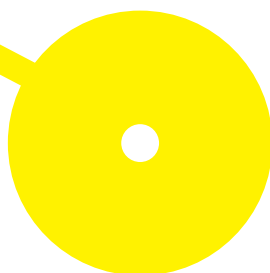




Caracterização da atividade biológica e antioxidante dos isómeros do naftol

João Sousa

10/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

Local de realização: Centro de Investigação em Saúde Translacional e Biotecnologia Médica
(TBIO) / Rede de Investigação em Saúde (RISE-Health) / E2S-IPP

Caracterização da atividade biológica e antioxidante dos isómeros do naftol

Autor

João Sousa

Orientadores

Doutora Cassilda Pereira / TBIO/E2S-IPP

Doutora Vera Freitas / CIQUP-IMS

Doutora Mónica Vieira / TBIO/E2S-IPP

Dissertação de Estágio apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo/Área de Especialização em **Bioquímica Aplicada** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Agradecimentos

Em primeiro, queria agradecer à Professora Doutora Cassilda Pereira por me ter aceite como seu orientando, acolhido da melhor maneira e por todo o tempo disponibilizado e a ajuda incondicional ao longo de todo este projeto. Agradeço pela preocupação e pelos conselhos dados.

Agradeço à Professora Doutora Mónica Vieira por me ter aceite no projeto e pela orientação no mesmo, assim como o apoio prestado ao longo dos 2 anos de mestrado.

Agradeço à Professora Doutora Vera Freitas por toda a ajuda disponibilizada neste projeto.

Agradeço ao grupo TBIO RISE-Health, assim como, a todos os investigadores pelo bom acolhimento e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agradeço a todos os meus colegas de turma pelo companheirismo e amizade criada ao longo destes 2 anos.

Agradeço à minha família, em especial, aos meus pais e ao meu irmão por todo o apoio incondicional, conselhos e suporte que me têm dado, não só, ao longo destes 2 anos como em todas as etapas da minha vida.

Agradeço a todos os meus amigos de infância pela irmandade e apoio ao longo da vida. Que seja de sempre para sempre.

Resumo

Os naftóis são os homólogos naftalenos dos fenóis, que possuem um grupo hidroxilo mais reativo do que os fenóis, que apresentam diversas atividades biológicas entre as quais a atividade anti-inflamatória.

A configuração estrutural dos isómeros de *o*-acetilnaftol apresenta uma característica estrutural que facilita a formação de uma ligação de hidrogénio intramolecular, o que lhes confere propriedades benéficas para aplicações em diversos domínios científicos e tecnológicos.

Posto isto e verificando se as características desta família de compostos tem havido um interesse crescente em estudar a atividade anti-inflamatória, a atividade antioxidante e também a atividade anti tumoral em modelos celulares relacionados com as doenças com uma componente inflamatória subjacente.

A obesidade é causada por um desequilíbrio energético onde existe uma ingestão excessiva de energia, que provoca uma hipertrofia do tecido adiposo, sendo uma condição inflamatória de baixo grau caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura capaz de gerar a inflamação e o stress oxidativo. A inflamação ou processo inflamatório é uma resposta por parte do organismo a danos teciduais, tais como infeções, lesões físicas ou isquémicas e exposição a toxinas, sendo responsável por alterações celulares e respostas imunes para reparação dos tecidos lesados. A inflamação crónica é um tipo de inflamação caracterizada por uma ativação persistente do sistema imune e é uma condição que está associada a casos de obesidade. A obesidade tem aparecido como associada ao stress oxidativo que é um processo caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante do organismo em neutralizar estas espécies, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento de problemas metabólicos.

O trato gastrointestinal é considerado o maior órgão imunológico do corpo com a função de manter regulada homeostase imunológica. Este trato gastrointestinal é constantemente afetado de diversas maneiras por patógenos e em casos de obesidade com uma produção excessiva de ROS, denota-se um aumento do stress oxidativo e de uma dificuldade do sistema antioxidante do organismo combater este aumento originando danos teciduais e que levam ao desenvolvimento de doenças intestinais.

Palavras-chave: isómeros de *o*-acetilnaftol, atividade antioxidante, stress oxidativo, ROS, obesidade.

Abstract

Naphthols are the naphthalene homologues of phenols, which have a more reactive hydroxyl group than phenols, and which show various biological activities, including anti-inflammatory activity.

The structural configuration of the isomers of *o*-acetylnaphthol has a structural feature that facilitates the formation of an intramolecular hydrogen bond, which gives them beneficial properties for applications in various scientific and technological fields.

