Journal Of Medicinal Chemistry*, [S.L.], v. 61, n. 16, p. 6983-7003, 30 abr. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00124>.

Zhang, Li, et al. “Recent Advances of Quinones as a Privileged Structure in Drug Discovery”. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 223, novembro de 2021, p. 113632. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113632>.

Zhao, Hongyu, e Justin Dietrich. “Privileged Scaffolds in Lead Generation”. *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 10, no 7, julho de 2015, p. 781–90. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1041496>.

ZHAO, Huiru; ZHANG, Chengdong; WANG, Yaqi; CHEN, Wei; ALVAREZ, Pedro J. J.. Self-Damaging Aerobic Reduction of Graphene Oxide by *Escherichia coli*: role of go-mediated extracellular superoxide formation. *Environmental Science & Technology*, [S.L.], v. 52, n. 21, p. 12783-12791, 2 out. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.8b03753>.

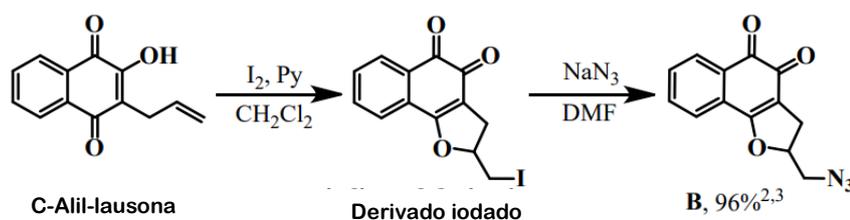
Zhou, Weiqiang, et al. “Selenium-Functionalized Metal-Organic Frameworks as Enzyme Mimics”. *Nano Research*, vol. 11, no 10, outubro de 2018, p. 5761–68. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1623-2>.

ZHU, Xiao-Qing; WANG, Chun-Hua. Accurate Estimation of the One-Electron Reduction Potentials of Various Substituted Quinones in DMSO and CH₃CN. *The Journal Of Organic Chemistry*, [S.L.], v. 75, n. 15, p. 5037-5047, 6 jul. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo100735s>.

ANEXO 1

CARACTERIZAÇÃO:

Síntese dos precursores de azida clicáveis:



Procedimento geral para cicloadições “Click” catalisadas por Cu(I)

Um tubo resselável de 5 mL foi carregado com a quinona-azida correspondente (0,200 mmol), os correspondentes quinona-alcinos ou alcinos selenados (0,220 mmol), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,0 mg, 0,0020 mmol, 1 mol%) e ascorbato de sódio (4,0 mg, 0,010 mmol, 5% molar). Em seguida, 4 mL de uma mistura de CH_2Cl_2/H_2O (1:1) foi adicionado ao recipiente. A reação foi submetida a agitação vigorosa à temperatura ambiente por 24 h, e a análise por TLC mostrou consumo completo das quinona-azidas. A mistura foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi lavada com salmoura (3 x 5 mL). A fase orgânica foi seca e o produto bruto foi purificado por FCC, utilizando n-hexano e acetato de etila como eluente.

2-((4-((fenilselanyl)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-2,3-di-hidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (66): A purificação por cromatografia em coluna (n-hexano/EtOAc) levou ao produto **66** (80.1 mg, 0.178 mmol, 89% rendimento) obtido como um sólido laranja; p.m.:157–159 (°C); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.00-7,95 (m, 2H), 7.60-7.67 (m, 2H), 7.35-7.33 (m,3H), 7.16-7.11 (m, 3H), 5.31-5.35 (m, 1H), 4.64 (dd, J = 3.2 and 11.8 Hz, 1H), 4.57 (dd, J = 4.5 and 11.8 Hz, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.25 (dd, J = 8.5 and 14.0 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 6.5 and 14,0 Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.6, 176.2, 158.0, 133.4, 132.2, 132.0,131.7, 130.3, 128.7, 128.1, 126.4, 125.4, 125.2,

123.1, 122.0, 82.0, 51.8, 29.1, 19.3. IR (solid, cm⁻¹) v: 2957, 1682, 1599, 1574, 1552. IR (solido, cm⁻¹) v: 2957, 1682, 1599, 1574, 1552.

2-((4-(((4-fluorofenil)selanil)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-2,3Dihidronafto[2,3-b]furano-4 ,9-diona (67): A purificação por cromatografia em coluna (nhexano/EtOAc) levou ao produto **67** (75,8 mg, 0,162 mmol, 81% de rendimento) obtido como um sólido amarelo; p.m.: 190–192 (°C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.96-7.93 (m, 3H), 7.85-7.78(m, 2H), 6.85-6.81 (m, 2H), 6.57-6.54 (m, 2H), 5.49-5.43 (m, 1H), 4.76 (d, *J* = 4,4 Hz, 2H), 4.23 (dd, *J* = 1.8 and 4.6 Hz, 2H), 3.26 (dd, *J* = 8.5 and 13.7 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 5.6 and 13.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 181.5, 176.9, 159.1, 145.8, 145.0, 134.4, 133.4, 132.3, 131.1, 125.8, 125.4, 123.9, 123.6, 115.2, 115.0, 113.0, 83.3, 54.9, 52.3, 29.7. IR (solido, cm⁻¹) v: 2958, 1730, 1676, 1593, 1571, 1510. IR (solid, cm⁻¹) v: 2958, 1730, 1676, 1593, 1571, 1510.

2-((4-((benzilselanil)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-2,3-di-hidronafto[2,3]furan-4,9-diona (68): A purificação por cromatografia em coluna (n-hexano/EtOAc) levou ao produto **68** (27,8 mg, 0,060 mmol, 30% de rendimento) obtido como um sólido laranja; p.m.: 149–151 (°C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.97 (s, 1H), 7.95-7.91 (m, 2H), 7.83-7.76 (m, 2H), 7.29-7.24 (m, 4H), 7.21-7.17 (m, 1H), 5.52-5.47 (m, 1H), 4.77-4.76 (m, 2H), 3.69-3.68 (m, 4H), 3.30 (dd, *J* = 8.5 and 13.7 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 5.3 and 13.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 181.4, 176.8, 159.1, 145.4, 139.4, 134.4, 133.4, 132.3, 131.1, 128.8, 128.3, 126.5, 125.8, 125.4, 123.9, 123.6, 83.1, 52.4, 29.7, 26.6, 15.3. IR (solid, cm⁻¹) v: 2956, 1682, 1655, 1599, 1574, 1550. IR (solid, cm⁻¹) v: 2956, 1682, 1655, 1599, 1574, 1550; HRMS (ESI⁺): 466,0572 [M+H]⁺. Cald. para [C₂₃H₂₀N₃O₃Se]⁺: 466,0669.

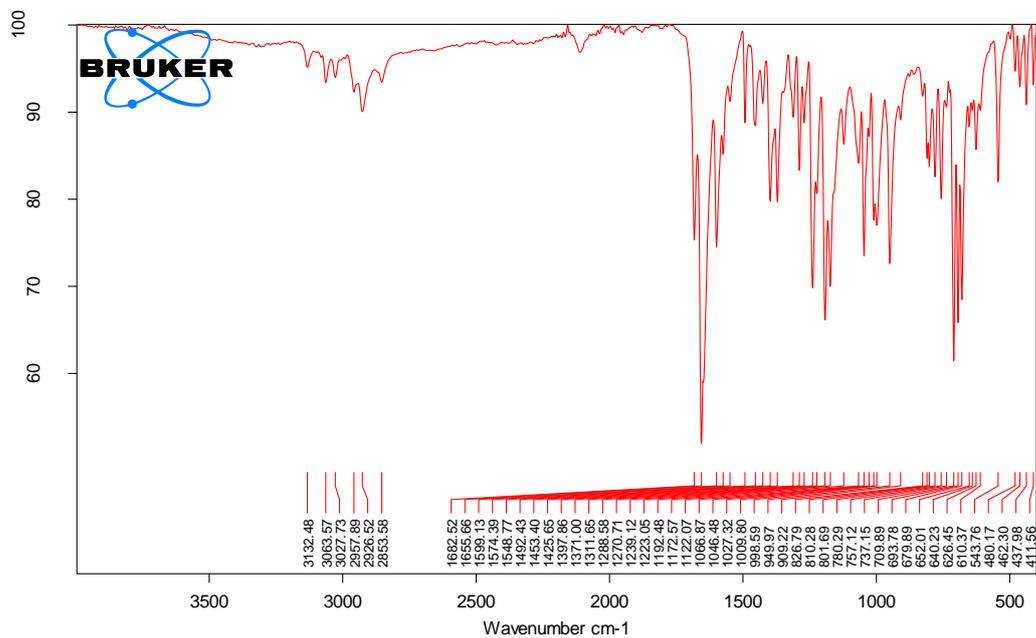
2-((4-((decilselanil)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-2,3-di-hidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (69): A purificação por cromatografia em coluna (n-hexano/EtOAc) levou ao produto **69** (15,4 mg, 0,030 mmol, 15% de rendimento) obtido como um sólido laranja; p.m.: 144–146 (°C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.01-7.97 (m, 2H), 7.68-7.61 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 5.37-5.31 (m, 1H), 4.71 (dd, *J* = 3.0 and 11.8 Hz, 1H), 4.62 (dd, *J* = 4.4 and 11.8 Hz, 1H), 3.72-3.65 (m, 2H), 3.30 (dd, *J* = 8.5 and 14.0 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 6.2 and 14.0 Hz, 1H), 2.44-2.35 (m, 2H), 1.54-1.48 (m, 4H), 1.22-1.17 (m, 12H), 0.81 (t, *J* = 5.5 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 181.8, 177.4,

159.3, 147.9, 134.6, 133.5, 133.0, 131.6, 126.6, 126.5, 124.4, 123.0, 83.2, 53.2, 32.2, 30.3, 30.1, 29.9, 29.9, 29.8, 29.6, 29.4, 24.9, 22.9, 15.3, 14.4. IR (solid, cm⁻¹) v: 2953, 1682, 1656, 1599, 1575, 1548. IR (solido, cm⁻¹) v: 2953, 1682, 1656, 1599, 1575, 1548.

2-((4-((butilselanyl)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-2,3-di-hidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (70): A purificação por cromatografia em coluna (n-hexano/EtOAc) levou ao produto 70 (61,0 mg, 0,142 mmol, 71% de rendimento) obtido como um sólido amarelo; p.m.: 146–148 (°C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.07 (ddd, *J* = 0.4, 1.1 and 6.2 Hz, 1H), 8.03-8.00 (m, 2H), 7.71-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 2H), 5.88-5.80 (m, 1H), 5.13-5.08 (m, 1H), 4.99-4.97 (m, 1H), 3.31-3.29 (m, 2H), 3.00-2.93 (m, 1H), 2.81 (dd, *J* = 6.4 e 10.3 Hz, 1H), 2.61-2.58 (m, 1H), 1.58 (qt, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.36-1.31 (m, 2H), 0.84 (t, *J* = 5.9 Hz, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ: 184.5, 181.7, 153.4, 135.2, 134.4, 134.0, 133.2, 127.1, 126.6, 126.4, 126.3, 116.7, 86.0, 33.3, 32.9, 29.9, 28.2, 27.7, 25.3, 23.1, 13.8. IR (solido, cm⁻¹) v: 2957, 1682, 1599, 1574, 1548; IR (solido, cm⁻¹) v: 2957, 1682, 1599, 1574, 1548; HRMS (ESI⁺): 432.0833[M+H]⁺. Cald. para [C₂₀H₂₂N₃O₃Se]⁺: 432,0826.

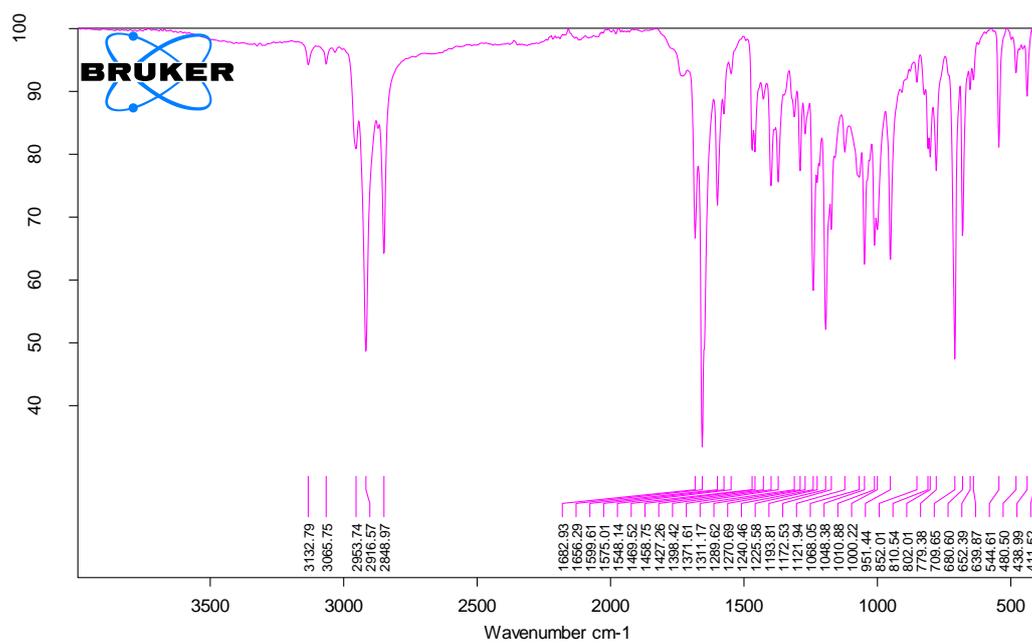
Infravermelho- IR

DY037



C:\Users\Uni\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\DATA\MEAS\ATR_SOLID.160	DY037	Instrument type and / or accessory	27.11.2018
---	-------	------------------------------------	------------

DY057



C:\Users\Uni\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\DATA\MEAS\ATR_SOLID.161

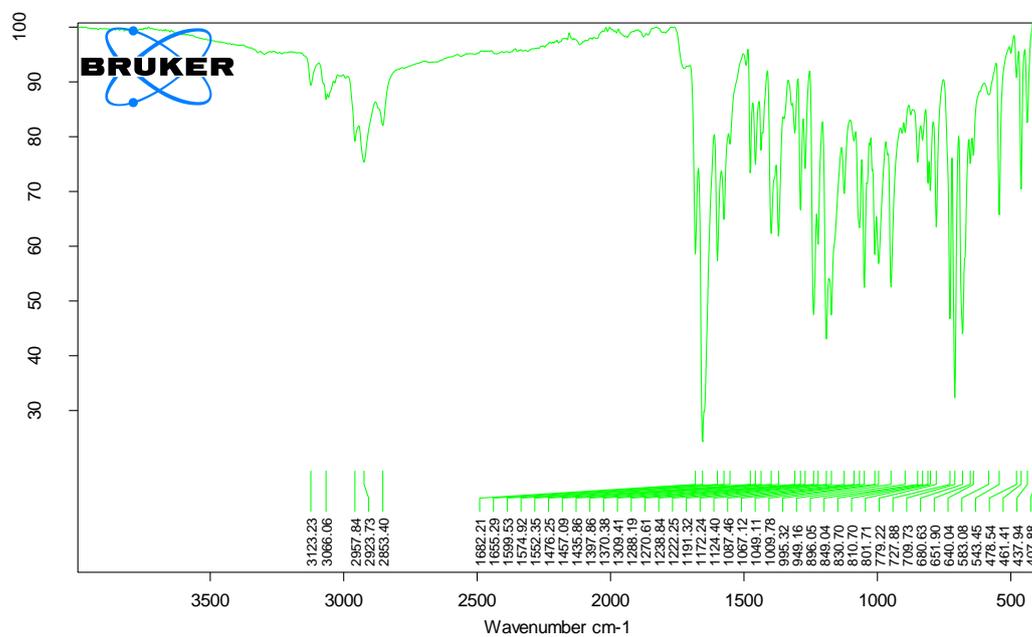
DY057

Instrument type and / or accessory

27.11.2018

Seite 1 von 1

DY034



C:\Users\Uni\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\DATA\MEAS\ATR_SOLID.162

