



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

RAUAN CRUZ DE SOUSA

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE DERIVADOS DA LAUSONA EM
LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS**

SÃO CRISTÓVÃO

2023

RAUAN CRUZ DE SOUSA

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE DERIVADOS DA LAUSONA EM
LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado na graduação das Ciências Biológicas na Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção de título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora Profa. Dra. Cristiane Bani Corrêa

SÃO CRISTÓVÃO

2023

**Dedico principalmente aos meu pais,
mas também àqueles que estiveram
comigo e são responsáveis pelo meu
crescimento pessoal e profissional.
Grato!**

AGRADECIMENTOS

Primordialmente, agradeço a minha mãe Wilma e ao meu pai William por todo apoio nessa jornada distante de suas asas, me fortaleceram e me ofertaram de cada gota de suor para poder concluir essa vitória sem desistir. Sem vocês eu não seria nada e trago aqui os resultados dessa conquista a qual posso dedicá-los. Por vocês e para vocês!

A minha bisavó Davina, as minhas avós Marleide e Maria, meus tios e minhas tias, primos e primas, o apoio e carinho de todos vocês foram cruciais para essa conquista.

A gente não encontra carinho, amor e apoio somente em âmbito familiar, encontramos com pessoas que necessariamente não precisa do laço sanguíneo e foi através de amizades que também pude ser fortalecido, eles que estiveram sempre comigo e nunca me deixaram desistir, Line, Júnior, Isadora, Matheus, Emilly, Natália, Monyse, Yasmin, Renata, Rafael, Millena, Creuza, Ramon, Lillian, Lucas, Camila, Beatriz, Júnior, Leone, Matheus e John. Obrigado por estarem sempre por mim e me aturarem em todos os momentos.

Aos meus amigos da minha turma e que pretendo levar para vida toda tudo que vivemos e aprendemos juntos Vinícius, Hortência e Keity. Como também, agradeço a todos os professores responsáveis pelo meu aprendizado, em especial Paulo, Fabiana e Tatiana.

E como não poderia faltar, na iniciação a pesquisa científica tive a oportunidade de participar do maior e melhor laboratório de todo o universo. Fui rodeado de pessoas que me energizaram, me ajudaram, me alegraram, me aturaram e me cobraram diariamente, obrigado Mariana, Willian, João, Monalisa, Jileno, Cris, Tairla, Ayane, Bruno, Amanda, Bryanne e Marcos. Só tenho a agradecer por toda vivência e ensinamento nesses anos, obrigado!

Em especial, agradeço a minha orientadora Cristiane, por toda paciência, carinho e cuidado durante todos esses anos. Espero que ainda tenha que me aturar muito mais anos me enriquecendo de aprendizado e ciência!

E por fim, agradeço a mim mesmo, claro! Por nunca ter desistido, engolido o choro e continuado nessa trajetória árdua, apesar de ter querido chutar os baldes diversas vezes.

RESUMO

AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE DERIVADOS DA LAUSONA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS.

Dentre as doenças não transmissíveis, o câncer é a segunda maior causa de mortes no mundo, sendo um grande problema de saúde pública. Um dos principais problemas no tratamento da doença, é a resistência dos tumores sólidos aos quimioterápicos convencionados. Os produtos naturais se destacam por serem a maior fonte de compostos bioativos e já foi evidenciado que a lausona, um produto natural de origem vegetal, possui efeito citotóxico em diferentes linhagens tumorais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade citotóxica dos derivados de lausona FMO-1, APSO-5 e APSO-19 em linhagens de carcinoma de pulmão (A549) e glioma (C6). A citotoxicidade dos derivados de lausona nas linhagens tumorais foi avaliada pelo ensaio de Sulforrodamina B para determinação da IC₅₀. Além disso, foram avaliados a formação de clones pelo ensaio clonogênico e a capacidade de migração celular pelo ensaio de cicatrização de feridas nas linhagens A549 e C6. Os resultados obtidos mostram que os três compostos apresentaram um efeito citotóxico nas linhagens testadas, em que o FMO-1 apresentou um menor valor de IC₅₀ (2,2 µM) para as duas linhagens. Por apresentar maior atividade citotóxica frente as linhagens A549 e C6, evidenciado pela baixa IC₅₀, o composto FMO-1 foi selecionado para os próximos experimentos na linhagem A549, uma vez que o carcinoma de pulmão é o câncer com maior mortalidade, sendo relevante identificar compostos promissores no seu tratamento. O FMO-1 foi capaz de reduzir a formação de colônias pelas células A549 nas concentrações 1,1 µM, 2,2 µM e 4,4 µM. Além disso, o FMO-1 inibiu a migração celular na concentração de 4,4 µM. Os resultados desse trabalho mostram que os derivados de lausona possuem alto efeito citotóxico nas linhagens tumorais e o FMO-1 possui um maior efeito citotóxico nas linhagens A549 e C6. O FMO-1 também teve um alto efeito na inibição na formação de clones e na migração das células A549, sendo um composto com grande potencial no tratamento do câncer.

Palavra-chave: câncer de pulmão; atividade citotóxica; derivado de lausona.

ABSTRACT

CYTOTOXICITY EVALUATION OF LAUSONE DERIVATIVES IN TUMOR CELL LINEAGES.

Among non-communicable diseases, cancer is the second leading cause of death in the world, being a major public health problem. One of the main problems in the treatment of the disease is the resistance of solid tumors to conventional chemotherapy. Natural products stand out for being the greatest source of bioactive compounds and it has already been shown that lausone, a natural product of plant origin, has a cytotoxic effect on different tumor cell lines. Thus, the objective of this work was to evaluate the cytotoxic activity of lausone derivatives FMO-1, APSO-5 and APSO-19 in lung carcinoma (A549) and glioma (C6) cell lines. The cytotoxicity of lausone derivatives on tumor cell lines was evaluated by the Sulforhodamine B assay to determine the IC₅₀. In addition, the formation of clones by the clonogenic assay and the cell migration capacity by the wound healing assay in the A549 and C6 strains were evaluated. The results obtained show that the three compounds showed a cytotoxic effect in the strains tested, in which the FMO-1 showed a lower IC₅₀ value (2.2 μ M) for the two strains. Due to its greater cytotoxic activity against the A549 and C6 strains, evidenced by the low IC₅₀, the FMO-1 compound was selected for the next experiments on the A549 strain, since lung carcinoma is the cancer with the highest mortality, and it is relevant to identify compounds promising in their treatment. FMO-1 was able to reduce the formation of colonies by A549 cells at concentrations 1.1 μ M, 2.2 μ M and 4.4 μ M. Furthermore, FMO-1 inhibited cell migration at a concentration of 4.4 μ M. The results of this work show that lausone derivatives have a high cytotoxic effect on tumor cell lines and FMO-1 has a greater cytotoxic effect on A549 and C6 cell lines. FMO-1 also had a high effect in inhibiting the formation of clones and the migration of A549 cells, being a compound with great potential in the treatment of cancer.

Keywords: lung cancer; cytotoxicity activity; derived from Lausone.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo geral	2
2.2	Objetivos específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.1	Aspectos gerais do câncer.....	3
3.2	O câncer de pulmão	4
3.3	Metástase do câncer.....	6
3.1	Tratamentos do câncer.....	7
3.2	Produtos naturais	8
3.3	Lausona e derivados	9
4.	METODOLOGIA.....	11
4.1	Derivados sintéticos da lausona.....	11
4.3	Ensaio de citotoxicidade por sulforodamina B SRB.....	13
4.4	Ensaio clonogênico	14
4.5	Ensaio de migração celular	15
4.6	Análise estatística.....	15
5.	RESULTADOS.....	16
5.1	Derivados de lausona reduzem o crescimento celular de linhagens de células tumorais	16
5.2	Derivado de lausona FMO-1 reduz a formação de colônias após o tratamento.....	19
5.3	Derivado de lausona FMO-1 inibe a migração celular após o tratamento	20
6.	DISCUSSÃO	22
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada por um crescimento desordenado de células capazes de invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância. Quando se dividem rapidamente as células cancerosas tendem a ser muito agressivas e incontroláveis (INCA, 2022).

Um em cada cinco indivíduos desenvolverá câncer durante sua vida. Mundialmente, o câncer de pulmão é o segundo mais incidente em ambos os sexos, com 2,2 milhões (11,4%) de casos novos (FERLAY et al., 2020; SUNG et al., 2021). No Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 é de aproximadamente 704 mil casos novos de câncer, com 32.560 (4,6%) estimados para o câncer de pulmão. Os números de óbitos em 2020 foram 28.620 mortes por câncer de pulmão no Brasil, tendo a maior mortalidade em homens com 16.009 óbitos e 12.609 em mulheres (INCA, 2022).

O câncer de pulmão é um dos tumores malignos mais incidentes e letais no mundo, e na maioria dos casos possui um prognóstico desfavorável, o que torna essa doença um problema grave de saúde pública (SIEGEL et al., 2014). O tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer e a alta frequência de mutações em células do pulmão ocorre devido à contínua exposição a carcinógenos presentes no tabaco (SEMENOVA et al., 2015). O diagnóstico para essa doença no país em 70% dos casos é dado como localmente avançado ou metastático, enquanto apenas 8% são diagnosticados no primeiro estágio (ARAUJO, 2018).

Dentre os modos de tratamento disponíveis para pacientes oncológicos, geralmente, são usadas a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (HOWINGTON, 2013). A administração de quimioterápicos, no entanto, apresentam em pacientes reações adversas como náuseas, vômitos e queda de cabelo, devido a baixa seletividade desse tratamento que destrói também células normais (ETTINGER et al., 2017; SILVA et al., 2022). Tendo em vista os efeitos adversos e a eficiência limitada nesses tratamentos são necessários identificar compostos mais eficazes para o tratamento do câncer sem causar efeitos adversos à saúde dos pacientes.