That said, and to verify the characteristics of this family of compounds, there has been growing interest in studying anti-inflammatory activity, antioxidant activity and anti-tumour activity in cellular models related to diseases with an underlying inflammatory component.

Obesity is caused by an energy imbalance where there is an excessive intake of energy, which causes hypertrophy of adipose tissue, and is a low-grade inflammatory condition characterised by the excessive accumulation of fat capable of generating inflammation and oxidative stress. Inflammation or the inflammatory process is a response by the body to tissue damage, such as infections, physical or ischaemic injuries and exposure to toxins, and is responsible for cellular changes and immune responses to repair damaged tissues. Chronic inflammation is a type of inflammation characterised by persistent activation of the immune system and is a condition that is associated with cases of obesity. Obesity has been shown to be associated with oxidative stress, which is a process characterised by an imbalance between the production of ROS and the body's antioxidant capacity to neutralise these species, playing a crucial role in the development of metabolic problems.

The gastrointestinal tract is the body's largest immunological organ with the function of maintaining regulated immunological homeostasis. The gastrointestinal tract is constantly affected in various ways by pathogens and in cases of obesity with an excessive production of ROS, there is an increase in oxidative stress and a difficulty for the body's antioxidant system to combat this increase, causing tissue damage and leading to the development of intestinal diseases.

Keywords: *o*-acetylnaphthol isomers, antioxidant activity, oxidative stress, ROS, obesity.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Naftóis.....	1
1.2.	A obesidade como patologia multifatorial	2
1.2.1.	Inflamação Crónica.....	4
1.2.2.	Stress Oxidativo.....	4
1.3.	Tecido epitelial do intestino.....	5
2.	Objetivos.....	7
3.	Materiais e Métodos.....	8
3.1.	Compostos Utilizados.....	8
3.2.	Linhas Celulares	8
3.3.	Condições de crescimento das linhas celulares.....	8
3.4.	Passagem das linhas celulares.....	9
3.5.	Caracterização Química.....	9
3.6.	Ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT)	10
3.7.	Estudo do efeito dos compostos ao nível da proliferação ou inibição celular	11
3.8.	Estudo da atividade antioxidante in vitro	12
3.9.	Caracterização da atividade em modelos celulares por HPLC	12
3.10.	Análise Estatística.....	13
4.	Resultados.....	14
4.1.	Caracterização química dos compostos isómeros de o-acetilnaftol.....	14
4.2.	Efeito citotóxico dos compostos isómeros de o-acetilnaftol em modelos celulares.....	16
4.3.	Efeito dos isómeros doo-acetilnaftol na proliferação celular	18
4.4.	A atividade antioxidante dos compostos in vitro	22
4.5.	Impacto do isómeros do o-acetilnaftol no metabolismo celular	24
5.	Discussão.....	30
6.	Conclusão.....	36
	Referências Bibliográficas.....	38

Índice de Figuras

Figura 1: Geometrias otimizadas correspondentes aos mínimos globais dos isômeros de o-acetilnaftol obtidas pelo método composto G3(MP2) /B3LYP. Código de cores dos átomos: cinzento, C; vermelho, O; branco.	2
Figura 2:Esquema de uma placa de 96 poços para ensaio de MTT	11
Figura 3: Espectros de infravermelho obtidos para os isômeros 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol utilizando 20 scans.....	14
Figura 4:Curva de DSC do 1-acetil-2-naftol.....	15
Figura 5: Curva de DSC do 2-acetil-1-naftol.....	15
Figura 6: Determinação da viabilidade celular nas células Caco-2 na presença dos compostos através do ensaio de MTT. 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A); 1acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (B); 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (C) e 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (D). Todos os compostos encontram-se em concentrações crescentes. Unt significa células não tratadas (do inglês- Untreated) e foram utilizadas como controlo de viabilidade celular. Significância estatística foi testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com as células controlo foram calculadas pelo teste de Dunnet. * p<0,05; *** p<0,001; ****p<0.0001. Os resultados são expressos como média ± DP de 3 experiências independentes.....	16
Figura 7: Determinação da viabilidade celular nas células HT-29na presença dos compostos através do ensaio de MTT. 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A); 1acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (B); 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (C) e 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (D). Todos os compostos encontram-se em concentrações crescentes. Unt significa células não tratadas (do inglês- Untreated) e foram utilizadas como controlo de viabilidade celular. Significância estatística foi testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com as células controlo foram calculadas pelo teste de Dunnet. * p<0,05; *** p<0,001; ****p<0.0001. Os resultados são expressos como média ± DP de 3 experiências independentes.....	17
Figura 8: Imagens do ensaio de migração para determinação do efeito dos compostos 1-acetil-2-naftol em etanol (A), 1-acetil-2-naftol em DMSO (B), 2-acetil-1-naftol (C) e 2-acetil-1-naftol (D) na proliferação celular nas células Caco-2 ao final de 24h e 48h. Unt significa células não tratadas(untreated). Estão representadas as células apenas tratadas com os solventes (0 µM) e as células tratadas com a maior concentração de composto (1000 µM). Imagens representativas	