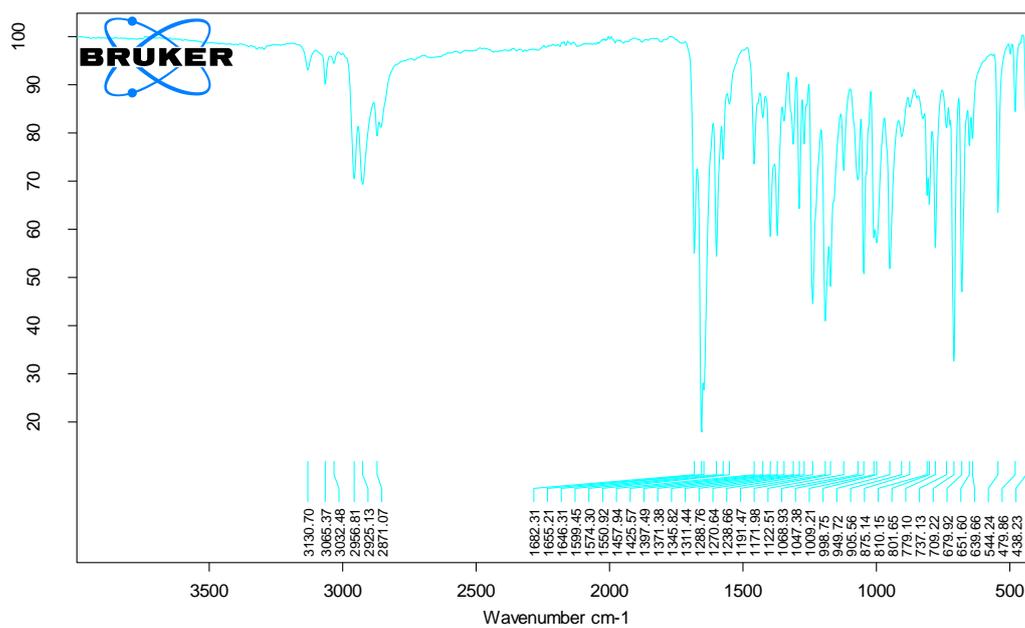
DY034

Instrument type and / or accessory

27.11.2018

Seite 1 von 1

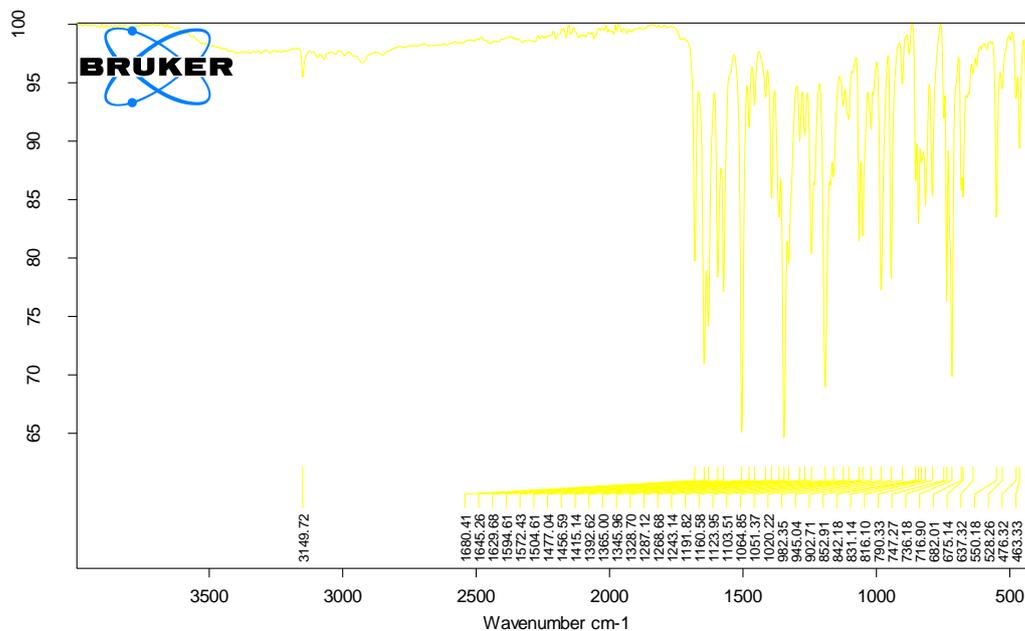
DY038



C:\Users\Uni\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\DATA\MEAS\ATR_SOLID.163	DY038	Instrument type and / or accessory	27.11.2018
---	-------	------------------------------------	------------

Seite 1 von 1

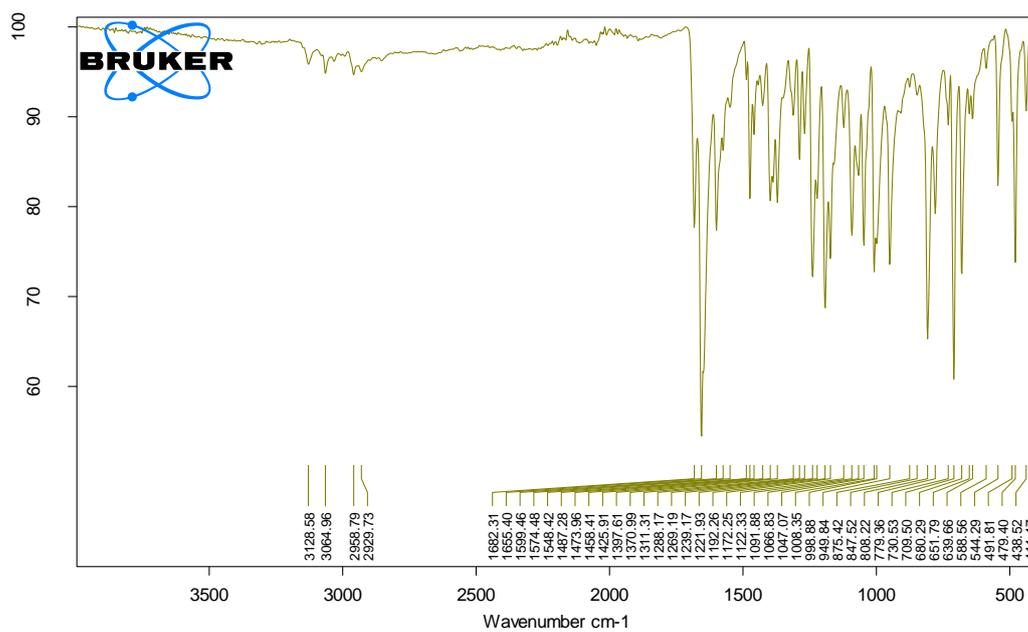
DY035



C:\Users\Uni\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\DATA\MEAS\ATR_SOLID.164	DY035	Instrument type and / or accessory	27.11.2018
---	-------	------------------------------------	------------

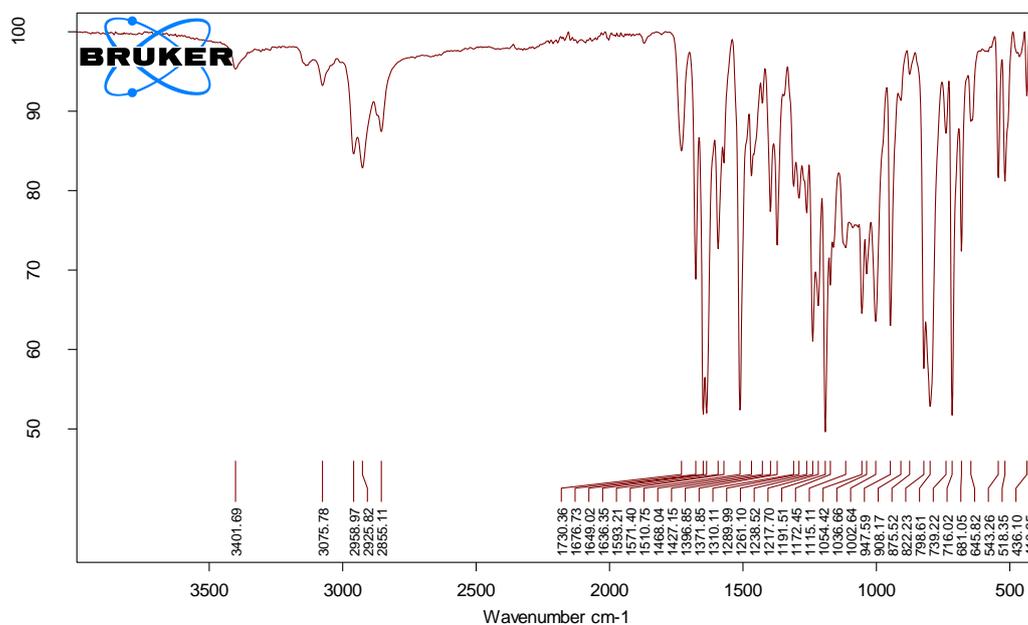
Seite 1 von 1

DY040



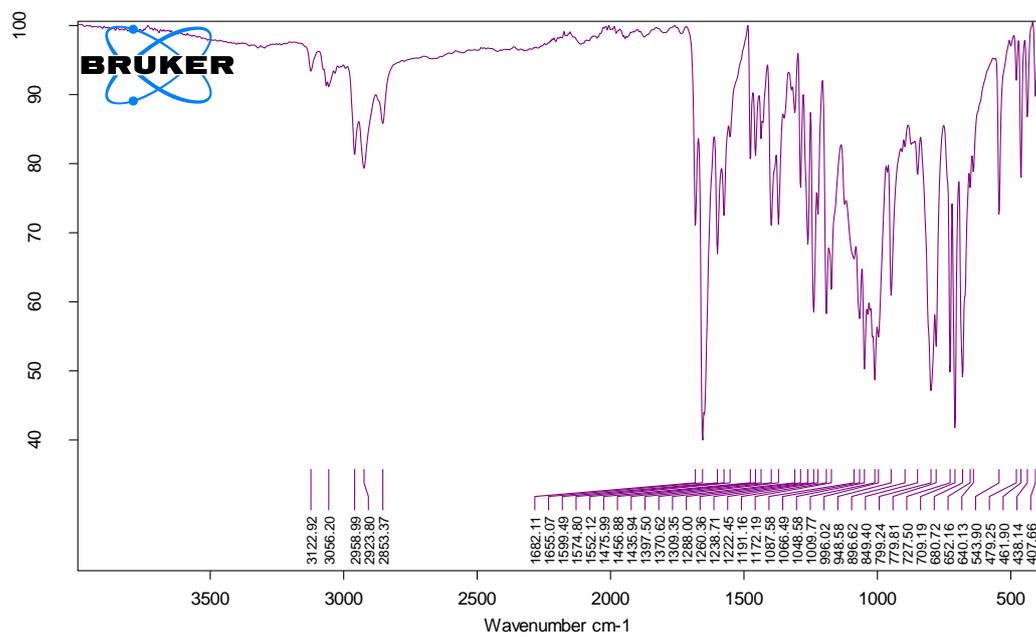
C:\Users\Uni\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\DATA\MEAS\ATR_SOLID.165	DY040	Instrument type and / or accessory	27.11.2018
---	-------	------------------------------------	------------

DY051



C:\Users\Uni\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\DATA\MEAS\ATR_SOLID.168	DY051	Instrument type and / or accessory	27.11.2018
---	-------	------------------------------------	------------

DY046

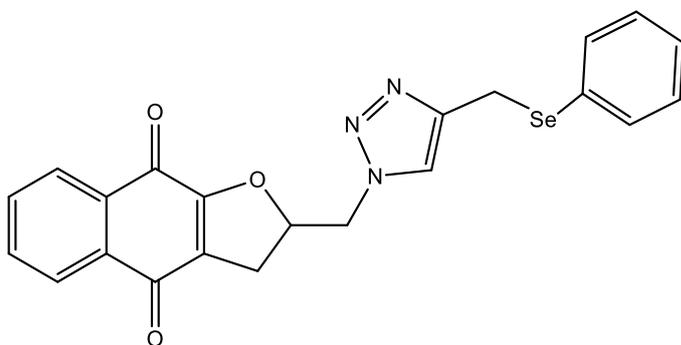


C:\Users\Unil\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\DATA\MEAS\ATR_SOLID.169

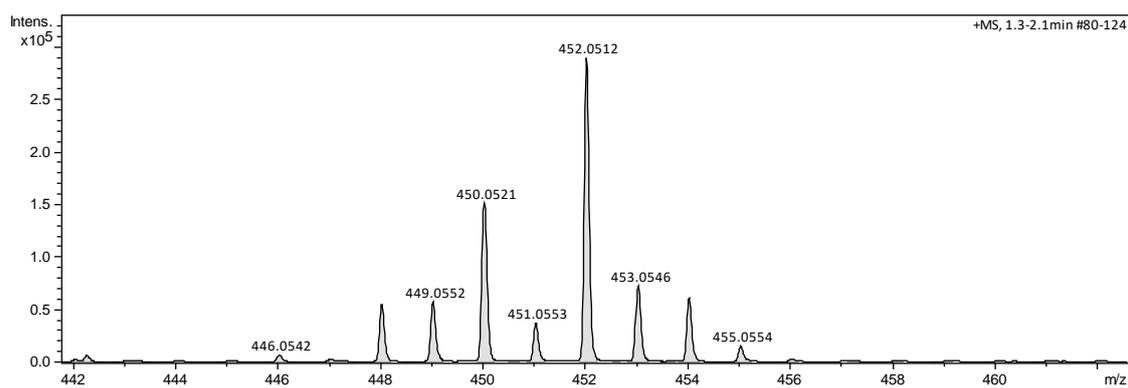
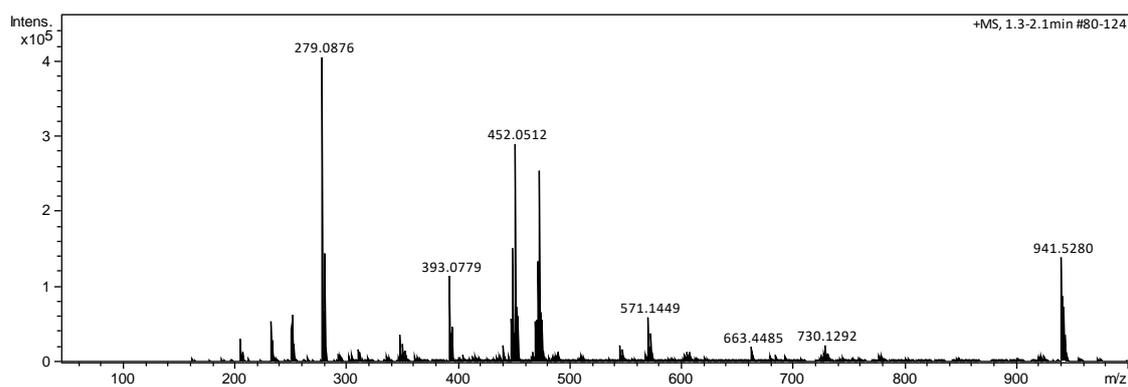
DY046

Instrument type and / or accessory

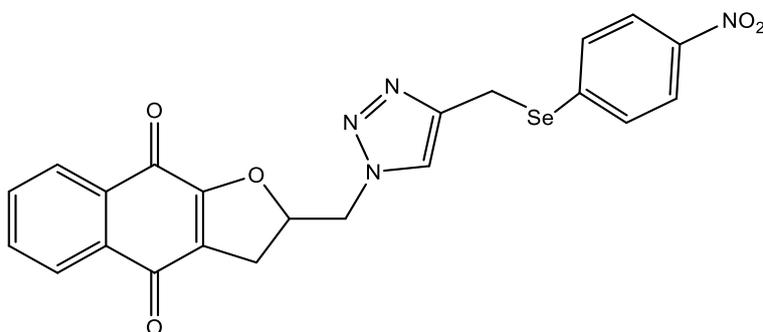
27.11.2018

Espectrometria de Massas de Alta Resolução- MS**Amostra: DY034**Chemical Formula: $C_{22}H_{17}N_3O_3Se$