Diante disso, vem sendo investigado o uso de compostos derivados de produtos naturais para o tratamento de diversas doenças como o câncer, onde suas propriedades terapêuticas podem originar medicamentos eficazes (MANZANO et al., 2020). Nesse contexto, dados da literatura mostram que os metabólitos secundários de plantas, como as naftoquinonas, apresentam atividades antitumorais (WANG, TAO, LI, 2017), antimicrobiana (SEVERINO, 2016), entre outras atividades biológicas (VIEIRA et al., 2020; LÓPEZ et al., 2014).

A lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) é uma naftoquinona de grande interesse para o desenvolvimento de fármacos antitumorais mais eficazes. Através de alterações em sua estrutura química, a lausona pode ter atividade antitumoral potencializada (EFFERTH et al., 2019). Diversas moléculas derivadas de produtos naturais com modificações em sua estrutura foram aprovadas para comercialização para utilização no tratamento do câncer, em levantamentos realizados no período de 1981 a 2019 (NEWMAN, CRAGG, 2020). Ottoni e colaboradores (2020) mostram que alterações na estrutura química de moléculas podem conferir aumento na citotoxicidade de células tumorais.

Na literatura, os derivados sintéticos da lausona apresentam alto potencial citotóxico em linhagens de células tumorais distintas (DE FRANCA et al., 2021; OTTONI et al., 2020). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar o potencial citotóxico de três derivados sintéticos de lausona FMO-1, APSO-5 e APSO-19 em células de carcinoma de pulmão e glioma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica dos derivados da lausona FMO-1, APSO-5 e APSO-19 na linhagem tumoral de carcinoma de pulmão (A549) e glioma (C6).

2.2 Objetivos específicos

- i. Determinar a IC₅₀ dos derivados sintéticos da lausona FMO-1, APSO-5 e APSO-19 em células de carcinoma de pulmão e glioma;
- ii. Avaliar a capacidade de redução de formação de colônias por células de carcinoma de pulmão tratadas com o FMO-1;
- iii. Avaliar o efeito do tratamento com o FMO-1 na inibição da migração de células de carcinoma de pulmão.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais do câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que é caracterizada pelo crescimento desordenado de células mutadas com capacidade de invadir tecidos e órgãos (INCA, 2022). As células cancerosas apresentam características que beneficiam o crescimento maligno como a capacidade de manter a sinalização de proliferação, escapar dos genes supressores de crescimento, resistir à morte celular, permitir a imortalidade replicativa, induzir a formação de vasos sanguíneos, invasão e metástase, reprogramar o metabolismo celular e escapar da destruição pelo sistema imune (HANAHAN, 2022).

Alguns fatores tornam riscos para o câncer, como o uso de álcool, alimentação inadequada, inatividade física e exposição a agentes carcinogênicos físicos, agentes químicos (amianto, benzeno, dioxinas, resíduos de agrotóxico em alimentos e água e o arsênio), como também os agentes biológicos (INCA, 2021).

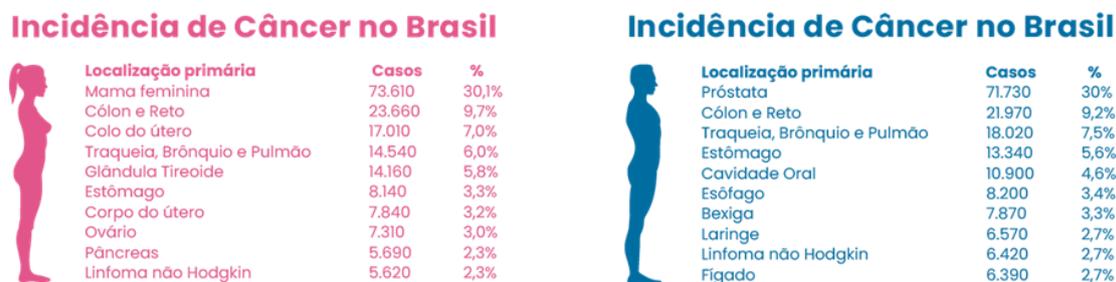
As células tumorais migram para os vasos sanguíneos e/ou vasos linfáticos para realizar a metástase (HANAHAN et al., 2000). Essas células podem migrar pela corrente sanguínea como células únicas ou até mesmo em colônias (TABASSUM et al., 2015). No sangue, associam-se às plaquetas a fim de se proteger do sistema imune (LABELLE et al., 2011). Para invadir outro

tecido as células tumorais possuem mecanismos de degradação da matriz extracelular, a fim de se estabelecerem no local e, por fim, finalizam o processo metastático (KESSENBROCK et al., 2010).

Por ser a segunda principal causa de morte no mundo, o câncer é considerado um grande problema de saúde pública (SIEGEL et al., 2019). As estatísticas globais indicam que o câncer de pulmão é o segundo mais frequente no mundo, com 2,2 milhões de novos casos e 1,8 milhão de mortes em 2020. Essa doença é a mais frequente em homens, com 1,4 milhão dos casos novos e o terceiro em mulheres, com 771 mil casos novos no mundo (FERLAY et al., 2020; SUNG et al., 2021).

No Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 é de 704 mil casos novos de câncer, sendo 32 mil casos de câncer de pulmão, o segundo tipo de câncer de maior incidência em homens e o quarto em mulheres (Figura 1) (INCA, 2022).

Figura 1 – Estimativas de novos casos de câncer, em mulheres e homens, para 2023-2025.



Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2022

3.2 O câncer de pulmão

O câncer de pulmão está entre os cânceres com alta mortalidade para homens e mulheres (SIEGEL, 2014). Os tumores dessa doença são derivados do epitélio respiratório, incluindo os brônquios, bronquíolos e alvéolos (ROSKOSKI, 2017). As células desse tipo de câncer possuem duas classificações histológicas: câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de pulmão de células pequenas, sendo 85% dos casos de câncer de células não

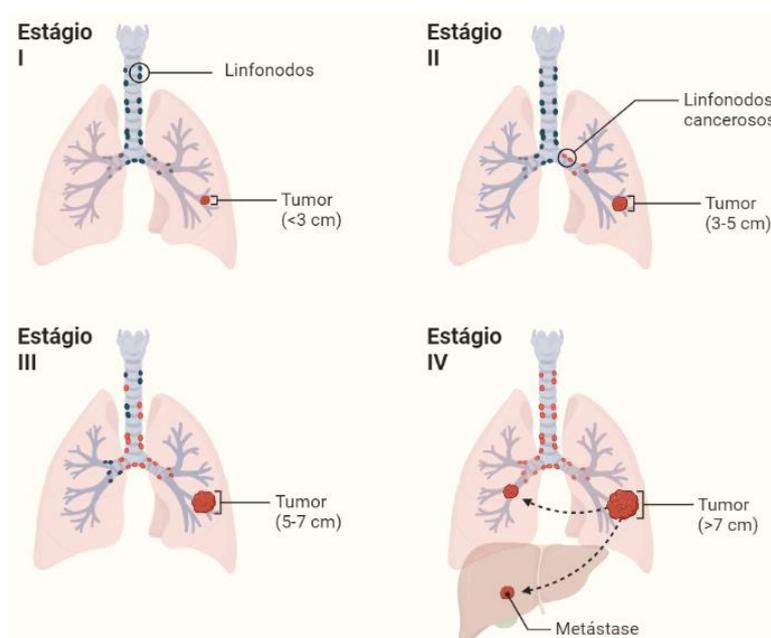
pequenas (HAGHGOO et al., 2015). O câncer de pulmão de células não pequenas apresenta um prognóstico ruim e está fortemente correlacionado com o tabagismo (KENFIELD, 2008). Por possuir tendência a ser metastático, essa doença dificulta o tratamento dos pacientes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

O tabagismo é a causa de 80% dos casos de morte pelo câncer de pulmão e a convivência com pessoas fumantes pode aumentar cerca de 20 a 30% a probabilidade de um não fumante desenvolver esse tipo de câncer (ZAPPA, 2016).

A mortalidade por câncer de pulmão também está relacionada ao diagnóstico em estágio avançado (Figura 2). A sobrevivência dos pacientes 5 anos após o diagnóstico no estágio avançado é de apenas 10% a 20%. Condições socioeconômicas da população, disponibilidade e qualidade dos serviços de saúde contribuem para a gravidade dessa doença (LIMA, 2022).

O estágio avançado do câncer de pulmão frequentemente apresenta sua forma metastática (Figura 3) (POPPER, 2016). Os carcinomas pulmonares tendem a invadir órgãos como os ossos, o cérebro, as glândulas adrenais, o fígado e os linfonodos extratorácicos (TAMURA et al., 2015).

Figura 2 – Estágios do câncer de pulmão metastático.