de 2 experiências independentes obtidas com auxílio do microscópio de campo claro na objetiva de 10x. A barra da escala representa 50 μm	19
Figura 9: Efeito dos compostos na proliferação celular de Caco-2 às 24h e às 48h. A largura do risco na monocamada de células foi medida ao fim de 24 e 48h em 3 pontos distintos (software Fiji) e representada graficamente. Resultados representativos de 2 experiências independentes. Células não tratadas (unt) foram usadas como controlo. Resultados expressos como média \pm DP.	20
Figura 10: Imagens do ensaio de migração para determinação do efeito dos compostos 1-acetil-2-naftol em etanol (A), 1-acetil-2-naftol em DMSO (B), 2-acetil-1-naftol (C) e 2-acetil-1-naftol (D) na proliferação celular nas células HT-29 ao final de 24h e 48h. Unt significa células não tratadas(untreated), usadas como controlo. Estão representadas as células apenas tratadas com os solventes (0 μM) e as células tratadas com a maior concentração de composto (1000 μM). Imagens representativas obtidas com auxílio do microscópio de campo claro na objetiva de 10x. A barra da escala representa 50 μm	21
Figura 11: Efeito dos compostos na proliferação celular de HT-29 às 24h e às 48h. A largura do risco na monocamada de células foi medida ao fim de 24 e 48h em 3 pontos distintos (software Fiji) e representada graficamente. Resultados representativos de 2 experiência independentes. Células não tratadas (unt) foram usadas como controlo. Resultados expressos como média \pm DP.	22
Figura 12: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de compostos (esquerda) e quercetina (direita) (μM) usadas ao fim de 60 min. A quercetina e os compostos 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol e DMSO; 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol e DMSO foram utilizados em concentrações crescentes. A quercetina funcionou como controlo do ensaio. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes.....	22
Figura 13: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (μM) usadas ao fim de 60 min. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes. Significância estatística testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com a quercetina foram calculados pelo teste de Dunnett. **** $p < 0,0001$	23
Figura 14: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (μM) usadas ao fim de 60 min. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes. Significância estatística testada por one-way ANOVA e	

valores de p individuais para as comparações com a quercetina foram calculados pelo teste de Dunnett, *** p=0,0002, **** p<0,0001.....	23
Figura 15: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (μM) usadas ao fim de 60 min. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes. Significância estatística testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com a quercetina foram calculados pelo teste de Dunnett. **** p=0,0009.....	24
Figura 16: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (μM) usadas ao fim de 60 min. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes. Significância estatística testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com a quercetina foram calculados pelo teste de Dunnett. **** p<0,0001.....	24
Figura 17: Curva de calibração da Nitro-tirosina (em cima) e da Tirosina (em baixo). Os pontos correspondentes ao padrão 2 e padrão 5 da nitro-tirosina não foram considerados para a construção da curva de calibração por apresentarem área média discrepante relativamente aos restantes padrões. Estão representadas as equações de regressão e os coeficientes de correlação respetivos. Os dados foram tratados utilizando o Excel.....	25
Figura 18: Representação dos cromatogramas dos dois compostos dissolvidos em diferentes solventes. Cromatograma representativo do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A); Cromatograma representativo do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (B)); Cromatograma representativo do composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (C); Cromatograma representativo do composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (D).....	26
Figura 19: Representação dos cromatogramas das células HT-29 tratadas com a concentração de 10 μM do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A) e do respetivo meio condicionado (B) e das células tratadas com concentração de 100 μM do composto dissolvido em etanol (C) e do respetivo meio condicionado (D).....	27
Figura 20: Representação dos cromatogramas das células HT-29 tratadas com a concentração de 100 μM do composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (A) e do respetivo meio condicionado(B).....	28
Figura 21: Representação dos cromatogramas das células Caco-2 tratadas com a concentração de 1 μM do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A) e do respetivo meio condicionado(B).....	28