Molecular Weight: 450,36

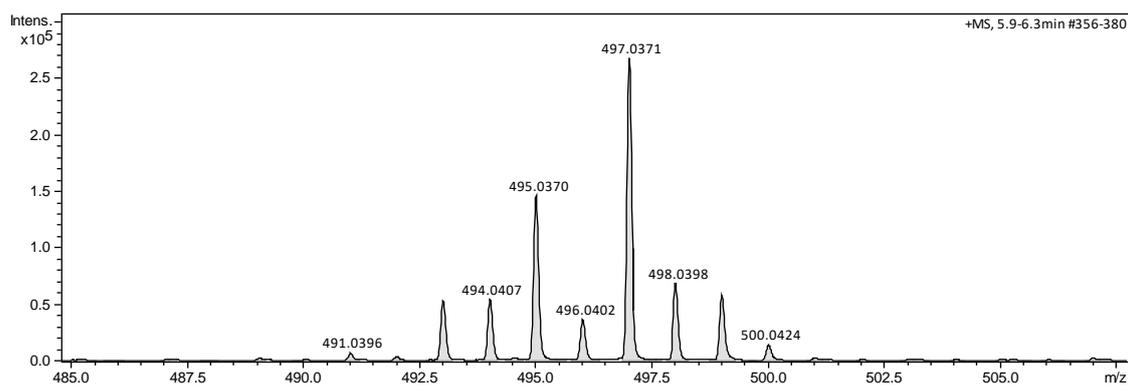
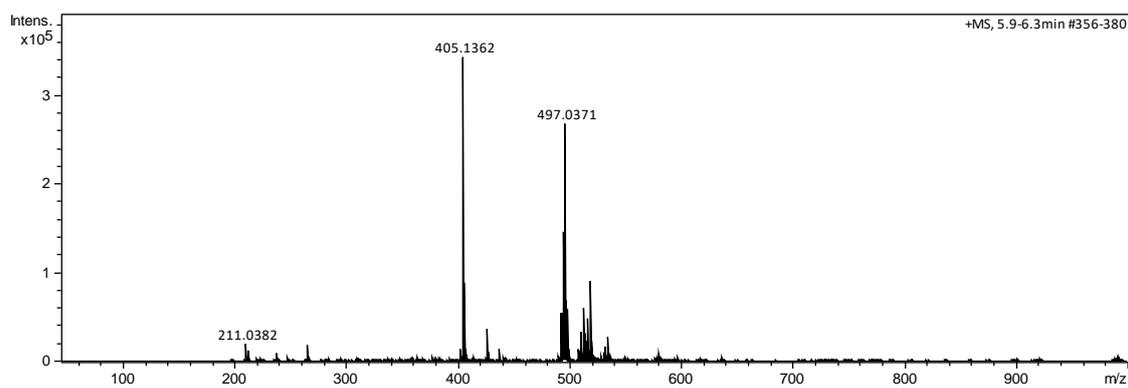
ESI+ | amostra dissolvida e diluída em MeOH

Amostra: DY035

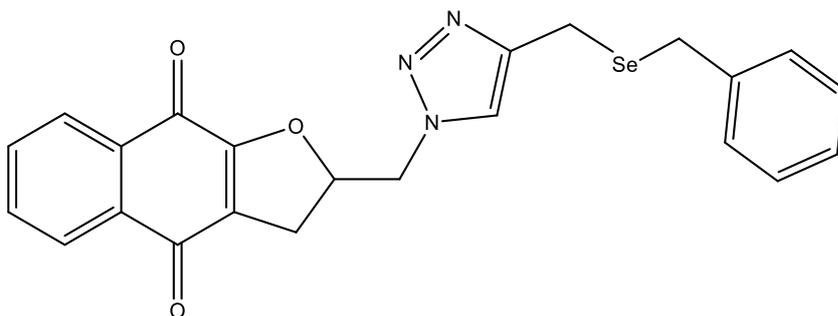


Chemical Formula: $C_{22}H_{16}N_4O_5Se$
Molecular Weight: 495,35

ESI+ | amostra dissolvida em MeOH e diluída em MeOH 0,1% ácido fórmico

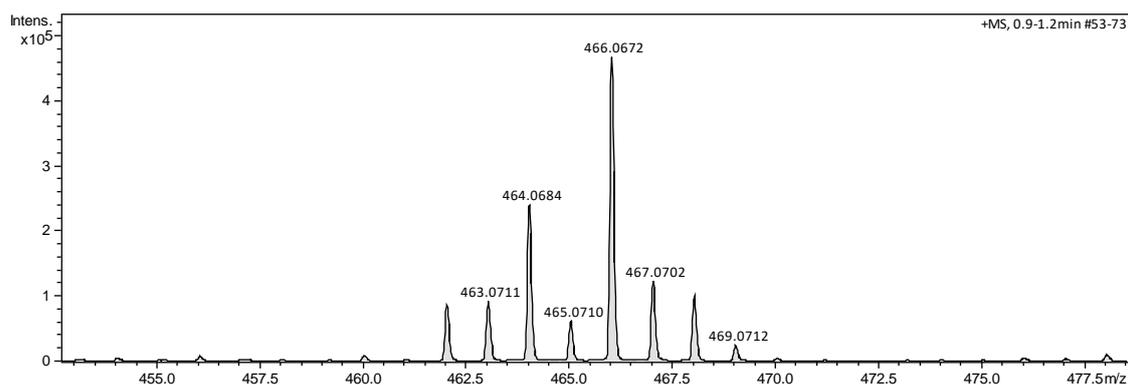
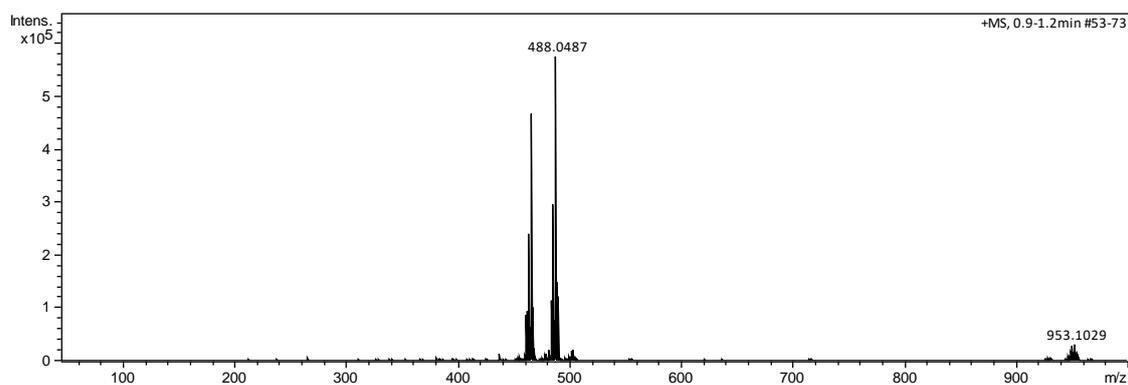


Amostra: DY 037

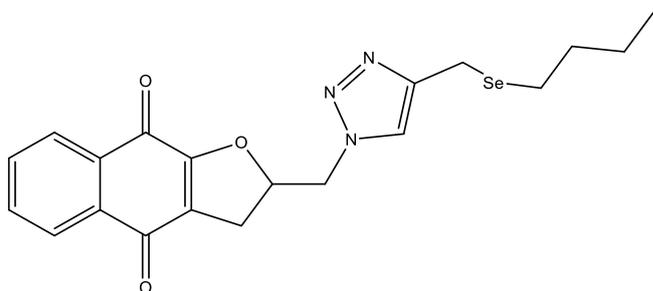


Chemical Formula: $C_{23}H_{19}N_3O_3Se$
Molecular Weight: 464,38

ESI+ | amostra dissolvida e diluída em MeOH

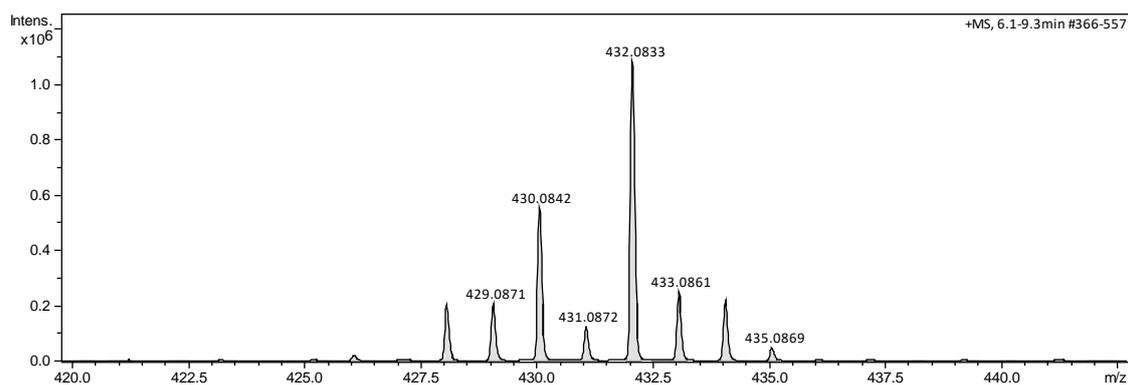
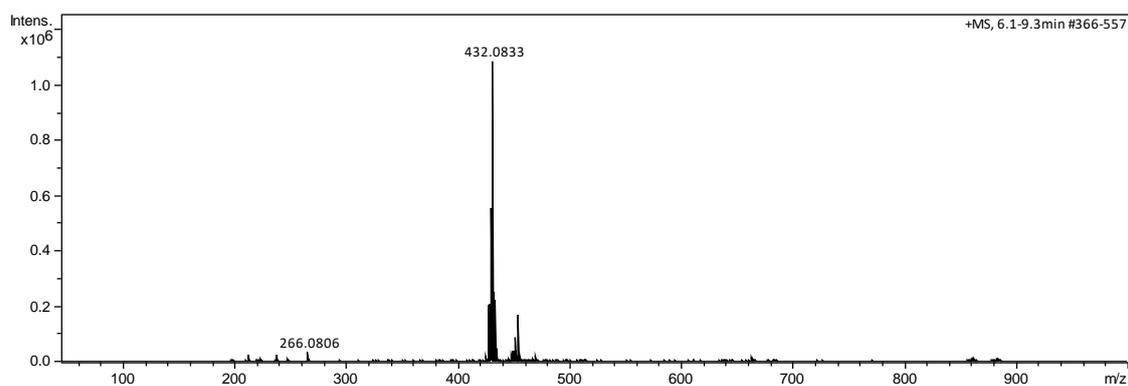


Amostra: DY038

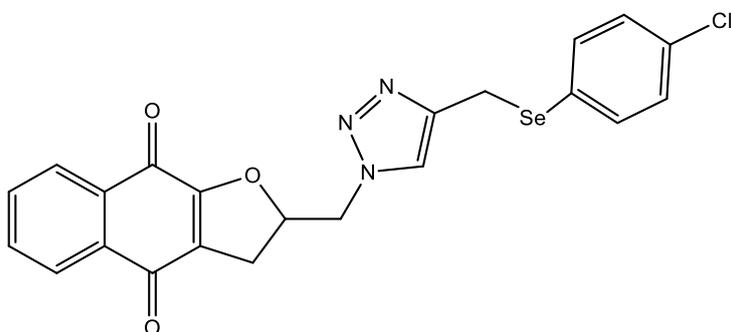


Chemical Formula: $C_{20}H_{21}N_3O_3Se$
Molecular Weight: 430,37

ESI+ | amostra dissolvida em MeOH e diluída em MeOH 0,1% ácido fórmico

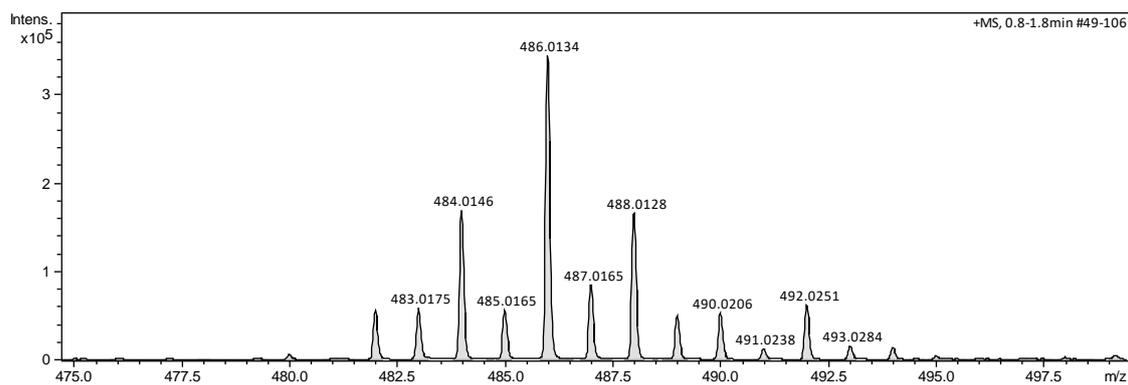
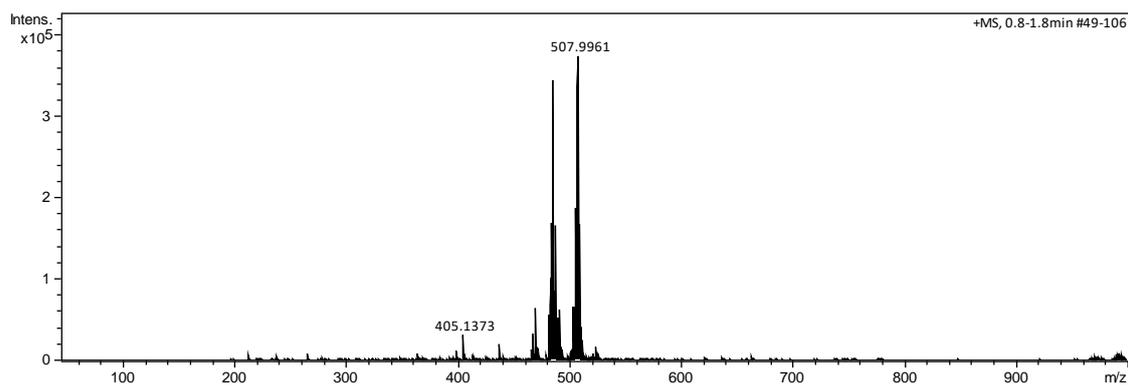


Amostra: DY040

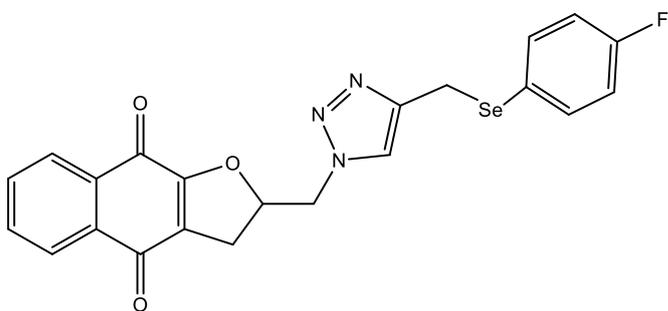


Chemical Formula: C₂₂H₁₆ClN₃O₃Se
Molecular Weight: 484,80

ESI+ | amostra dissolvida e diluída em MeOH

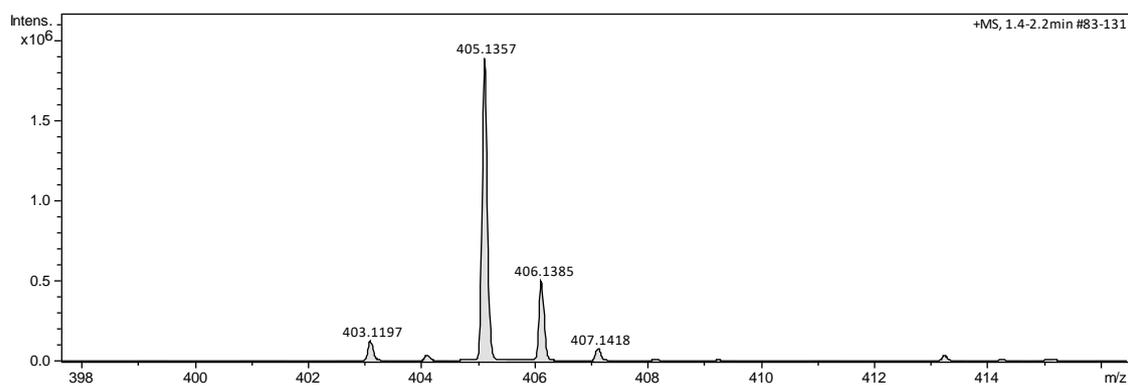
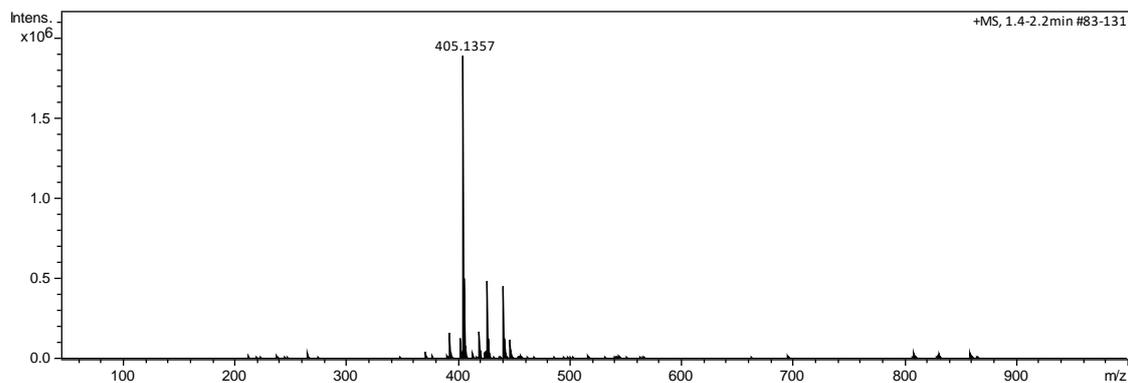