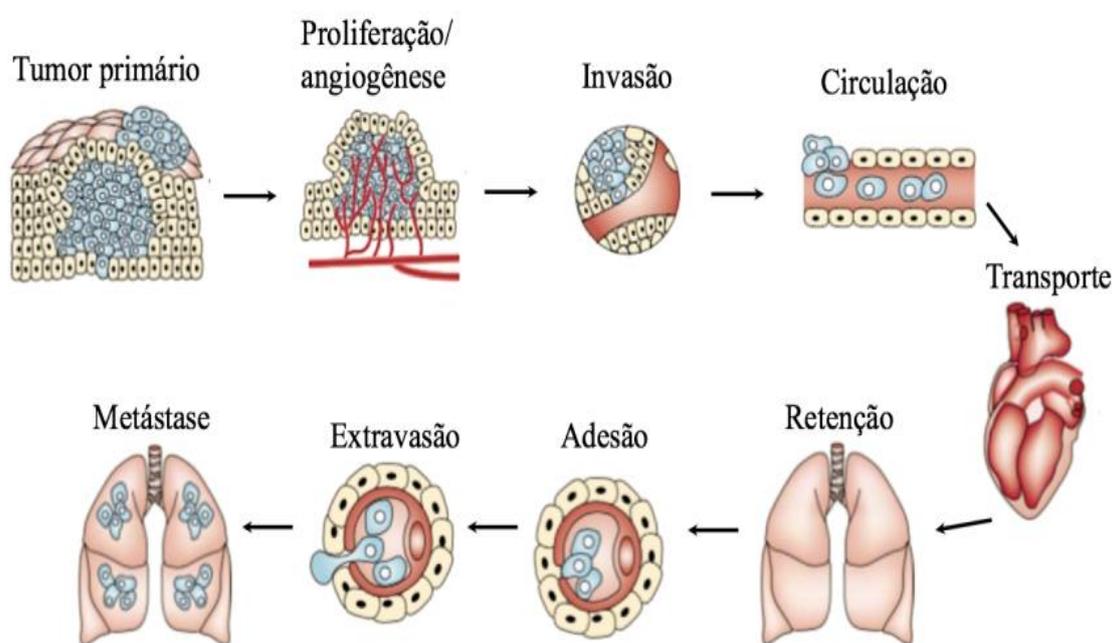
Fonte: Adaptado de BioRender

3.3 Metástase do câncer

As células tumorais são capazes de formar uma colônia de cinquenta ou mais células (RAFEHI, 2011). Elas apresentam pouca aderência às outras células como também à matriz extracelular. Diante da perda de adesão, as células tumorais conseguem se desprender da massa tumoral e realizar metástase (KARP, 2005).

O processo da metástase consiste em uma série de etapas. A princípio as células tumorais conseguem se desprender do tumor primário, entram na circulação sanguínea e/ou linfática, escapam do sistema imune, extravasam capilares para uma região ou órgão onde irão se aderir para invadir as células endoteliais e da membrana basal, e conseqüentemente o crescimento de um tumor secundário (Figura 3) (SEYFRIED et al., 2013; FIDLER, 2003; MEHLEN, 2006).

Figura 3 – Formação da metástase.



Fonte: Adaptado de Fidler, 2003

A sobrevivência das células tumorais na corrente sanguínea e a geração de metástase são decorrentes de mecanismos de escape do sistema imune (VINAY et al., 2015). As células conseguem sair do tumor primário, migram para outras regiões do corpo e formam colônias (HANAHAN et al., 2000).

O câncer de pulmão é altamente metastático e as células comumente migram para o cérebro, fígado, medula óssea e glândulas suprarrenais (HEIDEMANN et al., 2014). A alta expressão do gene ACTA2, responsável pela produção de α -actina de músculo liso, contribui para manutenção da forma e movimento da célula, o que pode estar relacionado com a migração celular no câncer de pulmão, tornando a célula tumoral capaz de alterar a sua forma e desvincular do tumor, invadindo outros tecidos (POPPER, 2016; LEE et al., 2013).

3.4 Tratamentos do câncer

A cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia, a imunoterapia e a terapia hormonal são as principais formas de tratamento para o câncer e são determinadas pelo estágio da doença (NCI, 2022).

A cirurgia é realizada através da remoção do tumor que está progredindo no paciente oncológico, sendo um método eficaz para tumores que não tenham realizado metástase. Esse tratamento pode ser empregado sozinho, ou em conjunto com a radioterapia e a quimioterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A radioterapia é realizada através da radiação que destrói ou danifica as células tumorais, interrompendo o crescimento e avanço do câncer. Além das células tumorais, as células normais também são afetadas durante o tratamento e por isso são observados os efeitos adversos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A quimioterapia consiste no uso de quimioterápicos que atuam de forma sistêmica e conseguem inibir o crescimento e a multiplicação das células tumorais. A administração do quimioterápico pode ser feita por via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal ou tópica. Por atuarem de forma não específica, os quimioterápicos também apresentam efeitos adversos como transtornos hormonais, queda de cabelo, náusea e vômitos. Esses efeitos adversos são causados pela inespecificidade dos antineoplásicos que danificam as células normais (INCA, 2023; FERREIRA et al., 2017). Apesar da ampla

utilização dos quimioterápicos existentes, eles não são eficientes contra alguns tipos de tumores, principalmente os tumores sólidos (AHMED et al., 2015; ZHONG et al., 2018). Além disso, alguns tumores podem desenvolver resistência ao tratamento com os quimioterápicos utilizados (DE MELO et al., 2011; MARIN et al., 2009).

Alguns pacientes são submetidos à terapia adjuvante para a redução do risco de recidiva do câncer, podendo incluir a radiação, quimioterapia e terapia direcionada. (NON-SMALL CELL LUNG CANCER COLLABORATIVE GROUP, 1995).

A base do tratamento do câncer de pulmão é a remoção cirúrgica, apesar da cirurgia, as taxas de recorrência de NSCLC são altas, necessitando o tratamento adjuvante (quimioterapia e radioterapia) (ROSKOSKI, 2017). Pacientes com câncer de pulmão NSCLC em estágio avançado, geralmente recebem quimioterapia após a cirurgia para eliminar quaisquer células cancerígenas remanescentes (NON-SMALL CELL LUNG CANCER COLLABORATIVE GROUP, 1995).

Diante disso, é imprescindível a busca por terapias que visem o bem estar do paciente com quimioterápicos mais seletivos e que apresentem menos efeitos adversos (EGGERMONT et al., 2012).

3.5 Produtos naturais

Os produtos naturais vêm recebendo uma maior atenção e tem sido objeto de estudos rigorosos frente a tratamentos do câncer (ABD-RABOU et al., 2012). Devido à sua grande diversidade vegetal a flora brasileira tem sido interesse de pesquisa em propriedades medicinais das plantas, e hoje passa a chamar atenção da medicina por fornecer subsídios para a descoberta de muitas substâncias naturais terapêuticas (CORRÊA et al., 2014).

Estima-se que cerca de 65% dos fármacos aprovados com atividade antitumoral são produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN; CRAGG, 2020). Diversas classes de compostos presentes em plantas como quinonas, terpenos e alcaloides são as fontes de quimioterápicos que já são utilizados no tratamento do câncer. (DEMAIN et al., 2011; VERMA, 2006).

As quinonas são uma classe de compostos naturais produzidos por plantas, caracterizadas pela presença de anéis quinonóidicos e subdividida em benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas (SOUSA et al., 2016). Alguns dos atuais fármacos utilizados no tratamento do câncer são derivados pertencentes a essa classe de compostos, por exemplo, a doxorubicina e a mitomicina (VERMA, 2006).

A doxorubicina é um medicamento originalmente extraída da *Streptomyces peucetius var. caesius* (PARK et al., 2005). Atualmente, ela é utilizada no tratamento de pacientes com câncer de mama, esôfago, fígado e linfomas (GEWIRTZ, 1999). Os mecanismos através dos quais a doxorubicina leva as células cancerosas a morte inclui danos ao DNA, efeitos diretos na membrana celular, formação de radicais livres e peroxidação lipídica, entre outros (GEWIRTZ, 1999; MIZUTANI et al., 2005). As células saudáveis também sofrem efeitos dos mecanismos apresentados pela doxorubicina, causando efeitos agudos e crônicos como a cardiotoxicidade, sendo associada ao aumento do risco de insuficiência cardíaca (VON HOFF et al., 1979; VOLKOVA et al., 2011).

O derivado naftoquinonico extraído da planta *Avicennia marina* exibe atividade citotóxica contra linhagens KB, HeLa, HepG2 e MDA-MB-231 (KONGKATHIP et al., 2003; LIN et al., 2010). Os produtos naturais são considerados um rico reservatório de compostos bioativos com potencial terapêutico (HUANG; LU; DING; 2021) e desde a década de 80 vem sendo aprovados para comercialização para o tratamento do câncer medicamentos derivados de produtos naturais (AMARAL et al., 2019). Diante disso, moléculas que facilmente podem ser encontradas na natureza apresentam um caráter promissor, podendo ser sintetizadas para o uso terapêutico, inclusive no câncer.

3.6 Lausona e derivados

A lausona é um composto extraído da espécie *Lawsonia inermis* (Figura 4) que pertence à família Lythraceae. Essa espécie é um arbusto glabro muito ramificado com porte de 2 a 6 metros que tem sido usada na medicina tradicional. A planta é popularmente conhecida como henna, um agente

cosmético mundialmente conhecido e usado para tingir cabelos, pele e unhas (Figura 4). (KAMAL, 2010).

Além disso, a *Lawsonia inermis* apresenta importante atividade farmacológica como antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral e hepatoprotetora, mostrando-se fonte de produto natural para o desenvolvimento de medicamentos contra várias doenças (CHAUDHARY et al. 2010).

Figura 4 – Flores de *Lawsonia inermis*.



Fonte: disponível em: < <https://indiabiodiversity.org/species/show/32693> > Acesso em 20 de maio de 2023.

A lausona é uma naftoquinona precursora para a síntese de diversos compostos anticancerígenos como o atovaquone e o lapachol (SINGH et al., 2014). Esse composto possui efeito citotóxico, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), reações de alquilação de DNA e proteínas (RAHMOUN et al., 2013).

Diversos trabalhos mostram que a lausona apresenta um efeito citotóxico em diferentes linhagens tumorais, por exemplo, em células humanas tumorais do cólon (DLD-1) (WANG et al., 2017) e em células de câncer de ovário (SKOV-3) (LI et al., 2017). Resultados com o extrato de *Lawsonia inermis* mostram uma alta citotoxicidade em células de carcinoma de pulmão humano

(A549), câncer de colorretal (DLD1) e carcinoma hepatocelular (HepG2) (ISHTEYAQUE, 2020).