Figura 22: Representação dos cromatogramas do meio condicionado das células Caco-2 tratadas com a concentrações crescentes do composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol. Células untreated (A). Concentração 0,1 μ M de composto (B e B1, ampliação de B); Concentração 1 μ M de composto (C e C1 ampliação de C); Concentração 100 μ M de composto (D e D1 ampliação de D).29

Índice de Tabelas

Tabela 1: IC50 e respetivo desvio padrão calculado para cada composto nas duas linhas celulares, com recurso a software GraphPad Prism.....	18
Tabela 2: Representação do limite de deteção, do limite de quantificação, do tempo de retenção, do coeficiente de correlação e da equação de regressão da nitro-tirosina e tirosina.....	26

Lista de abreviaturas

3-NT – Nitro-tirosina

μL – Microlitro

μM – Micromolar

cm – Centímetros

°C – Graus Celsius

DMEM – Dulbeco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimethyl sulfoxide, Merck

DP – desvio padrão

DPPH – 2,2 difenil-1-picrihidrazil

DSC – Differential Scanning Calorimetry

ESIPT – Excited State Intramolecular Proton Transfer

FTIR-ATR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance

GC-FID – cromatografia gasosa utilizando detetor de ionização em chama

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography

IC₅₀ – Concentração de composto que causa 50% de inibição celular

IL-6 – Interleucina-6

IMHB – IntraMolecular Hydrogen Bond

K – Kelvin

Kg/m² – quilograma por metro quadrado

mg – miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio

m/v – Mol por volume

nm – Nanómetros

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão Fosfato Salino

P/S – Penicilina/estreptomicina

rcf – Aceleração centrífuga relativa

ROS – Reactive Oxygen Species

SBF – Soro Bovino Fetal

TNF- α - Tumor Necrosis Factor alpha

TYR - Tirosina

Unt - Untreated

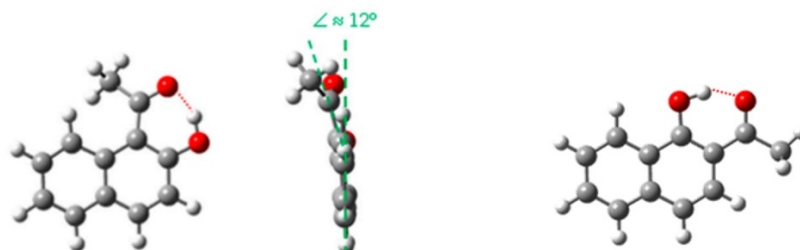
v/v - Volume por volume

1. Introdução

1.1. Naftóis

Os naftóis são os homólogos naftalenos dos fenóis, que possuem um grupo hidroxilo mais reativo do que os fenóis. Existem duas formas isoméricas principais que são o 1-naftol e o 2-naftol divergindo entre si pela posição do grupo hidroxilo. Dito isto, a família dos naftóis está associada a várias atividades biológicas, como a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e anti tumoral, que estão relacionadas com a presença do anel naftaleno nesta família de compostos químicos (Freitas & Silva, 2020).

A configuração estrutural dos isómeros de *o*-acetilnaftol revela um arranjo em que o átomo de oxigénio do grupo acetilo está posicionado perto do átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo. Esta característica estrutural facilita a formação de uma ligação de hidrogénio intramolecular (IMHB, acrónimo do inglês *IntraMolecular Hydrogen Bond*), o que lhes confere propriedades foto-físicas, desbloqueando uma vasta gama de aplicações em diversos domínios científicos e tecnológicos. A energia da ligação de hidrogénio intramolecular para o isómero 2-acetil-1-naftol é superior à do isómero 1-acetil-2-naftol. Essa diferença pode ser atribuída às características estruturais dos dois compostos (Figura 1). A estrutura do 2-acetil-1-naftol é coplanar, garantindo uma maior estabilidade da ligação de hidrogénio intramolecular. Em contraste, o isómero 1-acetil-2-naftol apresenta uma ligeira distorção do grupo acetilo, que se encontra inclinado cerca de 12° para fora do plano dos anéis, reduzindo a eficiência da interação intramolecular. Tipicamente, após a foto-excitação, estes compostos sofrem uma rápida reação ácido-base através da IMHB, resultando numa transição tautomeria da forma enol no estado fundamental para uma forma ceto excitada, um processo geralmente referido como transferência intramolecular de protões no estado excitado (ESIPT-abreviatura do inglês *Excited State Intramolecular Proton Transfer*). Este fenómeno torna-os importantes em várias aplicações, incluindo como ferramentas em espectroscopia e sondas de fluorescência em investigação biológica (Freitas & Silva, 2020).