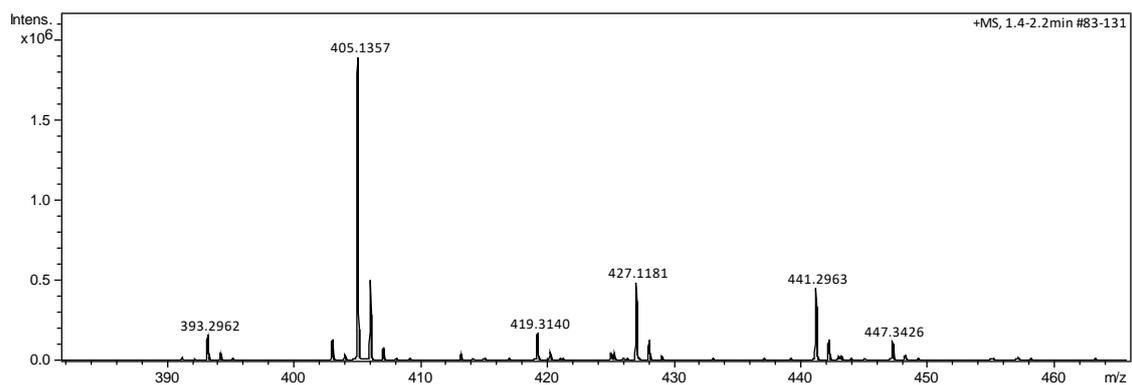
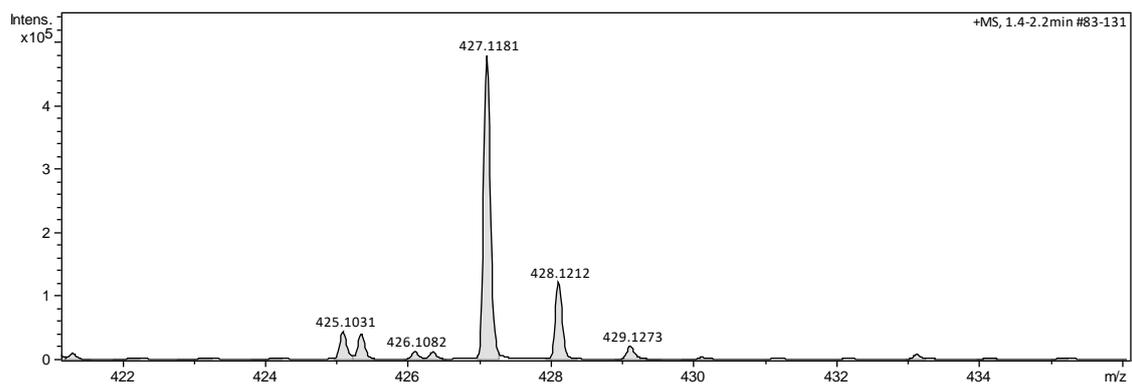
Amostra: DY051



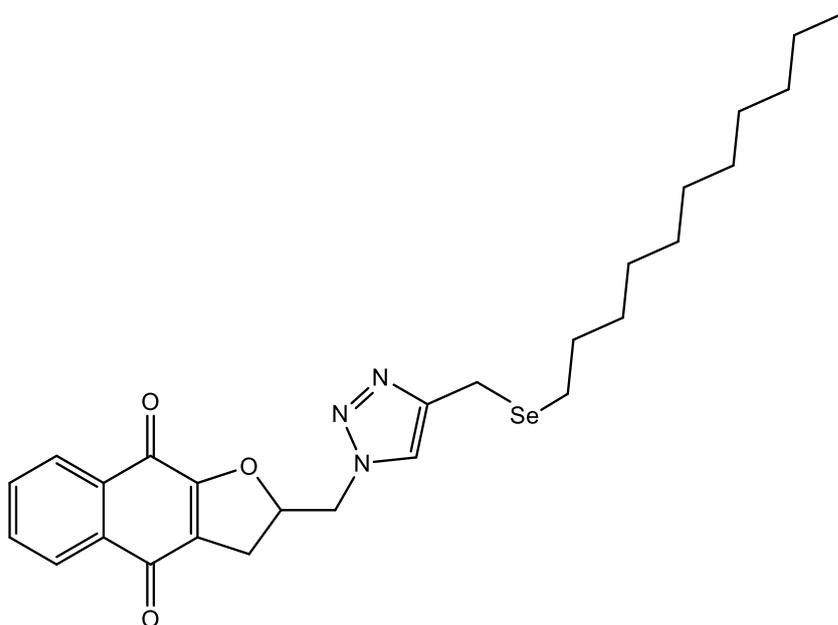
Chemical Formula: $C_{22}H_{16}FN_3O_3Se$
Molecular Weight: 468,35

ESI+ | amostra dissolvida e diluída em MeOH





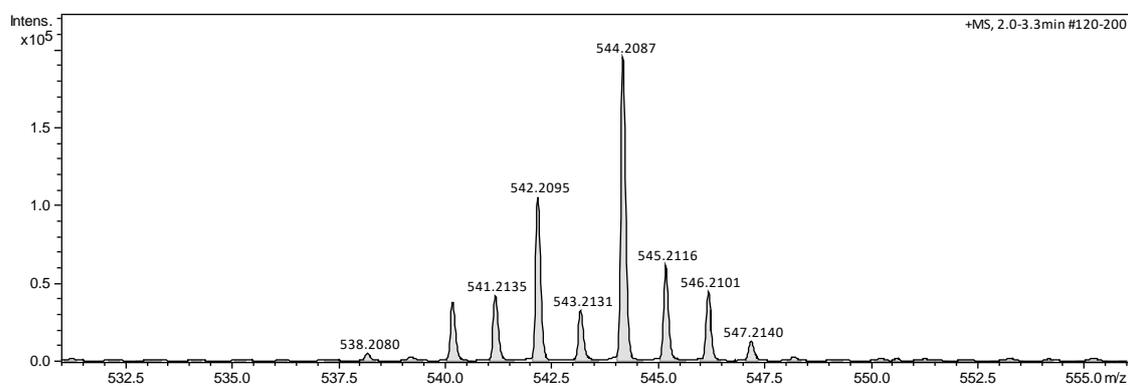
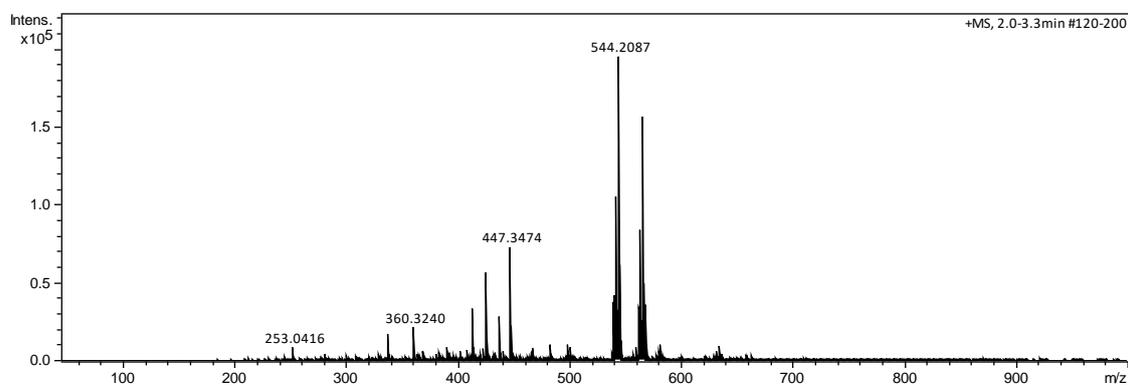
Amostra: DY057

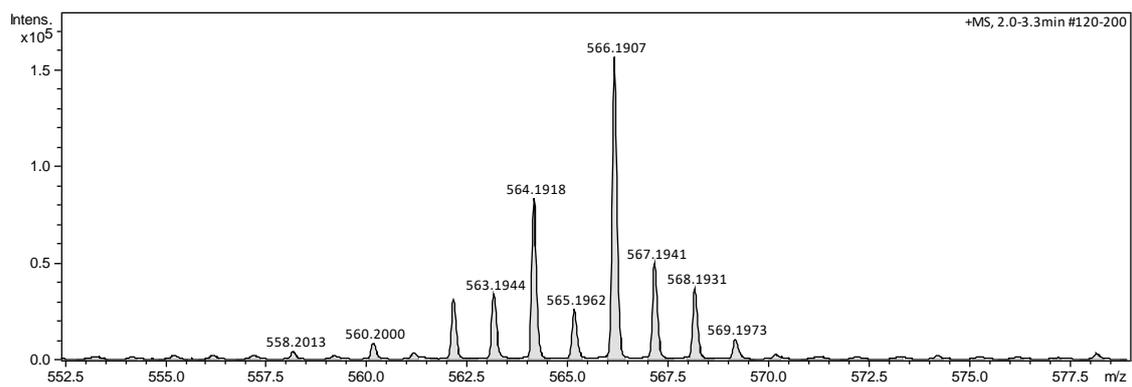


Chemical Formula: $C_{27}H_{35}N_3O_3Se$

Molecular Weight: 528,56

ESI+ | amostra dissolvida e diluída em MeOH





RESEARCH ARTICLE



Cite this: *RSC Med. Chem.*, 2021, 12, 1709

It takes two to tango: synthesis of cytotoxic quinones containing two redox active centers with potential antitumor activity†

Daisy J. B. Lima,  ‡^{ab} Renata G. Almeida,  ‡^c Guilherme A. M. Jardim,  ^{cd}
Breno P. A. Barbosa,  ^{bc} Augusto C. C. Santos,  ^c Wagner O. Valença,  ^c
Marcos R. Scheide,  ^d Claudia C. Gatto,  ^e Guilherme G. C. de Carvalho,  ^a
Pedro M. S. Costa,  ^a Claudia Pessoa,  ^a Cynthia L. M. Pereira,  ^c
Claus Jacob,  ^p Antonio L. Braga  *^d and Eufrânio N. da Silva Júnior  *^c

We report the synthesis of 47 new quinone-based derivatives *via* click chemistry and their subsequent evaluation against cancer cell lines and the control L929 murine fibroblast cell line. These compounds combine two redox centers, such as an *ortho*-quinone/*para*-quinone or quinones/selenium with the 1,2,3-triazole nucleus. Several of these compounds present IC₅₀ values below 0.5 μM in cancer cell lines with significantly lower cytotoxicity in the control cell line L929 and good selectivity index. Hence, our study confirms the use of a complete and very diverse range of quinone compounds with potential application against certain cancer cell lines.

Received 12th May 2021,
Accepted 10th August 2021

DOI: 10.1039/d1md00168j

rsc.li/medchem

1. Introduction

Quinones represent a particularly exciting class of natural products. These redox-active secondary metabolites are highly abundant in nature, and also exhibit pronounced redox modulatory activity in many target cells, which frequently translates into a pronounced and often also selective cytotoxic activity, for instance, against cancer cell lines under oxidative stress (OS).¹ Not surprisingly, lapachol and its derivatives, *e.g.*, β-lapachone (β-lap), which occur naturally in the ipe tree, already present a pivotal role in cancer therapy, since studies have proven that β-lap showed significant activity against Sarcoma 180 ascite tumour cells (S-180 cells) *in vitro*, and in mice bearing S-180 tumors.² Antitumor activity of β-lap is based on its specialty to elevate endogenous levels of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1),³ and whereas the

clinical uses of β-lap are limited due to its high hydrophobicity, the compound and its derivatives are one focus of ongoing research in this field.

For over a decade, our research groups have dedicated efforts to the synthesis and modification of quinone-based compounds, especially 1,2- and 1,4-naphthoquinone derivatives,⁴ using classical strategies such as molecular hybridization⁵ and bioisosterism.⁶ To achieve synthetic challenges and prepare selected molecules, robust methodologies such as C–H activation⁷ and Cu(I) catalysed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction⁸ have been employed successfully, resulting in potent bioactive molecules. The triazole moiety is also considered a leading pharmacophore,⁹ and the use of “click” reactions to modify the furan and pyran ring, also named as “C-ring” of most common lapachol derivatives like β-lap and nor-β-lap have been employed by us for the synthesis of powerful multifunctional redox modulators.^{10,11}

Apart from the high potentiality against cancer cells, the toxicity of NQs to normal cells has also been reported.¹² Nonetheless, we recently discovered that the combination of a quinone-based compound and a selenium core could circumvent this problem, *i.e.*, the hybrid compounds inhibited the growth of cancer cells more selectively, with keeping their potency.¹³ To expand our library of redox-sensitive compounds for the identification of more potent and selective antitumor agents, herein we report the synthesis and antitumor activity of novel hybrid molecules combining the quinoidal redox system of β-lap and nor-β-lap

^a Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Ceará, Brazil

^b Division of Bioorganic Chemistry, School of Pharmacy, University of Saarland, 66123 Saarbruecken, Germany

^c Institute of Exact Sciences, Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil.
E-mail: eufranio@ufmg.br

^d Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil. E-mail: braga.antonio@ufsc.br

^e Institute of Chemistry, University of Brasilia, Brasilia, 70904-970, DF, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available: CCDC 1984588–1984590. For ESI, NMR, Mass spectrometry and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d1md00168j

‡ These authors contributed equally to this work.

with either a second quinone or a redox active selenium atom to boost redox and catalytic activity of these natural products as depicted in Scheme 1.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of multifunctional derivatives

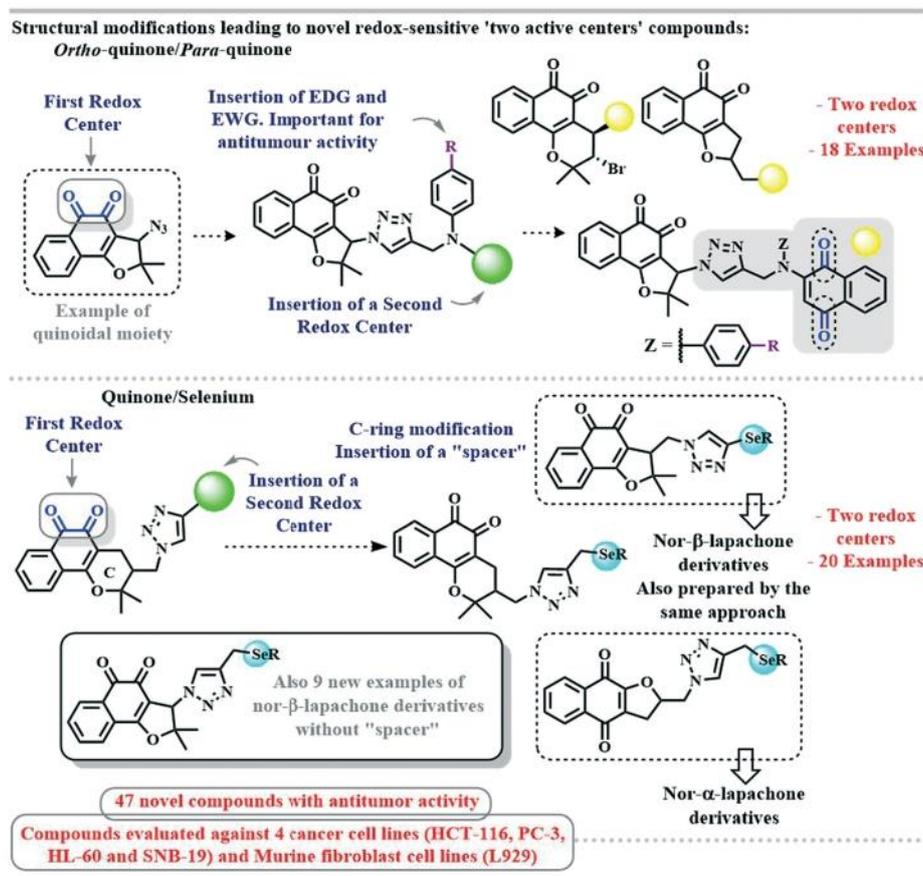
In the first step, 3-azido-nor- β -lapachone (**A**) has been synthesized employing a previously described methodology.¹⁴ Six clickable alkynes,¹⁵ were subsequently obtained by the reaction of 1,4-naphthoquinone, propargyl bromide and six different *para*-substituted anilines, with moderate to high yields (Scheme S1†). Electron withdrawing groups (EWG) and electron-donating groups (EDG) were included as central features to obtain a diverse family of compounds for subsequent antitumour activity evaluation. Based on these clickable building blocks, the first class of novel triazoles **1–6** was prepared *via* the CuAAC “click” reaction,¹⁶ with moderate to high yields (40 to 90%) (Scheme 2).