A lausona é uma fonte para a síntese de novos compostos através da alteração da sua estrutura química. Esses novos compostos abrem oportunidades para o desenvolvimento de fármacos antitumorais mais eficazes quando comparado ao composto original (OTTONI et al., 2020). Derivados sintéticos de lausona apresentam maiores efeitos citotóxicos nas linhagens câncer de mama: SKBR-3, MDA-MB-231 e MCF-7 em comparação à lausona (OTTONI et al., 2020).

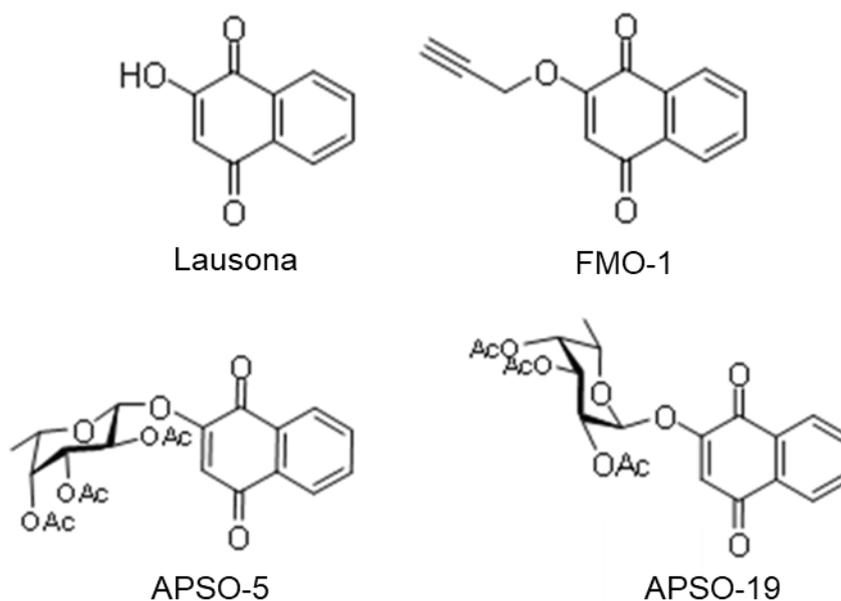
De Franca e colaboradores (2021), mostraram que derivados glicosídicos de lausona apresentaram maior atividade citotóxica nas linhagens de câncer de pulmão (A549), melanoma (B16F10) e glioma (C6) quando comparados a lausona. Diante do efeito antitumoral dos derivados de lausona em diferentes linhagens tumorais, esse trabalho se propõe a investigar o efeito citotóxico de derivados de lausona nas linhagens A549 e C6.

4. METODOLOGIA

4.1 Derivados sintéticos da lausona

Os derivados sintéticos da lausona FMO-1, APSO-5 e APSO-19, foram obtidos do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, através de uma parceria com o Prof. Dr. Ricardo José Alves (Figura 5 e tabela 1). Soluções estoque na concentração de 100 000 μM de cada compostos foram feitas em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada a -4°C . Essas soluções foram utilizadas para preparar uma solução de trabalho a 25 μM de cada composto, e utilizada para realização dos experimentos seguintes em diferentes concentrações.

Figura 5 – Estrutura química dos derivados de lausona.



Fonte: DE FRANCA et al., 2021

Tabela 1 – Nomenclatura segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) da lausona e seus derivados

	Nomenclatura IUPAC
Lausona	2-hidroxi-1,4-naftoquinona
FMO-1	2-(Prop-2-in-1-iloxi) naftaleno-1, 4-diona
APSO-5	2-(2,3,4-tri-O-acetyl-6-deoxy- α -L-galactopyranosyloxy)-1,4-naftoquinone
APSO-19	2-(2,3,4-tri-O-acetyl-6-deoxy- β -L-galactopyranosyloxy)-1,4-naftoquinone

Fonte: Autoria própria

4.2 Linhagens e cultivo de células tumorais

A citotoxicidade dos derivados sintéticos de lausona foi avaliada em células de carcinoma de pulmão (A549) e glioma (C6) que foram obtidas do Laboratório de Biologia e Imunologia de Câncer e Leishmania do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). As células foram mantidas em garrafas de cultivo em meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium

(DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal de Bovino (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL) e incubadas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao obter confluência de 80%, as células foram dissociadas da garrafa por meio do uso da solução Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25%; EDTA 0,53 Mm). Em seguida, a solução de Tripsina-EDTA foi inativada por adição de meio DMEM suplementado (1:3). O meio contendo as células foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a 259 xg por 10 min à 4°C. O pellet de células foi ressuspenso em meio DMEM completo e ajustada a concentração de células para cultivo e experimentos posteriores.

Tabela 2 – Linhagens de células utilizadas nos experimentos.

Linhagem	Descrição	Espécie
A549	Carcinoma de pulmão	<i>Homo sapiens</i>
C6	Glioma	<i>Rattus norvegicus</i>

Fonte: Autoria própria

4.3 Ensaio de citotoxicidade por sulforrodamina B (SRB)

As linhagens de carcinoma de pulmão (A549) e glioma (C6) foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio DMEM suplementado, com número de células igual a 1x10⁴ células/poço. As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C por 24h, para aderência a garrafa. Após esse tempo, as células foram tratadas nas concentrações de 25 a 0,7 µM com os derivados de lausona (FMO-1, APSO-5 e APSO-19) por 72h. Dimetilsulfóxido 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 10 µM foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Ao completar o tempo, o meio contendo os tratamentos, controles negativo e positivo de morte foram descartados e as células fixadas com ácido tricloroacético (30%) por 1h à 4°C. A placa foi lavada por 4 vezes com água destilada e deixado para secar. Sulforrodamina B (SRB) 0,057% (p/v) dissolvida em ácido acético (1%) foi adicionado aos poços por 30 min em temperatura ambiente (TA). A placa foi lavada por 4 vezes com ácido acético (1%) para remoção do excesso de corante e seca. TRIS base (10 mM; pH 10,5) foi usado para dissolução do SRB por 30 min e então a placa foi lida em leitor de microplaca (Synergy H1, Biotek, VT,

EUA) por espectrofotometria com comprimento de onda de 510 nm. O software GraphPad Prism Versão 8.0 foi utilizado para determinação da IC₅₀.

O grau de inibição foi calculado a partir da média das absorbâncias observadas utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{Grau de Inibição} = 100 - [(Células tratadas / Células não tratadas) \times 100]$$

Com base no grau de inibição de cada derivado, foi calculada a IC₅₀ dos compostos. A IC₅₀ é a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (ANDRADE et al., 2015). O composto FMO-1 foi selecionado para a avaliação nos demais ensaios, devido o valor da IC₅₀ ter sido o menor de todos os compostos. Para os posteriores experimentos, foram utilizados valores de IC₅₀ como base para definir as concentrações, sendo meia vez a IC₅₀, o valor da IC₅₀ e duas vezes a IC₅₀ (1,1; 2,2 e 4,4 μM).

4.4 Ensaio clonogênico

A linhagem A549 foi escolhida de acordo com a alta incidência e mortalidade desse câncer. As células foram semeadas em placa de 6 poços (300 células/poço) em meio DMEM contendo 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10.000 mg/mL). A placa foi incubada em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 24h, para aderência celular. Após esse tempo, as células foram expostas às concentrações de 1,1 μM, 2,2 μM e 4,4 μM do composto FMO-1, por 72h em estufa, sob mesmas condições. DMSO 0,1% e Doxorrubicina 0,2 μM foram usados como controle negativo e controle positivo, respectivamente. Após o tempo de tratamento, os meios foram desprezados e o meio DMEM completo foi adicionado aos poços e as células incubadas em estufa com atmosfera de 5%, CO₂ a 37°C por 7 dias. Esse ensaio consiste em avaliar a viabilidade proliferativa e a capacidade de formação de colônias por uma única célula após um período de incubação (FRANKEN et al., 2006). Após 10 dias de experimento, as células foram fixadas com metanol + ácido acético (3:1) por 5 min e coradas com cristal violeta 0,5% em água destilada, por 30min. Após a coloração, os poços contendo células foram lavados

com água. Ao final do experimento, foi observado o número de colônias das células, com auxílio do software Image J.

4.5 Ensaio de migração celular

As células A549 foram semeadas em densidade 4×10^5 células/poço em placa de 12 poços e após 24h um risco foi feito na porção central de cada poço com o auxílio de uma micropipeta amarela, removendo as células desta região. Os poços foram lavados com PBS para remover as células soltas. Em seguida, as células foram expostas a concentrações crescentes do composto FMO-1 nas concentrações de 1,1 μM , 2,2 μM e 4,4 μM . DMSO 0,1% e Doxorrubicina 0,2 μM foram usados como controle negativo e controle positivo, respectivamente. Durante o período de incubação, a área dos riscos foi analisada com auxílio de microscópio óptico invertido (Nikon, T5100) em aumento de 40X, a fim de observar o fechamento destes. Fotografias dos riscos foram tiradas em 0 h, 24 h e 48 h de tratamento. A área de fechamento foi medida com auxílio do software Image J e a porcentagem de fechamento foi calculada, comparando os tempos 24 e 48 h com o tempo zero, utilizando a fórmula previamente descrita (YARROW et al., 2004). As células *in vitro* sobre a borda de uma ferida terão a capacidade de migração, essas células irão se mover na direção da outra borda até que se encontrem (LIANG et al., 2007).