1-acetil-2-naftol**2-acetil-1-naftol**

Comprimento da ligação intramolecular de hidrogénio / m	
1.59×10^{-10}	1.64×10^{-10}

Figura 1: Geometrias otimizadas correspondentes aos mínimos globais dos isómeros de *o*-acetilnaftol obtidas pelo método composto G3(MP2)/B3LYP. Código de cores dos átomos: cinzento, C; vermelho, O; branco.

Mais recentemente, tem havido um interesse crescente na sintetização de híbridos heterocíclicos devido ao seu potencial anticancerígeno e antioxidante e, uma vez que o naftaleno é um benzo heterocíclico e, como já foi referido, os naftóis são os homólogos naftalenos dos fenóis, há interesse em estudar a possível atividade biológica desta família de compostos. Além disso, compostos derivados de naftaleno foram identificados como bons substitutos do anel de benzeno para melhorar a estabilidade química e metabólica da molécula, mantendo a sua atividade farmacológica (Luo et al., 2021).

Os naftóis aparecem como algo ainda recente na comunidade científica e sem muita informação sobre si. Neste sentido, este trabalho propõe-se caracterizar dois isómeros específicos da família dos naftóis, o 1-acetil-2-naftol e o 2-acetil-1-naftol, tanto a nível da química como das suas atividades biológicas tentando assim identificar o seu potencial como ferramenta biotecnológica, particularmente no âmbito do estudo e tratamento da obesidade.

1.2. A obesidade como patologia multifatorial

A obesidade é uma doença crónica com origem multifatorial que é considerada como o maior problema de saúde pública no mundo afetando milhões de pessoas, tendo a sua prevalência triplicada desde 1975 (Flores-Dorantes et al., 2020). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2022 existiam 2,5 bilhões de adultos com excesso de peso dos quais 890 milhões viviam com obesidade.

A obesidade é causada por um desequilíbrio energético onde existe uma ingestão excessiva de energia, que provoca uma hipertrofia do tecido adiposo (Flores-Dorantes et al., 2020). Esta doença é referida como uma condição inflamatória de baixo grau caracterizada por um acúmulo excessivo de gordura, capaz de gerar não só a inflamação como também o stress oxidativo. A obesidade está associada a mecanismos hormonais e metabólicos, sendo o tecido adiposo, para além de um reservatório de energia, um órgão metabolicamente ativo que secreta citocinas e hormonas que estão envolvidas nos processos metabólicos e nos processos inflamatórios (Blüher, 2019). O stress oxidativo e a inflamação característicos de indivíduos obesos estimulam alterações morfológicas no cérebro resultando em comprometimentos cognitivos. A inflamação sistémica induzida pelo excesso de tecido adiposo pode atravessar a barreira hematoencefálica e provocar uma inflamação neuronal, contribuindo para a disfunção e morte das células neuronais. Esta resistência a insulina e a hiperglicemia induzem respostas inflamatórias e o stress oxidativo que provocam morte das células neuronais e danificam os processos cognitivos (Flores-Dorantes et al., 2020; Miller & Spencer, 2014).

Para além das doenças neurodegenerativas, a obesidade também apresenta um papel fundamental nas doenças metabólicas, como por exemplo a diabetes tipo 2, a hipertensão, a dislipidemia e a síndrome metabólica. A obesidade, fundamentalmente, a obesidade visceral caracterizada pelo acúmulo de gordura na zona abdominal está muito associada à resistência à insulina, condição que está na origem da diabetes tipo 2 (Kahn et al., 2006). A síndrome metabólica é um conjunto de problemas metabólicos onde se inclui a resistência à insulina, a dislipidemia, a obesidade abdominal e a hipertensão. A prevalência da síndrome metabólica tem aumentado em conjunto com o aumento da prevalência da obesidade, tornando se assim um importante marco para estabelecer a ligação entre o excesso de peso e as doenças metabólicas (Fahed et al., 2022).

Outra doença que está muito associada à obesidade é o cancro. Estudos revelaram que a obesidade aumenta significativamente o risco de cancro do indivíduo, referindo que à medida que a massa corporal aumenta em 5 kg/m^2 o risco de desenvolver o cancro aumenta em 10%. Com o objetivo de estabelecer ainda mais a relação entre a obesidade e o cancro, estudos apontam para que em condições de hipoxia e de inflamação crónica, condições características de indivíduos obesos, se crie um ambiente ideal para o desenvolvimento e proliferação tumoral, aumentando assim a probabilidade de indivíduos com esta condição desenvolverem cancro em relação a indivíduos saudáveis (Basen-Engquist & Chang, 2011).