The second class of quinone-based triazoles (compounds **7** to **12**) were based on nor- β -lap. Initially, the azide derivative was synthesized from C-allyl-lawsone in a two-step reaction (Scheme S1†). At first, C-allyl-lawsone was submitted to a halocyclization,¹⁷ which provided the iodinated intermediate,¹⁸ which was then submitted to a nucleophilic substitution reaction with sodium azide affording the azide derivative **B** (Scheme S1†). The

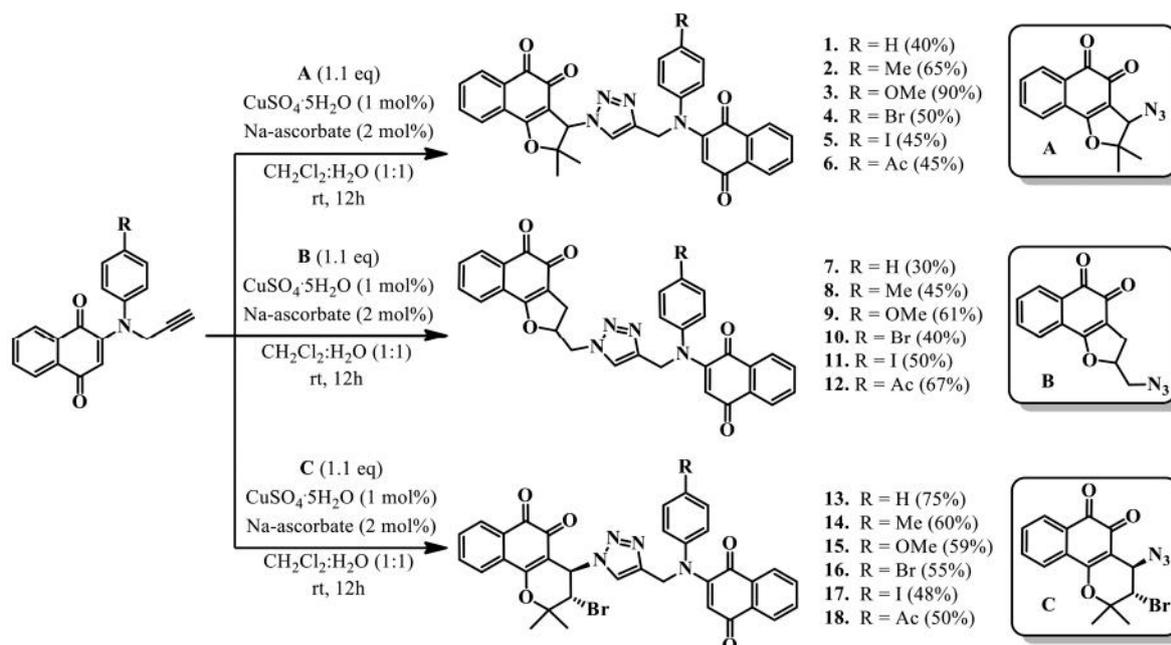
reaction of the respective alkynes by click chemistry reaction, in the presence of copper sulfate and sodium ascorbate afforded the desired triazoles **7–12** in 30 to 67% yield (Scheme 2).

The third class of triazole analogs is based on β -lap as the starting material. Initially, β -lap was subjected to a debromination reaction employing *N*-bromosuccinimide to afford the bromo derivative in 35% yield. In the next step, the bromo intermediate was treated with sodium azide to install an azide group in a regioselective manner to afford **C** in 35% yield (Scheme S1†).¹⁹ This intermediate was reacted with the alkynes in the presence of copper sulphate and sodium ascorbate to generate the triazoles **13–18**, in moderate yields as outlined in Scheme 2.

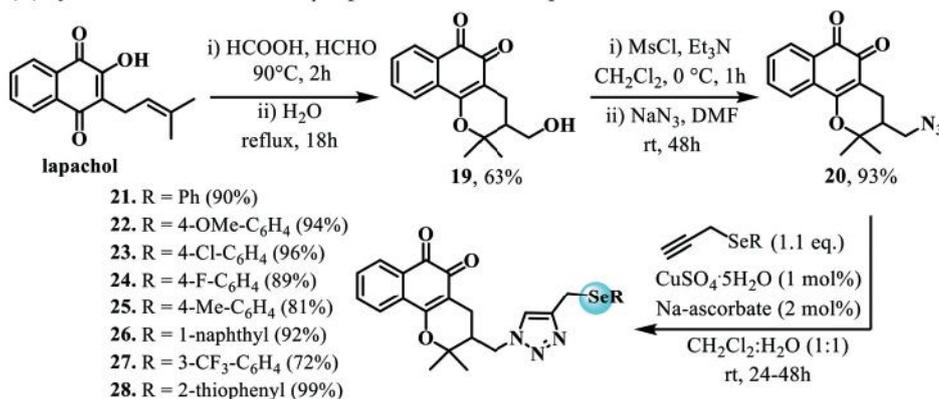
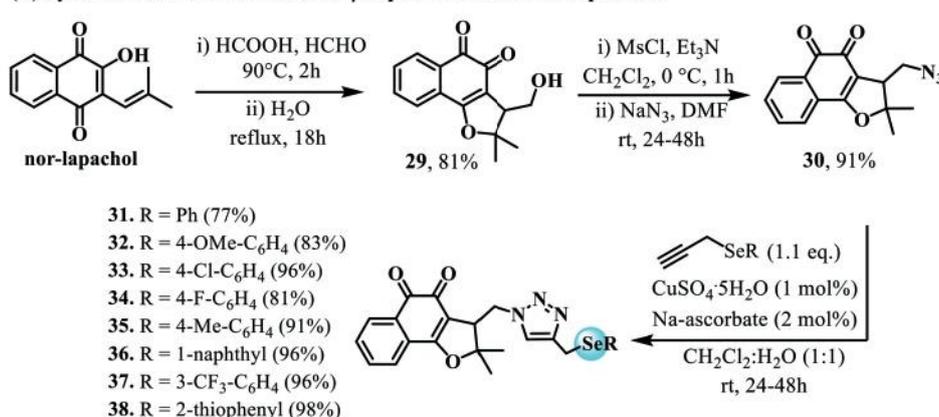
The first series of compounds have combined the lapachone moiety with another quinone redox centre. As both quinones are likely to exert a similar redox activity and hence biological activity, the next step has involved adding another, distinctively different redox center in the form of a selenium atom. In this part of our study, we have varied the side chain on the quinone moiety to produce building blocks for click reactions with the azide group in different distance and position to the lapachone centre, as shown in Scheme 3. The first series in this part of the study is based on lapachol. This series of compounds commenced by a reaction of lapachol with paraformaldehyde and formic acid to obtain



Scheme 1 Overview of multifunctional redox agents derived from natural β -lap and nor- β -lap.



Scheme 2 Synthetic route to the synthesis of new quinone-based 1,2,3-triazoles 1–18.

(A) Synthesis of novel selenated β -lapachone-triazole compounds:**(B) Synthesis of novel selenated nor- β -lapachone-triazole compounds:**

Scheme 3 Synthetic route to the synthesis of novel selenated quinones 21–28 and 31–38.

hydroxylated β -lap compound **19** in good yield (Scheme 3). The same formylation-cyclization methodology for compound

nor-lapachol provided hydroxylated nor- β -lap **29** in 73% yield (Scheme 3).²⁰ Both hydroxylated lapachones were subjected

to the reaction with MsCl at low temperature, followed by nucleophilic substitution with NaN_3 in DMF, resulting in novel quinone-azide compounds **20** and **30**, which are similar in structure and subsequently employed as starting blocks to build two distinct series of multifunctional agents *via* click reaction,²¹ combining the biologically active triazole of the click reaction with a quinone and selenium redox centre (Scheme 3). The two selenated lapachone-triazole moieties were constructed by joining quinone-azides **20** and **30** with a series of organoselenium-based alkyne building block²² *via* a Cu(I) -catalyzed Huisgen cycloaddition, affording triazoles **21–28** and **31–38** in good to excellent yields. The series of selenium-containing lapachones based on **20** and **30** feature a short methylene linker between the lapachone and triazole. To inch closer, we have prepared a series of compounds from the azide derivative **A** and **D** as outlined in Scheme 4. These more compact nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazoles containing selenium and nor- α -lapachone derivatives were prepared following the previously discussed click method.⁸ Compounds **39–47** and **48–51** were obtained in moderate to good yields (Scheme 4).

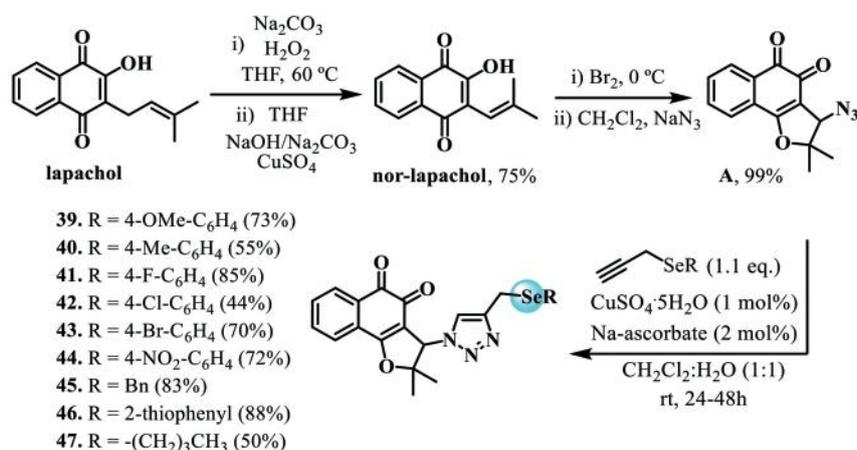
As some of the compounds in the series of selenium-containing lapachone derivatives feature rather complex structures, single-crystal X-ray diffraction has been employed to confirm these structures experimentally in selected and

representative compounds **20**, **21** and **35**. Single crystal X-ray diffraction analysis demonstrated that the three compounds **20**, **21** and **35** crystallize in the triclinic crystal system with space group $P\bar{1}$ and with two molecules in the asymmetric unit. The molecular structures of the compounds are shown in Fig. 1. Crystal data collection and structure refinement for the compounds **20**, **21** and **35** are shown in the Table S1 (ESI[†]). The bond distances of Se-O are 1.910(4) and 1.957(4) Å in **35** and 1.920(5) and 1.937(5) Å in **21**. The bond angle N(3)-N(2)-N(1) of 173.4(4) $^\circ$ was observed in the crystal structure of **20**, with a characteristic double bond to N(2)-N(1) 1.190(4) Å and N(3)-N(2) of 1.119(4) Å. The X-ray diffraction crystallographic analyses also revealed unusual intermolecular weak hydrogen bonds in **20**, whose bond lengths of $\text{C-H}\cdots\text{O}$ and $\text{C-H}\cdots\text{N}$ are approximately 2.61–2.65 Å.

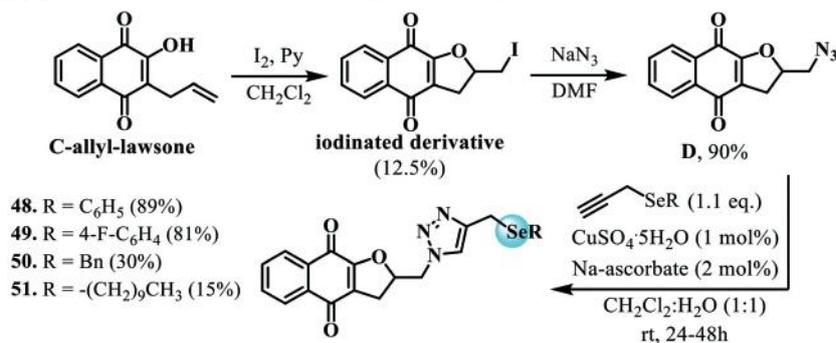
2.2. Biological activity

After successful synthesis of the various series of multifunctional lapachones, their respective activities have been assessed in HCT-116 (human colon carcinoma cells), PC-3 (human prostate cells), HL-60 (human promyelocytic leukemia cells) and SNB-19 (human glioblastoma cells) employing the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

(A) Synthesis of novel selenated nor- β -lapachone-triazole compounds:



(A) Synthesis of novel selenated nor- α -lapachone-triazole derivatives:



Scheme 4 Synthetic route to the synthesis of novel selenated quinones **39–47** and **48–51**.

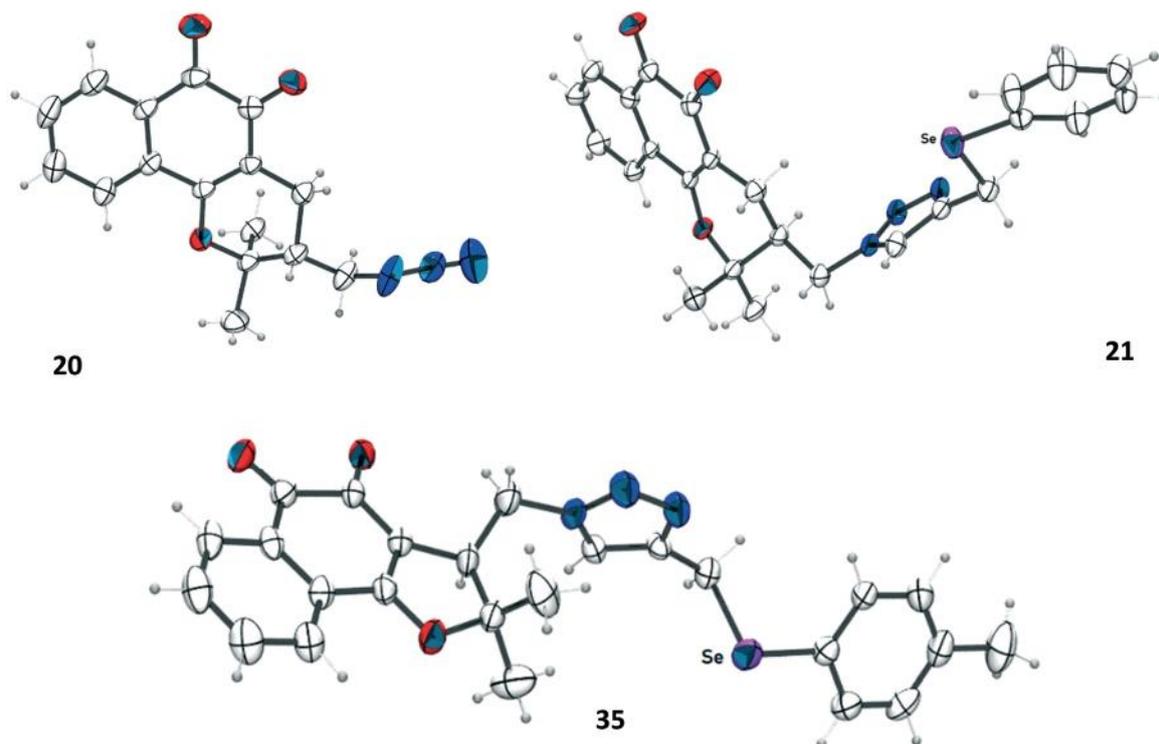


Fig. 1 ORTEP-3 of the compounds **20**, **21** and **35**, showing the atom-numbering and displacement ellipsoids at 50% probability level.

diphenyltetrazolium bromide] colorimetric assay, an absorbance based method - the measurement of the formazan salt, transformed from tetrazolium, directly correlates to the functioning metabolism of viable cells - and their activities have been compared to their activity in the reference murine fibroblast immortalized L929 cell line in order to establish an overview of activities between the different classes of compounds and also a possible selectivity for certain cell types. As described previously,²³ compounds were classified according to their activity as highly active ($IC_{50} < 2 \mu M$), moderately active ($2 \mu M < IC_{50} < 10 \mu M$), and inactive ($IC_{50} > 10 \mu M$). The cytotoxicity of compounds is described in Table 1. The selectivity index for selected compounds is outlined in Table 2.