4.6 Análise estatística

Todos os resultados foram avaliados a partir da execução de três experimentos independentes. Para determinar a IC_{50} os experimentos apresentaram intervalo de confiança de 95%. Para todos os experimentos de citotoxicidade, valores $p < 0,05$ que foram considerados significativos estatisticamente. Análises e gráficos, assim como a IC_{50} foram obtidos a partir do programa GraphPad Prism 8. Os dados foram submetidos a análises estatísticas, tais como, One-way e Two-way ANOVA, pós-teste de Dunnet e pós-teste de Tukey.

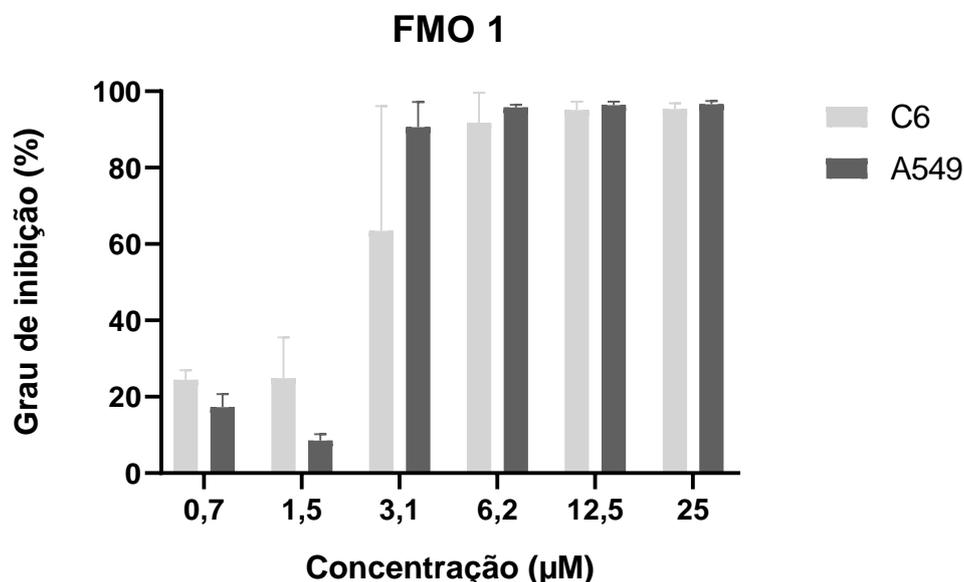
5. RESULTADOS

5.1 Derivados de lausona reduzem o crescimento celular de linhagens de células tumorais

Os três derivados de lausona FMO-1, APSO-5 e APSO-19 foram utilizados para avaliar o potencial de inibir o crescimento das células A549 e C6, após 72 h de tratamento, por meio do ensaio de SRB. Segundo Mahmoud e colaboradores (2011), a atividade citotóxica é considerada em: alto grau de inibição acima de 75%, médio grau entre 75% e 50% e baixo grau abaixo de 50%.

O FMO-1 apresentou um alto grau de inibição nas concentrações de 25 a 3,1 μM na linhagem A549 e 25 a 6,2 μM em C6 (Figura 6) (PROPHETA-SANTOS et al., 2022).

Figura 6 – Porcentagem do grau de inibição do FMO-1.

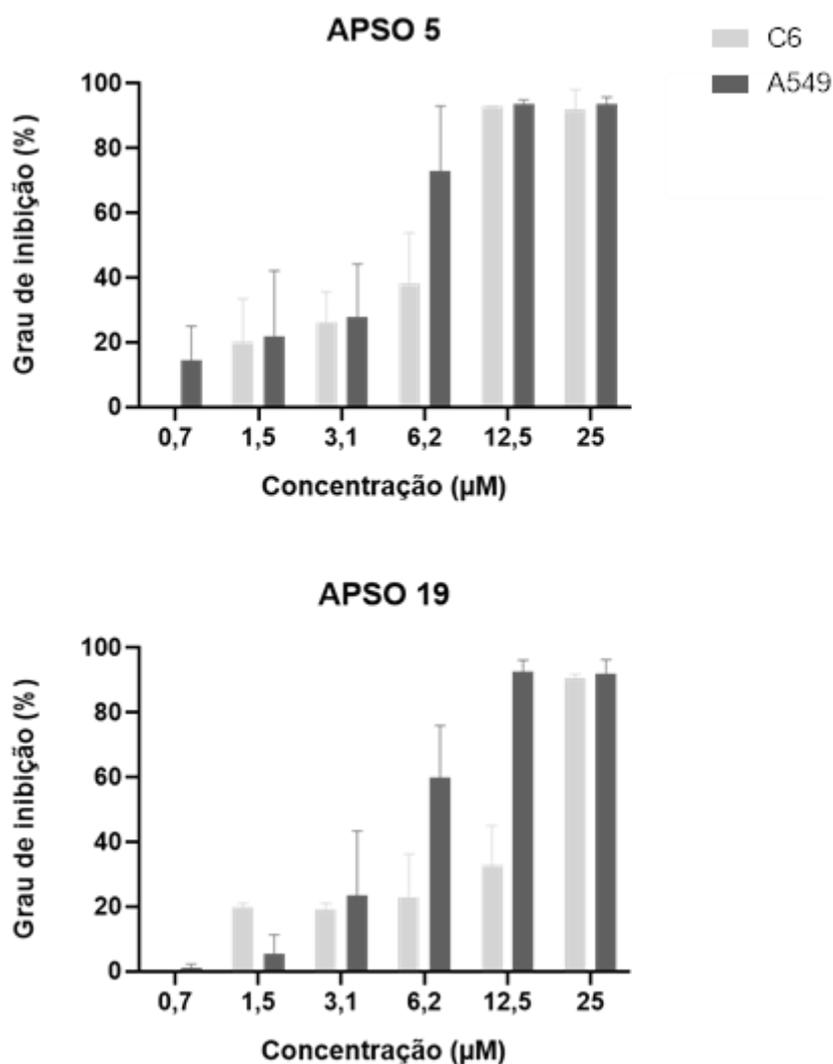


Fonte: PROPHETA-SANTOS et al., 2022.

Resultados obtidos após tratamento por 72h com o derivado de lausona FMO-1 nas linhagens de A549 e C6. O gráfico representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Nas células de carcinoma de pulmão A549, a APSO-5 nas concentrações de 25 a 6,2 μM apresenta alto grau de inibição na linhagem, enquanto a APSO-19 apresenta alto grau de inibição nas concentrações de 25 e 12,5 μM . Em células de glioma C6, a APSO-5 foi capaz de inibir o crescimento celular nas concentrações de 25 e 12,5 μM e a APSO-19 só apresentou uma alta inibição de crescimento na maior concentração de 25 μM (Figura 7).

Figura 7 – Porcentagem do grau de inibição da APSO-5 e APSO-19.



Fonte: Autoria própria.

Resultados obtidos após tratamento por 72h com os derivados de lausona APSO-5 e APSO-19 nas linhagens de A549 e C6. O gráfico representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Os resultados do grau de inibição foram utilizados para calcular a concentração máxima inibitória de 50% do crescimento celular (IC_{50}) apresentados nas tabelas 3 e 4. O FMO-1 apresentou valores de IC_{50} de 2,2 μM em ambas as linhagens testadas. A molécula de origem, lausona, apresenta IC_{50} acima de 20 μM . Os derivados mostram um efeito mais citotóxico nas células tumorais A549 e C6 quando comparados a lausona (Tabela 3).

Os valores da IC_{50} evidenciados na tabela 4 mostram que o composto APSO-5 apresenta 4 μM para A549 e 5,1 μM para C6. A APSO-19 apresenta valores de IC_{50} de 5,1 μM na linhagem A549 e 12,7 μM em C6. A doxorrubicina (dox), composto utilizado como controle positivo, apresentou IC_{50} de 1,4 μM em células de A549 e 1,3 μM em C6.

Considerando os resultados com FMO-1 e a alta taxa de incidência e letalidade do câncer de pulmão, esse composto foi selecionado para prosseguir nos demais experimentos nessa linhagem, sendo utilizado as concentrações de metade da IC_{50} , o valor da IC_{50} e o dobro da IC_{50} em A549 (PROPHETA-SANTOS et al., 2022).

Tabela 3 – Resultados da IC_{50} da lausona e seu derivado FMO-1.

Compostos	IC_{50} (μM)	
	A549	C6
FMO-1	2,2 (1,6 - 2,9)	2,2 (1,6 - 2,8)
Lausona	53 (32,2 - 123,7)	22,6 (10,2 – 41,0)

Fonte: PROPHETA-SANTOS et al., 2022

Dados na tabela mostram a concentração máxima inibitória de 50% do crescimento celular (IC_{50}) e o intervalo de confiança em 95% de três experimentos independentes após o tratamento com a lausona e seu derivado por 72 h.

Tabela 4 – Resultados da IC_{50} da Doxorrubicina (Dox) e os derivados da lausona APSO-5 e APSO-19.

Compostos	IC_{50} (μM)	
	A549	C6

APSO-5	4 (3,0 – 5,2)	5,1 (2,7 – 8,9)
APSO-19	5,1 (4,4 – 6,0)	12,7 (7,7 – 22,3)
Dox	1,4 (0,9 – 2,0)	1,3 (0,2 – 3,0)

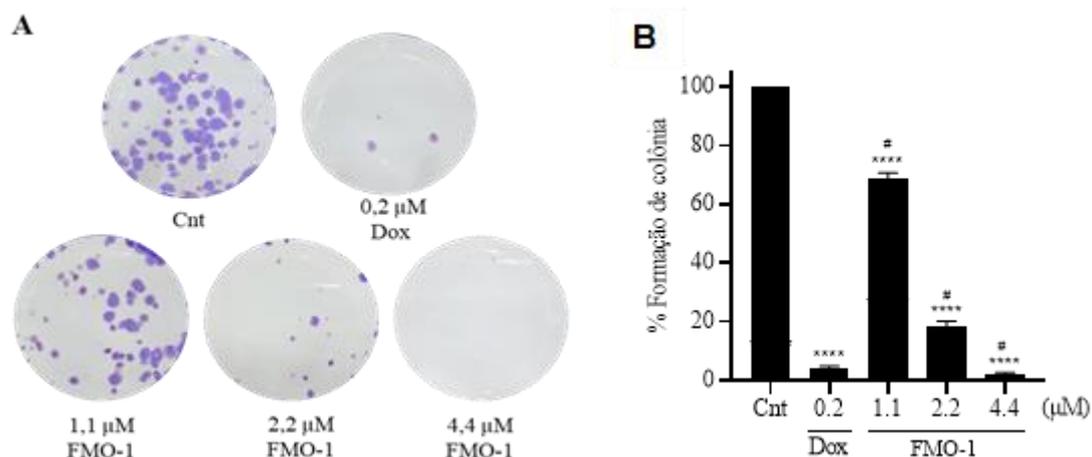
Fonte: Autoria própria.