1.2.1. Inflamação Crónica

O processo inflamatório é uma resposta por parte do organismo a danos teciduais, tais como infeções, lesões físicas ou isquémicas e exposição a toxinas. Esta resposta inflamatória é responsável por alterações celulares e por respostas imunes que originam o reparo do tecido celular danificado e o crescimento celular (Singh et al., 2019).

A inflamação pode ser do tipo aguda fazendo parte do mecanismo de defesa do sistema imunológico ou do tipo crónica se a causa da inflamação persistir ou se certos mecanismos responsáveis por interromperem o processo inflamatório falharem, podendo levar a criação de um ambiente propício ao desenvolvimento de patologias (Fernandes et al., 2024).

A inflamação crónica, que está mais associada ao estudo desenvolvido neste trabalho, é caracterizada por uma ativação persistente do sistema imunológico que pode levar a danos teciduais e contribuir para o desenvolvimento de várias doenças (Medzhitov, 2008). Esta inflamação crónica é uma condição existente nos casos de obesidade e impulsionada pelo acumular do tecido adiposo, pois este acumular de tecido adiposo estimula a libertação de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , acrónimo do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*), e a interleucina-6 (IL-6) e reduz a produção de adiponectina que leva a um estado pró-inflamatório e de stress oxidativo. Uma ligação entre a inflamação crónica e a obesidade foi estabelecida pois as citocinas inflamatórias aparecem em níveis plasmáticos mais elevados em indivíduos obesos em relação a indivíduos normais (Acciarino et al., 2024).

1.2.2. Stress Oxidativo

O stress oxidativo é um processo caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, acrónimo do inglês *Reactive Oxygen Species*) e a capacidade antioxidante do organismo em neutralizar estas espécies, podendo causar danos celulares que afetam vários sistemas biológicos. Este fenómeno tem sido associado a várias doenças crónicas, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e cancro. Recentemente a obesidade tem surgido como uma condição associada ao stress oxidativo, sendo por isso considerada uma condição de risco para o aumento da produção de ROS e por sua vez diminuição dos mecanismos antioxidantes do organismo (Furukawa et al., 2004). A obesidade, induz um estado pró-inflamatório crónico, que é um dos principais impulsionadores do stress oxidativo. O tecido adiposo produz citocinas inflamatórias como as interleucinas e TNF- α , que ativam as vias de

sinalização inflamatórias e levam ao aumento da produção de ROS por parte das células. Estes radicais livres produzidos podem provocar danos em componentes celulares essenciais como ácidos nucleicos, proteínas e lípidos de membrana comprometendo várias funções celulares (Marseglia et al., 2014).

Estudos mostram que o stress oxidativo associado à obesidade desempenha um papel crucial no desenvolvimento de problemas metabólicos como a hipertensão e a resistência à insulina (Keaney et al., 2003). Compreender os mecanismos subjacentes à relação entre obesidade e stress oxidativo é fundamental para o desenvolvimento de terapias direcionadas. A diminuição do peso corporal, melhoria da função mitocondrial e aumento da capacidade antioxidante são alguns processos promissores na diminuição dos efeitos do stress oxidativo em indivíduos obesos (Vincent et al., 2007).

1.3. Tecido epitelial do intestino

O epitélio intestinal é uma camada simples de células com função de revestimento que separa o corpo do lúmen intestinal evitando, através da secreção de enzimas que inibem o crescimento e o movimento microbiano potencialmente perigoso para o organismo, que este seja afetado. Esta camada de células atua como camada responsável pelo transporte ocorrido no intestino apresentando vilosidades responsáveis pelo transporte de nutrientes, água e íons entre o lúmen intestinal e a corrente sanguínea (Montrose, 2004; Prescott et al., 2013).

O trato gastrointestinal é considerado o maior órgão imunológico do corpo com a função de manter regulada a homeostase imunológica. A barreira intestinal por sua vez é um sistema que consiste num conjunto de componentes físicos e funcionais que interagem com a microbiota intestinal e mantêm as funções intestinais reguladas. A inflamação sistêmica origina-se quando algum destes componentes da barreira intestinal falha. Posto isto uma diminuição ou falha na função da barreira intestinal pode incentivar à formação de processos inflamatórios (Acciarino et al., 2024).