Ortho-quinone coupled para-quinones (1–6). Compounds in this series presented IC_{50} values ranging from $0.05 \mu M$ (compound **1**, in HCT-116 cells) to $1.74 \mu M$ (compound **6**, in SNB-19 cells). Although these compounds can be considered as highly active, their cytotoxicity against the reference L-929 cell lines has been considerably lower, pointing towards a good selectivity against cultured cancer cells. Compound **1**, for instance, exhibited high activity against HCT-116 cells in the sub-micromolar range, and a 50-fold higher IC_{50} of $2.54 \mu M$ against L-929 cells, hence combining high activity with considerable selectivity. In fact, of the six compounds tested, **1** showed excellent activity against two different cell lineages (HCT-116, $IC_{50} = 0.05 \mu M$ and HL-60, $IC_{50} = 0.30 \mu M$) and a relatively high IC_{50} value against normal cells, being considered an important prototype for further studies. All compounds in this group were especially active against

human promyelocytic leukemia cells (HL-60) with IC_{50} values between $0.21 \mu M$ and $0.30 \mu M$.

Ortho-quinone coupled para-quinones (7–12). This series of compounds differs from the one mentioned before by exchanging the nor- β -lap core for a C-allyl derivative core. This small structural modification led to a general increase in the IC_{50} values in each one of the cell lines, with some minor exceptions. Compounds **7–10** were moderately active in general, with compound **7** being inactive against PC-3 cell lines and compound **8** inactive against SNB-19 and normal cell lines. Compounds **9–12** were highly active against HL-60 cells, presenting moderate values of IC_{50} against L-929 cells and hence some selectivity. Compounds **11** and **12** also presented low IC_{50} values against HCT-116 cells (**11**, $IC_{50} = 1.12 \mu M$ and **12**, $IC_{50} = 1.34$).

Ortho-quinone coupled para-quinones (13–18). Members of this series of compounds, in which a β -lap model was employed as the lapachone core, led to a general increase in the antitumor activity when compared to C-allyl-lawsone-based compounds, although most compounds showed higher IC_{50} values when compared to nor- β -lap derivatives. Nonetheless, most compounds in this series may also be considered highly active, with IC_{50} values ranging from $0.15 \mu M$ (compound **16**, HL-60) to $3.17 \mu M$ (compound **18**, SNB-19). Interestingly, the new β -lap derivatives were especially active against HL-60 cell lines and can be considered promising prototypes in cancer treatment for this specific type of cell. Besides, compounds **14** and **15** also attracted attention because of their higher IC_{50} values for normal cell lines (**14**, $IC_{50} = 2.01 \mu M$ and **15**, $IC_{50} = 2.42$) and certain selectivity against cancer cells.

Table 1 Cytotoxic activity was expressed as IC₅₀ μM (95% CI) against cancer and normal cell lines after 72 h exposure, obtained by nonlinear regression for all cell lines from three independent experiments

Compounds	HCT-116	PC-3	HL-60	SNB-19	L-929
1	0.05 (0.02–0.13)	1.21 (1.07–1.36)	0.30 (0.25–0.37)	0.95 (0.79–1.13)	2.54 (2.29–2.83)
2	0.82 (0.75–0.90)	1.35 (1.28–1.42)	0.44 (0.38–0.51)	1.19 (1.01–1.38)	2.38 (2.16–2.63)
3	0.72 (0.66–0.78)	1.26 (1.15–1.38)	0.25 (0.20–0.31)	0.75 (0.67–0.84)	2.40 (2.11–2.73)
4	0.51 (0.44–0.59)	0.93 (0.85–1.02)	0.26 (0.22–0.30)	1.19 (1.07–1.33)	1.42 (1.27–1.58)
5	0.53 (0.45–0.63)	0.89 (0.84–0.94)	0.21 (0.17–0.26)	1.15 (1.03–1.29)	1.27 (1.16–1.39)
6	0.54 (0.40–0.74)	1.01 (0.91–1.11)	0.30 (0.24–0.38)	1.74 (1.60–1.89)	1.81 (1.68–1.95)
7	4.15 (3.63–4.74)	11.36 (10.42–12.38)	3.92 (3.07–5.01)	6.21 (5.19–7.43)	8.54 (6.44–11.34)
8	2.14 (1.93–2.37)	4.46 (3.96–5.01)	5.90 (4.74–7.34)	>17.98	14.39 (12.11–17.11)
9	2.59 (2.29–2.93)	5.36 (4.90–5.87)	0.75 (0.59–0.95)	2.79 (2.45–3.17)	4.16 (3.62–4.78)
10	2.08 (1.90–2.28)	2.68 (2.45–2.92)	0.74 (0.49–1.11)	2.98 (2.70–3.28)	2.93 (2.58–3.33)
11	1.12 (1.01–1.24)	2.13 (1.97–2.31)	0.51 (0.34–0.76)	1.82 (1.48–2.23)	2.25 (1.88–2.70)
12	1.34 (1.15–1.56)	2.60 (2.40–2.82)	1.15 (1.03–1.27)	4.33 (3.43–5.47)	4.56 (3.56–5.84)
13	0.81 (0.74–0.88)	1.80 (1.62–1.99)	0.50 (0.43–0.60)	1.93 (1.63–2.28)	1.66 (1.51–1.83)
14	0.68 (0.61–0.75)	1.71 (1.51–1.95)	0.40 (0.35–0.46)	1.52 (1.27–1.82)	2.01 (1.61–2.51)
15	0.78 (0.70–0.87)	2.40 (2.14–2.69)	0.55 (0.45–0.66)	1.96 (1.62–2.37)	2.42 (1.98–2.96)
16	0.49 (0.44–0.54)	1.38 (1.24–1.53)	0.15 (0.12–0.19)	1.26 (1.06–1.51)	1.19 (1.05–1.35)
17	0.68 (0.64–0.73)	1.89 (1.69–2.12)	0.54 (0.47–0.61)	1.78 (1.60–1.98)	1.87 (1.57–2.23)
18	0.86 (0.76–0.97)	1.75 (1.55–1.98)	0.79 (0.68–0.93)	3.17 (2.67–3.76)	1.16 (1.01–1.33)
20	3.85 (3.70–4.00)	6.65 (5.68–7.78)	0.98 (0.55–1.71)	3.99 (3.88–4.10)	2.67 (2.51–2.82)
21	8.60 (7.92–9.34)	9.64 (8.02–11.59)	0.42 (0.31–0.55)	8.96 (8.23–9.75)	3.14 (2.91–3.37)
22	4.78 (4.50–5.08)	4.15 (3.31–5.20)	0.28 (0.13–0.60)	4.91 (4.69–5.13)	2.81 (2.55–3.09)
23	5.25 (4.96–5.54)	5.50 (4.59–6.57)	0.31 (0.15–0.61)	5.25 (4.41–6.22)	2.81 (2.54–3.11)
24	5.59 (5.12–6.10)	6.34 (5.06–7.93)	0.33 (0.14–0.75)	5.66 (5.16–6.20)	2.82 (2.51–3.17)
25	4.18 (3.53–4.95)	5.89 (5.38–6.43)	0.37 (0.19–0.69)	4.92 (4.33–5.58)	2.93 (2.59–3.29)
26	6.19 (5.58–6.86)	15.29 (14.84–15.75)	0.31 (0.21–0.43)	7.40 (7.00–7.80)	4.69 (4.45–4.94)
27	3.32 (2.81–3.91)	5.28 (4.91–5.66)	0.40 (0.37–0.43)	6.40 (5.57–7.35)	4.90 (4.44–5.41)
28	9.39 (8.25–10.67)	9.16 (8.10–10.34)	0.81 (0.65–1.00)	7.38 (6.99–7.77)	5.88 (4.66–7.42)
30	2.73 (2.33–3.19)	4.71 (4.22–5.25)	0.80 (0.74–0.85)	4.86 (4.32–5.46)	7.13 (6.65–7.63)
31	3.34 (2.10–5.30)	6.71 (5.769–7.79)	0.42 (0.37–0.46)	4.40 (3.67–5.26)	5.67 (4.45–7.21)
32	2.58 (2.09–3.17)	3.50 (3.28–3.71)	0.06 (0.02–0.16)	4.17 (3.44–5.04)	2.93 (2.08–4.11)
33	2.10 (1.74–2.52)	4.08 (2.94–5.65)	0.39 (0.03–4.99)	4.01 (0.54–29.63)	3.63 (3.38–3.88)
34	3.70 (3.38–4.05)	2.66 (2.14–3.29)	0.38 (0.27–0.51)	6.08 (5.91–6.25)	2.94 (2.32–3.70)
35	3.82 (3.43–4.26)	3.08 (2.61–3.64)	0.31 (0.30–0.31)	5.49 (4.45–6.77)	2.75 (2.49–3.04)
36	5.36 (4.87–5.88)	6.03 (4.73–7.69)	0.41 (0.39–0.43)	4.16 (3.74–4.63)	6.86 (6.40–7.34)
37	1.95 (1.54–2.47)	5.65 (5.17–6.16)	0.17 (0.16–0.18)	2.71 (2.60–2.81)	3.70 (3.25–4.21)
38	6.23 (5.48–7.08)	6.62 (5.71–7.66)	0.78 (0.65–0.93)	9.27 (8.56–10.03)	5.70 (4.99–6.50)
39	1.12 (0.93–1.34)	4.64 (3.68–5.86)	1.06 (0.95–1.19)	3.23 (1.81–9.23)	1.86 (1.65–2.10)
40	1.58 (1.29–2.08)	1.92 (1.25–3.10)	0.62 (0.57–0.68)	2.80 (2.35–3.34)	2.84 (2.43–3.32)
41	1.18 (1.05–1.34)	3.07 (2.46–3.87)	1.05 (1.05–1.23)	2.95 (2.45–3.57)	1.10 (0.74–1.65)
42	0.84 (0.74–0.96)	2.61 (2.09–3.27)	1.00 (0.90–1.11)	2.19 (1.96–2.45)	1.10 (0.81–1.50)
43	1.08 (0.87–1.34)	2.11 (1.82–2.43)	0.63 (0.45–0.93)	1.54 (1.10–2.19)	1.74 (1.38–2.22)
44	0.79 (0.69–0.91)	1.64 (1.40–1.93)	11.04 (8.37–15.00)	1.56 (1.31–1.85)	1.52 (1.13–2.04)
45	1.02 (0.88–1.17)	3.48 (2.82–4.29)	1.51 (1.38–1.66)	3.18 (2.82–3.59)	1.20 (0.97–1.51)
46	1.70 (1.47–1.98)	2.33 (1.67–3.41)	0.83 (0.74–0.94)	5.73 (3.89–9.65)	1.71 (1.19–2.54)
47	2.25 (1.96–2.60)	6.44 (5.40–7.68)	1.68 (1.53–1.86)	3.87 (3.01–4.98)	2.80 (2.35–3.33)
48	7.62 (6.49–8.95)	>10	4.09 (3.52–4.76)	>10	—
49	7.55 (6.76–8.44)	9.35 (8.50–10.30)	3.17 (2.78–3.60)	>10	>10
50	2.03 (1.88–2.20)	2.10 (1.71–2.59)	3.87 (3.41–4.40)	5.16 (4.61–5.79)	13.15 (11.20–15.43)
51	>10	>10	4.19 (3.42–5.14)	>10	>10
Doxorubicin	0.21 (0.16–0.29)	0.76 (0.59–0.93)	0.02 (0.01–0.02)	1.20 (1.03–1.39)	1.72 (1.58–1.87)

Lapachone models containing selenium (21–28, 31–38).

Most of the compounds belonging to this series were less active, with higher IC₅₀ values for HCT-116, PC-3 and SNB-19 cell lines, from 2.10 μM (compound 33, HCT-116) to 15.29 μM (compound 26, PC-3). Nonetheless, these compounds were not wholly uninteresting either, as they exhibited higher IC₅₀ values for L929 cells, when compared to the previous results, *de facto* an improvement in selectivity. The most notable results are observed for the HL-60 lineage, where compounds presented low IC₅₀ values between 0.06 μM and 0.81 μM, and therefore are highly active for these cells.

Compound 32, in particular, yielded an IC₅₀ (HL-60) of 0.31 μM, compared to an IC₅₀ of 4.49 against the reference L929 cell line. Therefore, several members of these series may be considered as promising prototypes in the treatment of human promyelocytic leukemia.