Dados na tabela mostram a concentração máxima inibitória de 50% do crescimento celular (IC50) e o intervalo de confiança em 95% de três experimentos independentes após o tratamento com a doxorubicina (dox) e derivados da lausona por 72 h.

5.2 Derivado de lausona FMO-1 reduz a formação de colônias de células A549

A partir do ensaio clonogênico foi possível avaliar a capacidade dos tratamentos com FMO-1 de inibir significativamente a formação de colônias. A menor concentração de FMO-1 (1,1 μM) foi capaz de inibir 31,1% do número de colônias, enquanto na concentração de 2,2 μM a inibição foi de 82,1%. A maior concentração desse composto (4,4 μM) foi capaz de inibir 98,1% de número de colônias. Houve diferença significativa entre os tratamentos em comparação ao controle, sendo que a maior concentração de FMO-1 (4,4 μM) os resultados de inibição foram semelhantes ao controle positivo (Dox), que inibiu 96,1% da formação de colônia. Foi observado que os tratamentos têm uma resposta concentração dependente ($p > 0,001$) (Figura 8).

Figura 8 – Efeito do FMO-1 na inibição da formação de colônias de A549



Fonte: PROPHETA-SANTOS et al., 2022

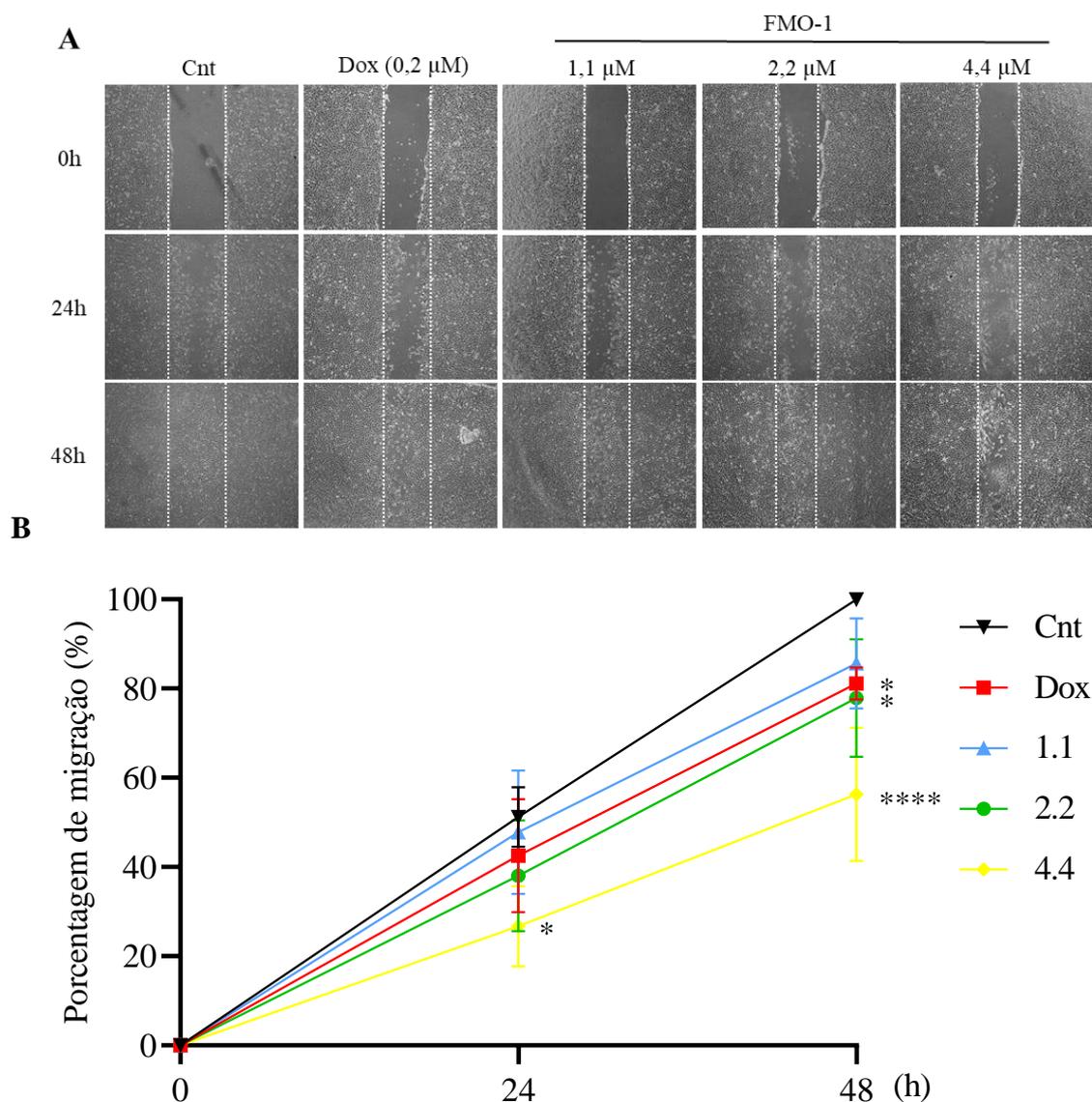
A– Representação do ensaio clonogênico após o tratamento com FMO-1. **B** – Percentual de formação de colônias. Cnt = controle negativo e Dox = doxorrubicina. Os dados foram submetidos a One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett. (****) $p < 0,0001$ tratamentos comparados com o controle negativo e (#) $p < 0,001$ para comparações entre os tratamentos.

5.3 Derivado de lausona FMO-1 inibe a migração celular de células A549

O ensaio de cicatrização de feridas foi utilizado para avaliar a capacidade de migração de células A549, após o tratamento com três concentrações do FMO-1 (1,1 μM , 2,2 μM e 4,4 μM), observados nos tempos 0, 24 e 48 horas após o tratamento. Analisando os dados foi possível observar que após a realização da ferida o composto FMO-1 inibiu a migração das células em todos os tempos observados. O FMO-1 na concentração de 4,4 μM teve um baixo percentual de migração das células A549 com 18% do fechamento da risca no tempo de 24 horas e 56% de fechamento no tempo de 48 horas. Os resultados dessa concentração se aproximam dos resultados obtidos com o controle positivo (dox) a qual a porcentagem de fechamento foi de 78% em 48 horas (Figura 9).

Figura 9 – Efeito do FMO-1 na migração de células de A549.

Fonte: PROPHETA-SANTOS et al., 2022



A– Representação do ensaio de migração após o tratamento com FMO-1 por 0h, 24h e 48h. **B** – Percentual de migração. Os dados mostram média e desvio padrão de três experimentos independentes. Cnt = controle negativo e Dox = doxorubicina. Os dados foram submetidos a Two-Way ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett para a comparação entre os tratamentos (****) $P < 0,001$ e (*) $P < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

A lausona é um corante mais conhecido por henna, além de ser uma naftoquinona que possui um grande potencial antitumoral (RASOULIYAN et al., 2021). Essas naftoquinonas possuem o anel de naftaleno, que contém dois

grupos carbonílicos que podem apresentar isoformas com propriedades distintas, a depender de suas posições (SÁNCHEZ-CALVO et al., 2016). Diante disso, a lausona e seus derivados são uma fonte para a descoberta de novos agentes quimioterápicos (SINGH; LUQMAN, 2014). Nesse trabalho foi avaliada a atividade citotóxica de três derivados de lausona FMO-1, APSO-5 e APSO-19 em linhagens de carcinoma pulmonar (A549) e glioma (C6) através do ensaio por SRB.

Os resultados do ensaio pelo SRB mostram que os três compostos estudados apresentaram um alto efeito citotóxico na linhagem A549, com os valores de IC₅₀ abaixo de 6 µM. Enquanto na linhagem C6 apresenta os mesmos resultados, com a exceção da APSO-19 que apresenta IC₅₀ de 12,7 µM. Entre os três compostos, o FMO-1 foi o que apresentou o maior efeito citotóxico com IC₅₀ de 2,2 µM nas linhagens A549 e C6. Para Kuate e colaboradores (2014) compostos considerados potentes no tratamento do câncer devem apresentar IC₅₀ abaixo de 10 µM após 72h de tratamento.

Mudanças na estrutura química de compostos podem aumentar a citotoxicidade destes em linhagens tumorais, pois pode resultar em novos compostos sintetizados com melhores perfis farmacocinéticos (OTTONI *et al.*, 2020). Derivados glicosídicos de lausona mostraram um alto efeito inibitório na proliferação das linhagens A549, B16-F10 e C6 com IC₅₀ menores que a da lausona (DE FRANCA et al., 2021) como também em linhagens de câncer de mama (SKBR-3, MDA-MB-231 e MCF-7) (OTTONI et al., 2020). De Almeida e colaboradores (2021) ao investigarem uma naftoquinona derivada da lausona descobriram que ela foi capaz de inibir a proliferação de sete linhagens tumorais (MCF-7, SK-MEL19; 28 e 103, HCT-116, MESA/DX5 e B16F10). Nossos resultados mostram que a lausona apresentou uma IC₅₀ 23 vezes maior que o seu derivado FMO-1 na linhagem de A549, o que torna esse composto promissor e que possui um grande potencial antitumoral, dentre os compostos testados, o FMO-1 apresentou maior efeito inibitório de proliferação celular, sendo assim foi selecionado para a avaliação dos demais ensaios de citotoxicidade.