O epitélio intestinal é continuamente afetado de diversas formas e para preservar a sua homeostase tecidual, este apresenta uma grande capacidade de renovação sendo que a cada 3 a 5 dias é renovado através de diversos processos que incluem a proliferação, a migração e diferenciação das células que sofrem apoptose e são derramadas no lúmen (Lin & Barker, 2011). Como já referido o trato intestinal é constantemente afetado de diversas formas ou por substâncias estranhas ou por patógenos microbianos. Quando o sistema de defesa antioxidante

não consegue remover o excesso de ROS isso irá provocar um stress oxidativo a nível intestinal, que por sua vez levará a danos criados nas células do trato intestinal e ao desenvolvimento de doenças intestinais (Wang et al., 2020).

2. Objetivos

Este trabalho tem como principais objetivos estabelecer uma caracterização química dos compostos isômeros de *o*-acetilnaftol, nomeadamente do composto 1-acetil-2-naftol e do composto 2-acetil-1-naftol, e ainda caracterizar e explorar as possíveis atividades biológicas que possam tornar estes compostos em ferramentas biológicas e terapêuticas.

Para isso foram realizados ensaios *in vitro* e em modelos celulares, nomeadamente células HT-29 (Câncer do colon humano) e Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano), no sentido de:

- Realizar uma caracterização química dos compostos através das técnicas de FTIR-ATR e DSC;
- Determinar a citotoxicidade em linhas celulares através do método de MTT;
- Avaliar o efeito sobre a proliferação celular através de um ensaio de "wound-healing";
- Determinar a atividade antioxidante e anti-radicalar através de ensaio com DPPH *in vitro*;
- Caracterizar meios condicionados e lisados celulares tratados com os isômeros de *o*-acetilnaftol por HPLC.

3. Materiais e Métodos

3.1. Compostos Utilizados

Ao longo deste estudo foram utilizados 2 isómeros de *o*-acetilnaftol, o 1-acetil-2-naftol e o 2-acetil-1-naftol, sendo ambos os compostos pertencentes à família dos naftóis e foram adquiridos comercialmente. Devida à baixa solubilidade destes compostos em meio aquoso foram ambos dissolvidos em solventes orgânicos, nomeadamente, em etanol e Sulfóxido de dimetilo (DMSO—abreviatura do inglês *Dimethyl sulfoxide*, Merck).

3.2. Linhas Celulares

Neste estudo, foram utilizadas duas linhas celulares tumorais humanas: Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano) e HT-29 (cancro do colon humano). Estas linhas celulares foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Hélder Oliveira (FCUP/ LAQV-REQUIMTE/E2S|P.Porto).

3.3. Condições de crescimento das linhas celulares

As linhas celulares Caco-2 e HT-29 foram ambas cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, High-Glucose 4,5 g/L, Pan Biotech, Alemanha) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS—abreviatura do inglês *Fetal Bovine Serum*, Pan Biotech, Alemanha) e 1% (v/v) de antibiótico-antimicótico (Penicilina/estreptomicina, P/S, Gibco).

As duas linhas celulares foram mantidas em frascos de 25 cm² (T25, Corning®, USA) e cultivadas numa incubadora à temperatura de 37°C e a uma pressão parcial de 5% de CO₂ (MCO-17AICUV-PE, PHC Corporation, Japão).

Para preservação das linhas celulares, estas foram congeladas a uma densidade de 1 milhão de células por criotubo, em 1 mL de FBS suplementado com 10% de DMSO, a -80°C e posteriormente, para criopreservação prolongada, transferidas para um contentor de azoto líquido. Quando necessário, as células foram descongeladas o mais rapidamente possível num banho termostático e colocadas em meio de cultura na incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

Todas as experiências que envolveram manipulação das culturas de células foram realizadas numa câmara de fluxo laminar de nível 2 (Safemate 1.5, BioAir, Tecniplast Company, Itália), sendo que antes de cada utilização foram ligadas as luzes ultravioleta, por um período de pelo menos 10 minutos e a câmara foi limpa com etanol a 70% assim como todo o material que foi lá colocado.