Furthermore, compounds 39–47 and 48–51 did not show any pronounced cytotoxic effects, and *ortho*-quinone derivatives generally were more active compared to *para*-quinones. The *ortho*-quinones may be more amenable to generate or employ reactive oxygen species (ROS) in their task to damage and subsequently destroy the cancer cells, an

Table 2 Selectivity index for selected compounds [selectivity index, represented by the ratio of cytotoxicities between normal cells and different lines of cancer cells]

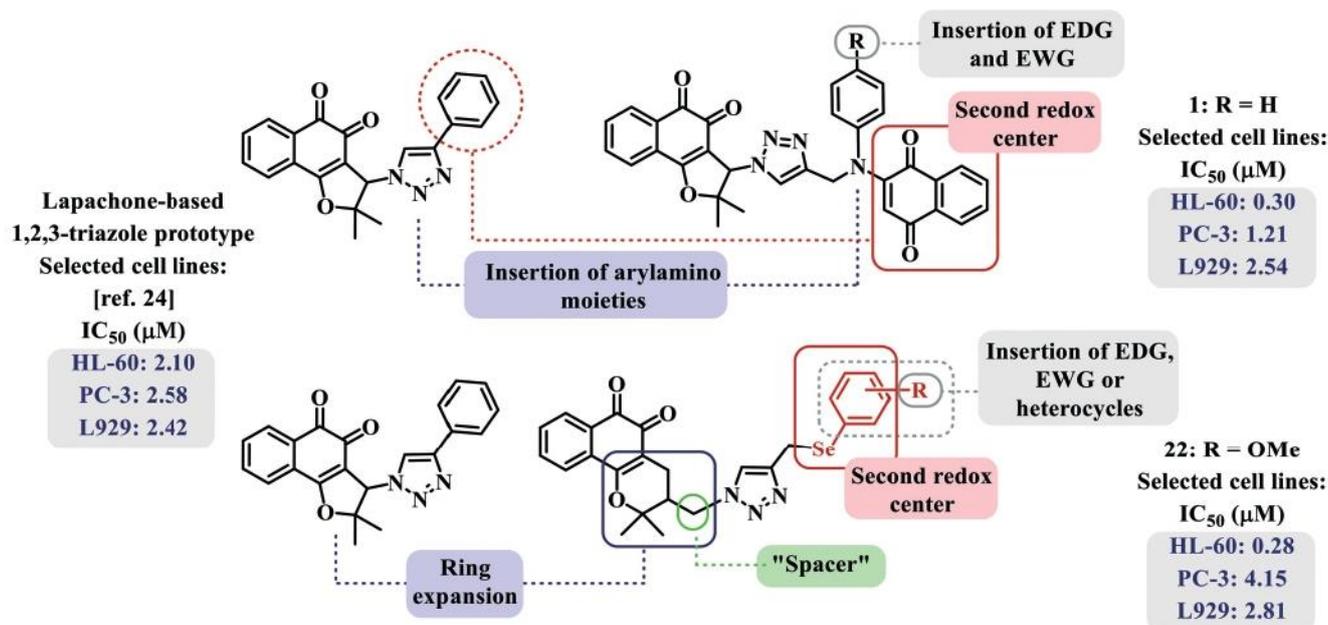
Compounds	HCT-116	PC-3	HL-60	SNB-19
1	51	2.1	8.4	2.7
2	2.9	1.8	5.4	2
3	3.3	1.9	9.6	3.2
4	2.8	1.5	5.5	1.2
5	2.4	1.4	6.1	1.1
6	3.4	1.8	6.1	1.1
7	2.1	0.8	2.2	1.4
8	6.7	3.2	2.4	0.8
9	1.9	0.8	5.5	1.5
10	1.4	1.1	3.9	0.9
11	2.0	1.1	4.4	1.2
12	3.4	1.7	3.9	1.1
13	2.1	0.9	3.3	0.8
14	2.9	1.2	5.0	1.3
15	3.1	1.0	4.4	1.2
16	2.4	0.8	7.9	0.9
17	2.8	0.9	3.5	1.1
18	1.3	0.7	1.5	0.4
20	0.7	0.4	2.7	0.7
21	0.4	0.3	7.5	0.4
22	0.6	0.7	10.0	0.6
23	0.5	0.5	9.1	0.5
24	0.5	0.4	8.5	0.5
25	0.7	0.5	7.9	0.6
26	0.8	0.3	15.1	0.6
27	1.5	0.9	12.2	0.8
28	0.7	0.6	7.2	0.8
30	2.6	1.5	8.9	1.5
31	1.7	0.8	13.5	1.3
32	1.1	0.8	48.8	0.7
33	1.7	0.9	9.3	0.9
34	0.8	1.1	7.7	0.5
35	0.7	0.9	8.8	0.5
36	1.3	1.1	16.7	1.6
37	1.9	0.7	21.7	1.4
38	0.9	0.8	7.3	0.6
39	1.6	0.4	1.7	0.6
40	1.8	1.5	4.5	1.0
41	0.9	0.4	1.0	0.4
42	1.3	0.4	1.1	0.5
43	1.6	0.8	2.8	1.1
44	1.9	0.9	0.1	0.9
45	1.2	0.3	0.8	0.4
47	1.0	0.7	2.1	0.3
Doxorubicin	8.2	2.3	86	1.4

aspect, which needs to be explored in more detail. It should also be mentioned that many quinones are able to act catalytically inside cells and this kind of redox catalysis associated with many of these natural products and their derivatives may also explain the unique combination of high activity and high selectivity. In fact, the intracellular redox balance in cells tends to differ, and redox modulating catalysts in some ways sense these differences in ROS levels and exert their actions accordingly. Such catalytic sensor/effector agents are very promising and, in this concept, the presence of selenium is probably also beneficial for cytotoxic activity, and in any case, worth following up.

Despite the complexity to establish structure–activity relationship (SAR) aspects due to the wide structural variety

of the compounds and different tumor cell lines evaluated here, we draw a parallel of the potential of the new compounds in comparison with nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazole derivatives, previously described in the literature.²⁴ For HL-60 and PC-3 tumor cell lines, the triazole derivative shows IC₅₀ values are equal to 2.10 and 2.58, respectively. The insertion of a second *para*-quinonoid redox center allowed more potent and selective compounds to be obtained. As an example, compound **1**, with IC₅₀ values = 0.30 for HL-60 and 1.21 for PC-3, is seven-fold more active than the precursor triazole when considering the HL-60 tumor cell lines and two times more active against PC-3. We also evaluated the C-ring modification, insertion of a spacer and selenium as second redox center, to prepare new triazole derivatives containing two redox centers. This approach allowed us to maximize the activity of the compounds against HL-60 cell lines, but we observed a decrease in potency against PC-3, for example. The toxicity on L-929 cell lines remained similar in most cases. An important aspect of the strategy applied in this study is the observation that the compounds with two redox centers were more active against tumor cell lines but exhibited similar or lower toxicity against the non-tumor cell line L-929. For instance, the selectivity index for compound **1** was higher than the values observed for the triazole derivative previously reported²⁴ (Scheme 5). In general, we observed that the insertion of a second quinoidal or selenium redox center, enhanced the antitumor activity of the compounds against some tumor cell lines and decreased the cytotoxicity of the compounds. Naturally, there is a modification in the redox balance leading to these observations. Although, the nature of the mechanism of action involved in the antitumor activity of these compounds is not yet fully elucidated, we selected compound **42** and performed experiments of cell membrane integrity and viability, phosphatidylserine externalization, mitochondrial transmembrane potential and measurement of intracellular reactive oxygen species levels aiming to understand some aspects of the mechanism involving molecules containing two redox centers. Initially, the cytotoxic activity of compound **42** was evaluated in HCT-116 cells (0.85 μ M, 1.7 μ M and 3.5 μ M). These concentrations were based on the IC₅₀ values obtained by the MTT assay after 24 h of treatment. Nor- β -Lapachone (NBL, 4 μ M), a well-known naphthoquinone with antitumor activity, was used as a positive control.²⁵ As observed in Fig. 2, the quinone **42** led to a significant reduction in the number of viable cells when compared to both negative and positive (NBL) controls, corroborating the findings observed in the MTT assay. Our experiments also indicated that after 24 h of treatment, **42** induced significant apoptosis in the concentrations of 1.7 and 3.5 μ M (Fig. 3).

Anticancer studies usually count on selective induced apoptosis as a tool for the fight against cancer cell lines. As well discussed by Galluzzi and co-workers, from a biochemical point of view, apoptosis is defined as a caspase-dependent variant of regulated cell-death (RCD).²⁷ Apoptosis



Scheme 5 Nor-β-lapachone-based 1,2,3-triazole derivative and examples of compounds containing two redox centers: a comparative overview.

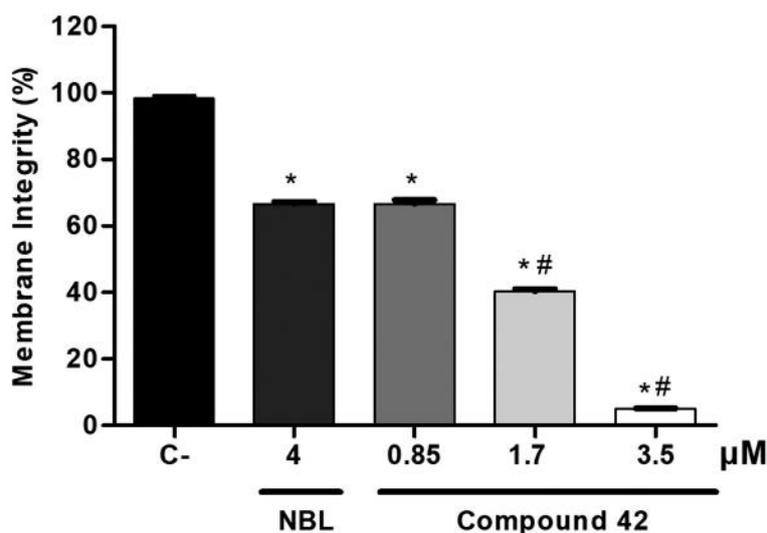


Fig. 2 Effect of compound 42 on cell membrane integrity in HCT-116 cells determined by flow cytometry, after 24 hours incubation. Nor-β-lapachone (NBL, 4 μM) was used as positive control. Data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. C-, negative control, was incubated with the vehicle used to dilute the tested compound. *, $p < 0.05$ compared to negative control by ANOVA followed by Dunnett's test. #, $p < 0.05$ compared to positive control by ANOVA followed by Dunnett's test.

can be triggered by intracellular (intrinsic) or extracellular (extrinsic) stimuli.^{26,27} The intrinsic apoptosis is initiated by perturbations of the extracellular or intracellular microenvironment and this process is commonly known as mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP).^{28,29} In the other hand, the extrinsic apoptosis is a specific variant of RCD initiated by perturbations of the extracellular microenvironment, and is resulted by the activation of CASP8/CASP3, which, in some cell types, also involves MOMP, due to the CASP8-dependent activation of BH3-interacting domain death agonist (BID).³⁰

Aware of the importance of apoptotic events related to antitumor studies, we performed mitochondrial transmembrane potential experiments with the quinoidal derivative 42. According to the results observed in Fig. 4, after 24 h of treatment, 42 induced a concentration-dependent alteration in the mitochondrial transmembrane potential, indicating that the molecule might be inducing an apoptotic cell death through the intrinsic pathway.

In general, the antitumor activity of quinonoid compounds is intrinsically related to the generation of reactive oxygen species (ROS).³¹ In this sense, we also

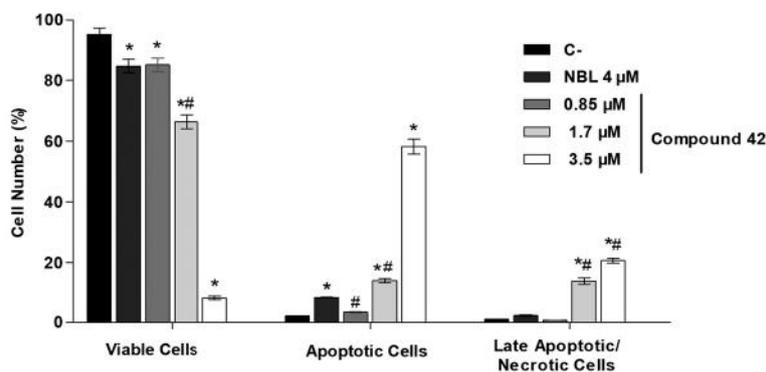


Fig. 3 Effect of compound 42 on the PS externalization in HCT-116 cells determined by flow cytometry using Annexin V/7-AAD staining, after 24 hours incubation. Nor- β -lapachone (NBL, 4 μ M) was used as positive control. 7-AAD-negative and Annexin V-negative cells were considered viable. Annexin V-positive cells and 7-AAD negative cells were considered early apoptotic cells. Annexin V-positive cells and 7-AAD positive cells were considered late apoptotic/necrotic cells. Data are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments. C-, negative control, was incubated with the vehicle used to dilute the tested compound. *, $p < 0.05$ compared to negative control by ANOVA followed by Dunnett's test. #, $p < 0.05$ compared to positive control by ANOVA followed by Dunnett's test.

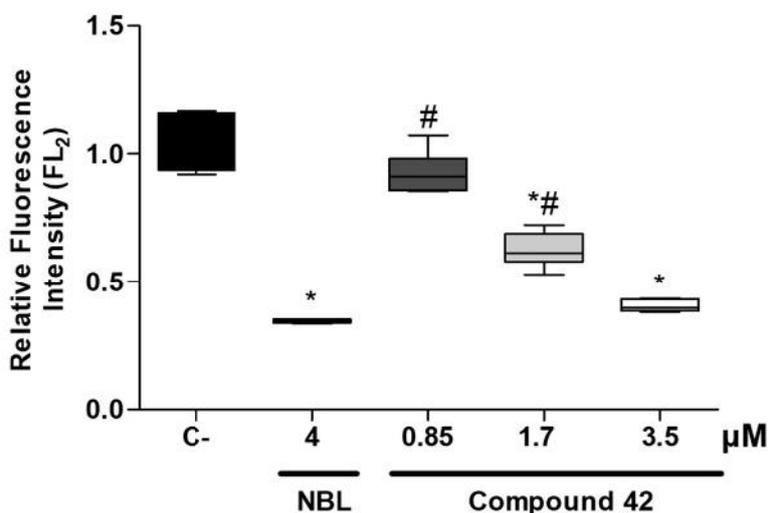


Fig. 4 Effect of compound 42 on the mitochondrial transmembrane potential in HCT-116 cells determined by flow cytometry using rhodamine 123, after 24 hours incubation. Nor- β -lapachone (NBL, 4 μ M) was used as positive control. Data are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments. C-, negative control, was incubated with the vehicle used to dilute the tested compound. *, $p < 0.05$ compared to negative control by ANOVA followed by Bonferroni's test. #, $p < 0.05$ compared to positive control by ANOVA followed by Bonferroni's test.

evaluated the ability of compound 42 to generate ROS. The naphthoquinone 42 induced a significant increasing in intracellular ROS levels (Fig. 5), in a time- and concentration-dependent manner, reaching a higher ROS + cell count at 5 hours. As expected, the positive control nor- β -lapachone also induced significant ($p < 0.05$) ROS generation.

Further studies to understand more details on the mechanism of action of the compounds outlined here are in progress in our laboratories and will be published in due course.

3. Conclusions

In this study, we have described the synthesis and cytotoxic evaluation of 47 new quinones, each containing two redox centers and a triazole centre as a result of our click approach to

assemble the individual redox building blocks. Whilst some of these compounds have combined *ortho*- and *para*-quinone redox sites, others contain selenium. With these compounds in hand, we have been able to confirm that our strategy of joining two redox centers is effective in delivering highly active compounds against several tumor cell lines, frequently with activities in the mid nanomolar range and considerable selectivity when compared to the L929 reference cell line. Indeed, we have obtained more than 22 compounds with IC₅₀ values below 2 μ M, demonstrating their cytotoxic potential as new prototypes for subsequent studies to identify new antitumor drugs. Together with the accessible synthetic approaches described herein, our studies provide a wide range of compounds with powerful cytotoxic activity and represent an avenue of possibilities when searching for new drugs to be inserted in the therapeutic arsenal against cancer and similar diseases.

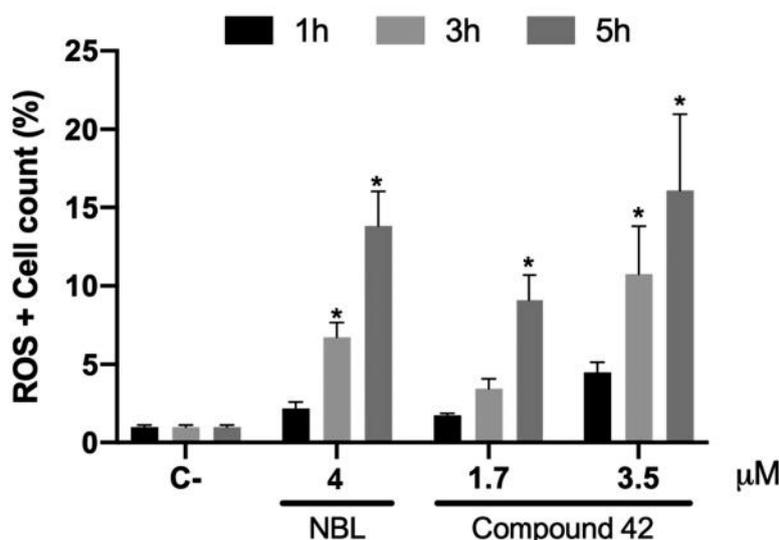


Fig. 5 Effect of naphthoquinone 42 on ROS production in HCT-116 cells determined by flow cytometry using CM-H₂DCFDA, after 1-, 3- and 5 hours incubation. Nor-β-lapachone (NBL, 4 μM) was used as positive control. A total of 10 000 events were analyzed per sample. Data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. C-, negative control, was incubated with the vehicle used to dilute the tested compound. *, $p < 0.05$ compared to negative control by ANOVA followed by Dunnett's test.