O câncer de pulmão apresenta alta taxa de mortalidade e um dos mais incidente no Brasil e no mundo, além de ser altamente metastático (INCA, 2022).

Devido a problemas para o diagnóstico e o tratamento desse tipo de câncer, há necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos eficazes (KAWAMURA, 2019). O carcinoma de pulmão é o tipo de câncer de pulmão formado por células não pequenas, que são responsáveis por 80% da incidência de casos e essa categoria de câncer é relativamente resistente a quimioterapia (SHIEN, 2012). Diante disso, a linhagem de células A549 foi a linhagem selecionada para a avaliação de citotoxicidade nos demais experimentos.

O ensaio clonogênico padronizado por Franken (2006), consiste em avaliar a viabilidade proliferativa e capacidade da formação de colônias e clones por uma única célula após um período de incubação. O ensaio clonogênico permite avaliar a capacidade das células de formar uma colônia de cinquenta ou mais células (RAFEHI, 2011). Nesse estudo, foi possível observar que todas as concentrações testadas do composto FMO-1 inibiram a formação de colônias na linhagem A549.

Semelhante aos resultados apresentados, De Franca e colaboradores (2021) apresentaram resultados com derivados glicosídicos de lausona capazes de inibir a formação de clones em linhagem tumoral de melanoma B16-F10. Kwiecinski e colaboradores (2012) mostraram efeitos de uma naftoquinona associada a ascorbato que induziu a diminuição da formação de colônias em câncer de bexiga (T24). Em um estudo com o ensaio clonogênico, Ross e colaboradores (2011) revelaram que o tratamento com derivados de naftoquinonas limita a capacidade das células de câncer de próstata (PC-3) em formar colônias.

O carcinoma pulmonar é um câncer que apresenta grande poder metastático (HUNG et al., 2014), sendo a metástase o principal responsável pela morte em pacientes com câncer. Assim, ainda é necessária uma busca por drogas antitumorais eficazes, que evitem o processo metastático (BALASSIANO, 2005). Nossos dados mostram que o composto FMO-1 possui uma alta capacidade de inibir a migração de células A549, podendo então ser um composto com potencial de inibir a proliferação e o processo metastático desse tipo de câncer.

Resultados da literatura mostram que derivados de lausona possuem capacidade antiproliferativa e capacidade de inibir a migração celular. Almeida e colaboradores (2017) relataram que houve fechamento da ferida em 40% no tempo de 48 horas após o tratamento com derivado sintético de lausona em células de câncer de mama MCF-7, quando comparado com as células não tratadas. De Franca e colaboradores (2021) mostraram que derivado de lausona foi capaz de inibir 80% da migração de células de melanoma (B16-F10) após 24 horas de tratamento. Jang e colaboradores (2014), mostram a capacidade de uma naftoquinona em inibir cerca de 70% da migração de células de câncer de mama de linhagens distintas (MCF-7 e MDA-MB-231). Corroborando esses resultados o FMO-1 foi capaz de inibir 56% da migração celular no tempo de 48 horas nas células A549.

Os resultados deste estudo demonstram que os derivados da lausona FMO-1, APSO-5 e APSO-19 possuem alto efeito citotóxico na linhagem A549, com IC₅₀ abaixo de 6 µM. Entre os três compostos, o FMO-1 foi o que apresentou uma menor IC₅₀, como também um alto efeito na inibição da migração celular e na inibição na formação de clones das células A549.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados mostram a importância da atividade citotóxica dos derivados de lausona em linhagens de células tumorais. Pode-se dizer que o composto FMO-1 foi o que apresentou melhor atividade inibitória frente as linhagens testadas. A partir dos resultados, pode se inferir que o composto é capaz de inibir a migração celular e a formação de colônias na linhagem tumoral de pulmão A549. Sendo assim, o composto apresenta capacidade em diminuir a proliferação celular, apresentando citotoxicidade em células tumorais de pulmão, sendo um composto com grande potencial no tratamento do câncer.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-RABOU, Ahmed A.; ZOHEIR, Khairy MA; AHMED, Hanaa H. Potential impact of curcumin and taurine on human hepatoma cells using Huh-7 cell line. **Clinical biochemistry**, v. 45, n. 16-17, p. 1519-1521, 2012.

AHMAD, Aamir et al. New ferrocene modified lawsone Mannich bases with anti-proliferative activity against tumor cells. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 21, n. 1, p. 105-110, 2017.

AHMED, H. H. et al. Phytochemical analysis and anti-cancer investigation of *Boswellia Serrata* bioactive constituents in vitro. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 16, p. 7179–7188, 2015.

AMARAL, Ricardo Guimarães et al. Natural products as treatment against cancer: A historical and current vision. **Clin. Oncol**, v. 4, n. 5, p. 1562, 2019.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treatment Types**. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>. Acesso em: 20 abr. 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is non-small cell lung cancer?** Atlanta, Georgia, 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/nonsmall-cell-lung-cancer/about/whatis-non-small-cell-lung-cancer.html>. Acesso em 10 de abril de 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts and Figures 2023**. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/2023-cancer-facts-figures.html>. Acesso em: 20 abr. 2023.

ANDRADE, L. N. et al. Evaluation of the cytotoxicity of structurally correlated pmenthane derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13264–13280, 2015.

ARAUJO, Luiz Henrique et al. **Câncer de Pulmão no Brasil**. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 44, p. 55-64, 2018.

BALASSIANO, Ilana Teruszkin et al. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncology reports**, v. 13, n. 2, p. 329-333, 2005.

BARANI, M. et al. Lawsone-loaded Niosome and its antitumor activity in MCF-7 breast Cancer cell line: a Nano-herbal treatment for Cancer. DARU, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 11–17, 2018.

BARBOSA, Isabelle R. et al. Cancer mortality in Brazil: temporal trends and predictions for the year 2030. **Medicine**, v. 94, n. 16, 2015.

CARIOLI, G.; BERTUCCIO, P.; MALVEZZI, M.; RODRIGUEZ, T.; LEVI, F.; BOFFETTA, P.; LAVECCHIA, C; NEGRI, E. Cancer mortality predictions for 2019 in Latin America. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], 147, p. 619-632, 2019.

CHAUDHARY, Gagandeep; GOYAL, Sandeep; POONIA, Priyanka. *Lawsonia inermis* Linnaeus: uma revisão fitofarmacológica. **Int J Pharm Sci Drug Res**, v. 2, n. 2, pág. 91-8, 2010.

CHIPOLINE, Ingrid C. et al. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of 1H-1, 2, 3-Triazol-1-ylmethyl-2, 3-dihydronaphtho [1, 2-b] furan-4, 5-diones. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 1027-1033, 2018.

CORRÊA, G. et al., Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 6. 75-81, 2014.

DE ALMEIDA, Patrícia DO et al. Uma nova naftoquinona antitumoral sintética induz apoptose mediada por ROS com ativação das vias de sinalização JNK e p38. **Chemico-Biological Interactions** , v. 343, p. 109444, 2021.

DE FRANCA, Mariana Nobre Farias et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of glycosidic derivatives of lawsone in melanoma cancer cell. **BMC cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2021.

DE MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687–699, 2011.

EFFERTH, Thomas et al. Collateral sensitivity of natural products in drug-resistant cancer cells. **Biotechnology advances**, v. 38, p. 107342, 2020.

EGGERMONT, A.; ROBERT, C. Melanoma in 2011: a new paradigm tumor for drug essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.4050-4063, 2009.

ETTINGER, David S. et al. Non–small cell lung cancer, version 5.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 15, n. 4, p. 504-535, 2017.

FEITELSON, Mark A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. p. S25-S54.

FIDLER, I. J. Timeline: the pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nat. Rev. Cancer.**, 3 (6): 453, 2003.

GEWIRTZ, David A. 1999. “A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin.” **Biochemical Pharmacology** 57 (7): 727–41. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00307-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00307-4).

GUNDALA, Sushma Reddy et al. Hydroxychavicol, a betel leaf component, inhibits prostate cancer through ROS-driven DNA damage and apoptosis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 280, n. 1, p. 86-96, 2014.

HANAHAN, D.; Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12(1), p. 31-46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000.

HEIDEMANN, F. et al. Selectins mediate small cell lung cancer systemic metastasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2014.

HOUSMAN, Genevieve et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769-1792, 2014.

HUANG, Min; LU, Jin-Jian; DING, Jian. Natural products in cancer therapy: Past, present and future. **Natural products and bioprospecting**, v. 11, p. 5-13, 2021.

HUNG, J. Y. et al. Colony-stimulating factor 1 potentiates lung cancer bone metastasis. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 4, p. 371–381, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 10 de abr. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa de câncer no Brasil 2020**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 15 de abril de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é câncer?**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 15 abr. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Quimioterapia**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/quimioterapia>. Acesso em: 30 mar. 2023.

ISHTEYAQUE, Sharmeen et al. In vitro: cytotoxicity, apoptosis and ameliorative potential of Lawsonia inermis extract in human lung, Colon and Liver Cancer cell line. **Cancer Investigation**, v. 38, n. 8-9, p. 476-485, 2020.

JANG, Soon Young et al. Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation. **Oncology reports**, v. 31, n. 6, p. 2827-2833, 2014.

JORDÃO, A. K. et al. Lawsonsone in organic synthesis. **RSC Adv.**, v. 5, n. 83, p. 67909- 67943, 2015.

JORDÃO, A. K.; VARGAS, M. D.; PINTO, A. C.; DA SILVA, F. D. C.; FERREIRA, V. F. Lawsonsone in organic synthesis. *RSC Adv.* v. 5, n. 83, p. 67909-67943, 2015. JUARISTI, E.; CUEVAS, G. **The Anomeric Effect**, CRC Press: Boca Raton, 1995.

KAMAL, M. Atividades farmacológicas de Lawsonia inermis Linn.: uma revisão. **Moléculas**, v. 15, n. 4, pág. 2139-51, 2010.

KARP, G. *Biologia Celular e Molecular*. 3 ed. Barueri-SP: **Manole**, 2005. 786 p.

KAWAMURA, Bárbara. **Avaliação de um novo candidato a fármaco para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas**. 2019.

Dissertação (Mestrado em Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia) - Faculdade de Medicina, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

KENFIELD, Stacey A. et al. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. **Tobacco control**, v. 17, n. 3, p. 198-204, 2008.

KESSENBROCK, Kai; PLAKS, Vicki; WERB, Zena. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.

KONGKATHIP, Ngampong et al. Potent antitumor activity of synthetic 1, 2-naphthoquinones and 1, 4-naphthoquinones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 14, p. 3179-3191, 2003.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity of four Aframomum species (*A. arundinaceum*, *A. alboviolaceum*, *A. kayserianum* and *A. polyanthum*) towards multi-factorial drug resistant cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.

KURTYKA, Renata et al. Effects of juglone and lawsone on oxidative stress in maize coleoptile cells treated with IAA. **AoB Plants**, v. 8, 2016.

KVIECINSKI, M. R. et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 421, n. 2, p. 268-273, 2012.

LABELLE, Myriam; BEGUM, Shahinoor; HYNES, Richard O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. **Cancer cell**, v. 20, n. 5, p. 576-590, 2011.

LEE, H. W. et al. Alpha-smooth muscle actin (ACTA2) is required for metastatic potential of human lung adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 21, p. 5879–5889, 2013.

LI, Ping; XIN, Hongyan; LIU, Wenlian. Lawsone inhibits cell growth and improves the efficacy of cisplatin in SKOV-3 ovarian cancer cell lines. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 5, p. 8-17, 2017.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIMA, Kálya Yasmine Nunes de; CANCELA, Marianna de Camargo; DE SOUZA, Dyego Leandro Bezerra. Spatial assessment of advanced-stage diagnosis and lung cancer mortality in Brazil. **Plos one**, v. 17, n. 3, p. e0265321, 2022.

LÓPEZ, L. I. L. et al. Naphthoquinones: Biological Properties and Synthesis of Lawsone and Derivatives — a Structured Review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 248–258, 2014.

MAHMOUD, Talal Suleiman et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 456-464, 2011.

MANZANO, E. S. et al. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 10, p. 3376, maio 2020.

MARIN, J. et al. Importance and Limitations of Chemotherapy Among the Available Treatments for Gastrointestinal Tumours. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 162–184, 2009.

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. "Metastasis: a question of life or death". **Nat. Rev. Cancer.**, 6 (6): 449, 2006.

MELLO, Márcia Sarpa de Campos et al. Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios. 2021.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**; v. 76, pp. 1439-53, 2005.

NAKASHIMA, Souichi et al. Inibidores da melanogênese em células de melanoma B16 4A5 de botões florais de *Lawsonia inermis* (Henna). **Cartas de Química Bioorgânica e Medicinal**, v. 25, n. 13, pág. 2702-2706, 2015.

NCI - NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer Treatment: Types of Cancer Treatment: NCI, [20--]. **Disponível em:** <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> Acesso em: 11 mar. 2023

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NON-SMALL CELL LUNG CANCER COLLABORATIVE GROUP. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. **Bmj**, v. 311, n. 7010, p. 899-909, 1995.

NON-SMALL CELL LUNG CANCER COLLABORATIVE GROUP. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. **Bmj**, v. 311, n. 7010, p. 899-909, 1995.

OLIVEIRA, Katia M. et al. Selective Ru (II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 176, p. 66-76, 2017.

OTTONI, F. M. **Síntese de derivados glicosídicos de produtos naturais bioativos como candidatos a novos fármacos**. 2018. Dissertação (Mestrado

em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2018.

OTTONI, Flaviano M. et al. Synthesis and cytotoxicity evaluation of glycosidic derivatives of lawsone against breast cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 2, p. 126817, 2020.

POPPER, H. H. Progression and metastasis of lung cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 1, p. 75–91, 2016.

PRADO, Bernadete Bisi Franklin do. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Revista Ciência e Cultura**. Vol. 06. Nº. 1. São Paulo. 2014.

PROPHETA-SANTOS, E. W. **Estudo do potencial citotóxico de derivados de lausona em linhagens tumorais**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2022.

RAFEHI, Haloom et al. Ensaio clonogénico: células aderentes. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 49, pág. e2573, 2011.

RAHMOUN, Nadjib et al. Antifungal activity of the Algerian Lawsonia inermis (henna). **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 1, p. 131-135, 2013.

RAMOS-PÉREZ, Cristina et al. Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent β -lapachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule-or topoisomerase-mediated DNA damage. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 2, p. 206-219, 2014.

RASOULIYAN, F. et al. Preparation, physicochemical characterization, and antiproliferative properties of Lawsone-loaded solid lipid nanoparticles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 239, n. July, p. 105123, 2021.

ROSKOSKI, R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of ALK-driven lung cancers. **Pharmacological Research**, v.117, p. 343-356, 2016.

ROSS, Ashley E. et al. Dimeric naphthoquinones, a novel class of compounds with prostate cancer cytotoxicity. **BJU international**, v. 108, n. 3, p. 447-454, 2011.

Sadeghi-Aliabadi, H., Ghasemi, N., & Kohi, M. (2009). Cytotoxic effect of *Convolvulus arvensis* extracts on human cancerous cell line. **Research in Pharmaceutical Sciences**, 3(1), 31-34.

SÁNCHEZ-CALVO, Juan M. et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of naphthoquinone derivatives: A structure–activity relationship study. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, p. 1274-1285, 2016.

SEMENOVA, E.A. et al. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. **Genes & Development**, v. 29, p. 1447–1462, 2015.

SEVERINO, M. E. **Biotransformação de naftoquinonas por fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação citotóxica dos**

derivados obtidos. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberirão Preto, USP, Riberirão Preto, 2016.

SEYFRIED, Thomas N.; HUYSENTRUYT, Leanne C. On the origin of cancer metastasis. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 18, n. 1-2, 2013.

SHEN, Xiao-bao et al. Design, synthesis and anticancer activity of naphthoquinone derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 773-785, 2020.

SHIEN, Kazuhiko et al. Prognostic impact of cancer stem cell-related markers in non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy. **Lung cancer**, v. 77, n. 1, p. 162-167, 2012.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019: {Cancer} {Statistics}, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.

SIEGEL, Rebecca et al. Cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.

SINGH, D. K.; LUQMAN, S. Lawsonia inermis (L.): A perspective on anticancer potential of Mehndi. **Henna**. v. 1, n. 4, p. 112–120, 2014.

SOUZA, Eliane Teixeira; LOPES, Wilson A.; ANDRADE, Jailson B. de. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, p. 486-495, 2016.

SOUZA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. DE. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.

SUNG H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2021.

SUNG, H. et al. Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, p. 88–112, 2019.

TABASSUM, Doris P.; POLYAK, Kornelia. Tumorigenesis: it takes a village. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 8, p. 473-483, 2015.

TAMURA, T., KURISHIMA, K., NAKAZAWA, K., KAGOHASHI, K., ISHIKAWA, H., SATOH, H., & HIZAWA, N. Specific organ metastases and survival in metastatic non-small-cell lung cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, 3, 217–221, 2015.

VERMA, R. Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones: A QSAR Study. **AntiCancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 489–499, 2006.

VIEIRA, Vanessa et al. Quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, v. 17, n. 34, 2020.

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic Warburg effect. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 4, p. 819-823, 2015.

VOLKOVA, M.; RUSSELL, R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. **Curr Cardiol Rev** 7 (4): 214–220. 2011.

VON HOFF, Daniel D. et al. Risk factors for doxorubicin-Induced congestive heart failure. **Annals of internal medicine**, v. 91, n. 5, p. 710-717, 1979.

WANG, Shi-Bin; TAO, Zhenzhou; LI, Ping. Lawsone suppresses azoxymethane mediated colon cancer in rats and reduces proliferation of DLD-1 cells via NF-κB pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 152-161, 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18,1 million new cases and 9,6 million cancer deaths in 2018.** International Agency for Research on Cancer, Geneva, Switzerland, 2018.

WILD, C. P. et al. Cancer Prevention Europe. **Molecular Oncology**, v. 13, n. 3, p. 528– 534, 2019.

WILD, C.P., WEIDERPASS, E., STEWART, B.W., editors (2020). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: 20 abr. 2023.

YABROFF, Robin Robin et al. **Association of the COVID-19 pandemic with patterns of cancer services.** 2021.

YARROW, J.C. et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnology**, v. 4, p. 1-9, 2004.

ZAPHIROPOULOS, Peter G. Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome P450 2C24 gene: correlation with exon skipping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 13, p. 6536-6541, 1996.

ZAPPA, Cecilia; MOUSA, Shaker A. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. **Translational lung cancer research**, v. 5, n. 3, p. 288, 2016.

ZHONG, Z. et al. Anti-cancer effects of Rhizoma Curcumae against doxorubicin-resistant breast cancer cells. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 44, 2018.