4. Experimental section

For all experimental details, including general procedures, synthesis of substrates, the general procedure for Cu(i) catalyzed “click” cycloadditions, crystallographic data, biological assays, NMR spectra, HRMS and elemental analysis, see ESI.†

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was funded by grants from CNPq (PQ 309774/2020-9 and 309687/2018-7), FAPEMIG (PPM-00635-18 and PPM-630-18), CAPES (Finance code 001) and INCT-Catálise-Fapesc-CNPq. ENSJ would also like to thank Capes-Humboldt research fellowship program for experienced researchers (Proc. No. 88881.145517/2017-01), Return Fellowship of the Alexander von Humboldt Foundation (AvH) and the Royal Society of Chemistry for the research fund grant (R19-9781). GAMJ thanks CNPq for postdoctoral financial support (Project no. 151150/2018-4). CP would like to thank INCT BioNat, National Institute of Science and Technology (grant no. 465637/2014-0). CJ would like to thank the University of Saarland, Saarbruecken, Germany. The authors would also like to thank the Multi-User Facility of Drug Research and Development Center of Federal University of Ceara and the Analytical Center of the University of São Paulo.

Notes and references

1 (a) T. L. Silva, M. L. S. G. de Azevedo, F. R. Ferreira, D. C. Santos, C. Amatore and M. O. F. Goulart, *Curr. Opin. Electrochem.*, 2020, **24**, 79; (b) E. N. da Silva Júnior, G. A. M. Jardim, C. Jacob, U. Dhawa, L. Ackermann and S. L. de Castro, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **179**, 863; (c) P. J. O'Brien, *Chem.-Biol. Interact.*, 1991, **80**, 1; (d) E. A. Hillard, F. C. de Abreu, D. C. M. Ferreira, G. Jaouen, M. O. F. Goulart and C. Amatore, *Chem. Commun.*, 2008, 2612; (e) K. W. Wellington, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 20309; (f) S. Bannwitz, D. Krane, S. Vortherms, T. Kalin, C. Lindenschmidt, N. Z. Golpayegani, J. Tentrop, H. Prinz and K. Müller, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 6226.

- R. Docampo, F. S. Cruz, A. Boveris, R. P. Muniz and D. M. Esquivel, *Biochem. Pharmacol.*, 1979, **28**, 723.
- E. A. Bey, M. S. Bentle, K. E. Reinicke, Y. Dong, C. R. Yang, L. Girard, J. Minna, W. G. Bornmann, J. Gao and D. A. Boothman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 11832.
- For recent advances, see: (a) G. A. M. Jardim, I. A. O. Bozzi, W. X. C. Oliveira, C. Mesquita-Rodrigues, R. F. S. Menna-Barreto, R. A. Kumar, E. Gravel, E. Doris, A. L. Braga and E. N. da Silva Júnior, *New J. Chem.*, 2019, **43**, 13751; (b) Z. Cheng, W. O. Valença, G. G. Dias, J. Scott, N. D. Barth, F. de Moliner, G. B. P. Souza, R. J. Mellanby, M. Vendrell and E. N. da Silva Júnior, *Bioorg. Med. Chem.*, 2019, **27**, 3938; (c) R. G. Almeida, R. L. de Carvalho, M. P. Nunes, R. S. Gomes, L. F. Pedrosa, C. A. de Simone, E. Gopi, V. Geertsen, E. Gravel, E. Doris and E. N. da Silva Júnior, *Catal. Sci. Technol.*, 2019, **9**, 2742; (d) G. G. Dias, T. A. do Nascimento, A. K. A. de Almeida, A. C. S. Bombaça, R. F. S. Menna-Barreto, C. Jacob, S. Warratz, E. N. da Silva Júnior and L. Ackermann, *Eur. J. Org. Chem.*, 2019, **13**, 2344; (e) J. M. Wood, E. N. da Silva Júnior and J. F. Bower, *Org. Lett.*, 2020, **22**, 265.
- C. Viegas-Junior, A. Danuello, S. V. Bolzani, E. J. Barreiro and C. A. Fraga, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 1829.
- L. M. Lima and E. J. Barreiro, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 23.

- 7 (a) G. G. Dias, T. Rogge, R. Kuniyil, C. Jacob, R. F. S. Menna-Barreto, E. N. da Silva Júnior and L. Ackermann, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 12840; (b) G. A. M. Jardim, W. X. C. Oliveira, R. P. de Freitas, R. F. S. Menna-Barreto, T. L. Silva, M. O. F. Goulart and E. N. da Silva Júnior, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 1686; (c) G. A. M. Jardim, E. N. da Silva Júnior and J. F. Bower, *Chem. Sci.*, 2016, **17**, 3780.
- 8 (a) G. A. M. Jardim, W. J. Reis, M. F. Ribeiro, F. M. Ottoni, R. J. Alves, T. L. Silva, M. O. F. Goulart, A. L. Braga, R. F. Menna-Barreto, K. Salomão, S. L. Castro and E. N. da Silva Júnior, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 78047; (b) S. B. B. Bahia, W. J. Reis, G. A. M. Jardim, F. T. Souto, C. A. de Simone, C. C. Gatto, R. F. Menna-Barreto, S. L. de Castro, B. C. Cavalcante, C. Pessoa, M. H. Araujo and E. N. da Silva Júnior, *MedChemComm*, 2016, **7**, 1555; (c) E. H. G. da Cruz, M. A. Silvers, G. A. M. Jardim, J. M. Resende, B. C. Cavalcanti, I. S. Bomfim, C. Pessoa, C. A. de Simone, G. V. Botteselle, A. L. Braga, D. K. Nair, I. N. N. Namboothiri, D. A. Boothman and E. N. da Silva Júnior, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **122**, 1.
- 9 R. K. P. C. Sharma and M. S. Yar, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2011, **26**, 1.
- 10 (a) E. B. T. Diogo, G. G. Dias, B. L. Rodrigues, T. T. Guimarães, W. O. Valença, C. A. Camara, R. N. de Oliveira, M. G. da Silva, V. F. Ferreira, Y. G. de Paiva, M. O. F. Goulart, R. F. S. Menna-Barreto, S. L. de Castro and E. N. da Silva Júnior, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **211**, 6337; (b) T. T. Guimarães, M. C. F. R. Pinto, J. S. Lanza, M. N. Melo, R. L. do Monte-Neto, I. M. M. de Melo, E. B. T. Diogo, V. F. Ferreira, C. A. Camara, W. O. Valença, R. N. de Oliveira, F. Frézard and E. N. da Silva Júnior, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **63**, 523.
- 11 (a) S. Shaaban, R. Diestel, B. Hinkelmann, Y. Muthukumar, R. P. Verma, F. Sasse and C. Jacob, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **58**, 192; (b) S. Shabaan, L. A. Ba, M. Abbas, T. Burkholz, A. Denkert, A. Gohr, L. A. Wessjohann, F. Sasse, W. Weber and C. Jacob, *Chem. Commun.*, 2009, 4702; (c) M. Doering, L. A. Ba, N. Lilienthal, C. Nicco, C. Scherer, M. Abbas, A. A. P. Zada, R. Coriat, T. Burkholz, L. Wessjohann, M. Diederich, F. Batteux, M. Herling and C. Jacob, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 6954.
- 12 E. N. da Silva Júnior, M. C. B. V. de Souza, A. V. Pinto, M. C. F. R. Pinto, M. O. F. Goulart, F. W. A. Barros, C. Pessoa, L. V. Costa-Lotufo, R. C. Montenegro, M. O. de Moraes and V. F. Ferreira, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 7035.
- 13 (a) A. A. Vieira, I. R. Brandão, W. O. Valença, C. A. de Simone, B. C. Cavalcanti, C. Pessoa, T. R. Carneiro, A. L. Braga and E. N. da Silva Júnior, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **101**, 254; (b) G. A. M. Jardim, E. H. G. da Cruz, W. O. Valença, D. J. B. Lima, B. C. Cavalcanti, C. Pessoa, J. Rafique, A. L. Braga, C. Jacob and E. N. da Silva Júnior, *Molecules*, 2018, **23**, 83.
- 14 (a) M. C. F. R. Pinto, A. V. Pinto and C. G. T. Oliveira, *An. Acad. Bras. Cienc.*, 1980, **52**, 481; (b) L. F. Fieser and M. Fieser, *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 3215; (c) E. N. da Silva Júnior, M. C. B. V. Souza, A. V. Pinto, M. C. F. R. Pinto, V. F. Ferreira, R. F. S. Menna-Barreto, R. S. F. Silva, D. V. Teixeira, C. A. de Simone and S. L. de Castro, *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, **43**, 1774.
- 15 (a) C. S. Lisboa, V. G. Santos, B. G. Vaz, N. C. de Lucas, M. N. Eberlin and S. J. Garden, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 5264; (b) B. D. Bala, S. Muthusarayanan, T. S. Choon, M. A. Ali and S. Perumal, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **85**, 737; (c) B. D. Bala, S. Muthusarayanan and S. Perumal, *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 3735.
- 16 E. N. da Silva Júnior, I. M. M. Melo, E. B. T. Diogo, V. A. Costa, J. D. S. Filho, W. O. Valença, V. A. Camara, R. N. Oliveira, A. S. Araújo, F. S. Emery, M. R. Santos, C. A. Simone, R. F. S. Menna-Barreto and S. L. Castro, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **52**, 304.
- 17 R. S. F. Silva, E. M. Costa, U. L. T. Trindade, D. V. Teixeira, M. C. F. R. Pinto, G. L. Santos, V. R. S. Malta, C. A. de Simone, A. V. Pinto and S. L. de Castro, *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, **41**, 526.
- 18 S. L. Castro, F. S. Emery and E. N. da Silva Júnior, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **69**, 678.
- 19 E. N. da Silva Júnior, T. T. Guimarães, R. F. S. Menna-Barreto, M. C. Pinto, C. A. Simone, C. Pessoa, B. C. Cavalcanti, J. R. Sabino, C. K. Andrade, M. O. F. Goulart, S. L. Castro and A. V. Pinto, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 3224.
- 20 C. C. David, A. C. S. Lins, T. M. S. Silva, J. F. Campos, T. G. Silva, G. C. G. Militão and C. A. Camara, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2019, **30**, 8.
- 21 T. F. Borgati, R. B. Alves, R. R. Teixeira, R. P. Freitas, T. G. Perdigão, S. F. Silva, A. A. dos Santos and A. J. O. Bastidas, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2013, **24**, 953.
- 22 H. J. Reich, S. K. Shah, P. M. Gold and R. E. Olson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3112.
- 23 E. Pérez-Sacau, R. G. Díaz-Peñate, A. Estévez-Braun, A. G. Ravelo, J. M. Garcia-Castellano, L. Pardo and M. Campillo, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 696.
- 24 (a) E. N. da Silva Júnior, M. A. B. F. de Moura, A. V. Pinto, M. C. F. R. Pinto, M. C. B. V. de Souza, A. J. Araújo, C. Pessoa, L. V. Costa-Lotufo, R. C. Montenegro, M. O. de Moraes, V. F. Ferreira and M. O. F. Goulart, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2009, **20**, 635; (b) M. F. Cardoso, P. C. Rodrigues, M. E. I. Oliveira, I. L. Gama, I. M. da Silva, I. O. Santos, D. R. Rocha, R. T. Pinho, V. F. Ferreira, M. C. B. V. de Souza, F. C. da Silva and F. P. Silva-Jr, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **84**, 708; (c) M. F. Cardoso, I. M. da Silva, H. M. D. Santos Júnior, D. R. Rocha, A. J. Araújo, C. Pessoa, M. O. de Moraes, L. V. C. Lotufo, F. C. da Silva, W. C. Santos Ferreira and V. F. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2013, **24**, 12; (d) B. C. Cavalcanti, I. O. Cabral, F. A. R. Rodrigues, F. W. A. Barros, D. D. Rocha, H. I. F. Magalhães, D. J. Moura, J. Saffi, J. A. P. Henriques, T. S. C. Carvalho, M. O. Moraes, C. Pessoa, I. M. M. de Melo and E. N. da Silva Júnior, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2013, **24**, 145.
- 25 B. C. Cavalcanti, F. W. A. Barros, I. O. Cabral, J. R. O. Ferreira, H. I. F. Magalhães, H. V. Nobre Júnior, E. N. da Silva Júnior, F. C. de Abreu, C. O. Costa, M. O. F. Goulart,

- M. O. Moraes and C. Pessoa, *Chem. Res. Toxicol.*, 2011, **24**, 1560.
- 26 (a) L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H.-U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer, *Cell Death Differ.*, 2012, **19**, 107; (b) R. C. Taylor, S. P. Cullen and S. J. Martin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, **9**, 231.
- 27 For further details on apoptotic events, see: (a) L. Galluzzi, J. M. B.-S. Pedro, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, E. S. Alnemri, L. Altucci, D. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, E. H. Baehrecke, N. G. Bazan, M. J. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D. E. Bredesen, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. D. Laurenzi, R. D. Maria, K.-M. Debatin, N. D. Daniele, V. M. Dixit, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, G. M. Fimia, R. A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, M.-L. Gougeon, D. R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, M. O. Hengartner, H. Ichijo, B. Joseph, P. J. Jost, T. Kaufmann, O. Kepp, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. López-Otín, E. Lugli, F. Madeo, W. Malorni, J.-C. Marine, S. J. Martin, J.-C. Martinou, J. P. Medema, P. Meier, S. Melino, N. Mizushima, U. Moll, C. Muñoz-Pinedo, G. Nuñez, A. Oberst, T. Panaretakis, J. M. Penninger, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, K. S. Ravichandran, R. Rizzuto, C. M. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, Y. Shi, H.-U. Simon, B. R. Stockwell, G. Szabadkai, S. W. Tait, H. L. Tang, N. Tavernarakis, Y. Tsujimoto, T. V. Berghe, P. Vandenabeele, A. Villunger, E. F. Wagner, H. Walczak, E. White, W. G. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer, *Cell Death Differ.*, 2015, **22**, 58; (b) L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K.-M. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. D. Laurenzi, R. D. Maria, K.-M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. D. Daniele, F. D. Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. García-Sáez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jäättelä, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. López-Otín, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J.-C. Marine, S. J. Martin, J.-C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkenkin, U. M. Moll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H.-U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. V. Berghe, P. Vandenabeele, M. G. V. Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino and G. Kroemer, *Cell Death Differ.*, 2018, **25**, 486.
- 28 (a) P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser and J. M. Adams, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, **15**, 49; (b) T. Moldoveanu, A. V. Follis, R. W. Kriwacki and D. R. Green, *Trends Biochem. Sci.*, 2014, **39**, 101; (c) A. Shamas-Din, J. Kale, B. Leber and D. W. Andrews, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 2013, **5**, a008714.
- 29 (a) X. Liu, C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang, *Cell*, 1996, **86**, 147; (b) J. Yang, X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones and X. Wang, *Science*, 1997, **275**, 1129; (c) P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang, *Cell*, 1997, **91**, 479; (d) H. Zou, W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg and X. Wang, *Cell*, 1997, **90**, 405; (e) Y. P. Ow, D. R. Green, Z. Hao and T. W. Mak, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, **9**, 532.
- 30 (a) X. Luo, I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang, *Cell*, 1998, **94**, 481; (b) A. Gross, X. M. Yin, K. Wang, M. C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S. J. Korsmeyer, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 1156; (c) X. M. Yin, K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth and S. J. Korsmeyer, *Nature*, 1999, **400**, 886; (d) C. Scaffidi, I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer and M. E. Peter, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 22532; (e) F. Gonzalez, Z. T. Schug, R. H. Houtkooper, E. D. MacKenzie, D. G. Brooks, R. J. A. Wanders, P. X. Petit, F. M. Vaz and E. Gottlieb, *J. Cell Biol.*, 2008, **183**, 681; (f) Y. Zaltsman, L. Shachnai, N. Yivgi-Ohana, M. Schwarz, M. Maryanovich, R. H. Houtkooper, F. M. Vaz, F. D. Leonardis, G. Fiermonte, F. Palmieri, B. Gillissen, P. T. Daniel, E. Jimenez, S. Walsh, C. M. Koehler, S. S. Roy, L. Walter, G. Hajnoczky and A. Gross, *Nat. Cell Biol.*, 2010, **12**, 553.
- 31 A. J. Araújo, A. A. de Souza, E. N. da Silva Júnior, J. D. B. Marinho-Filho, M. A. B. F. de Moura, D. D. Rocha, M. C.

Vasconcellos, C. O. Costa, C. Pessoa, M. O. de Moraes, V. F. Ferreira, F. C. de Abreu, A. V. Pinto, R. C. Montenegro, L. V.

Costa-Lotufo and M. O. F. Goulart, *Toxicol. In Vitro*, 2012, **26**, 585.