3.4. Passagem das linhas celulares

A passagem de células foi realizada sempre que as células atingiam aproximadamente 80% de confluência, de forma que estas possuíssem nutrientes e espaço para manter as suas características e condições de crescimento. Quando era atingida esta confluência, o meio era removido e as células lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS- abreviatura do inglês *Phosphate buffered saline*) (NaCl 0,82%(m/v); Na₂HPO₄ 16%(m/v); Na₂HPO₄H₂O 0,03%(m/v); pH 7,4), para retirar possíveis restos de meio de cultura que tenham ficado retidos no frasco. Após a lavagem com PBS as células foram tripsinizadas com 1 ml de tripsina 0,25%-EDTA 0,02% (PAN Biotech, Alemanha) durante 5-8 minutos, e no final deste tempo verificado, através de observação microscópica, se existia um destacamento das células. Caso isto não se verificasse as células eram deixadas a incubar por períodos adicionais de um minuto, até se verificar o destacamento das células. Depois de destacadas as células, adicionava-se 4 ml de meio com FBS, para parar a ação da tripsina. Em seguida, o conteúdo do frasco era transferido para um tubo *falcon* e centrifugado (Gyrozen Co., Ltd., Coreia do Sul) a 300g, a 4°C e durante 10 minutos. No final da centrifugação o sobrenadante era decantado e o *pellet* de células ressuspensionado em 1ml de meio de cultura. A contagem e determinação da viabilidade celular foi efetuada através da observação microscópica (EVOS XL Core, *Invitrogen by ThermoFisher Scientific Corporation*, USA) em hemocítmetro (Câmara de Neubauer) após coloração com azul de tripano 0,4% (Gibco). Por fim transferia-se o volume ideal da suspensão celular para um novo frasco T25, contendo 5 ml de meio. Todas as soluções usadas, quando necessário, foram aquecidas a 37°C num banho termostático (462-0554, VWR, avantor, Fortune 500, USA).

3.5. Caracterização Química

A combinação das análises efetuadas pelas técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada a Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance*) e Calorimetria Diferencial de varrimento (DSC do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) oferece uma visão abrangente sobre a composição química, estrutura molecular e comportamento térmico do composto, sendo indispensável para uma caracterização completa e precisa.

A técnica de FTIR-ATR é uma ferramenta poderosa para identificar grupos funcionais em compostos químicos, através da análise precisa das bandas de absorção associadas a diferentes ligações químicas. Esta técnica é essencial para confirmar a estrutura molecular e identificar a

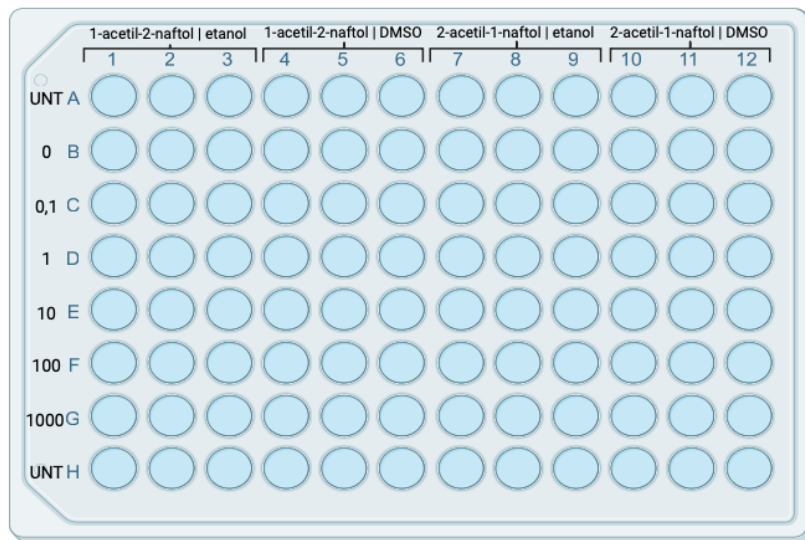
presença de grupos funcionais, como hidroxilos, carbonilos e outros, fornecendo informações detalhadas sobre a composição química do composto. Além disso, alterações nas bandas de absorção podem revelar interações, como ligações de hidrogénio, ajudando a compreender melhor as propriedades físico-químicas do material analisado. A sua simplicidade, rapidez e carácter não destrutivo tornam-na uma escolha ideal tanto para análises preliminares quanto para a monitorização de reações químicas.

A técnica de DSC é amplamente utilizada para avaliar o comportamento térmico de compostos, permitindo a medição de transições térmicas como temperaturas de fusão, cristalização e transições cristal-cristal e vítreas. Além disso, o DSC é uma ferramenta complementar no estudo da pureza de compostos cristalinos, uma vez que alterações no perfil térmico podem indicar a presença de impurezas ou mudanças na fase condensada.

3.6. Ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT)

O ensaio com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) tem como objetivo avaliar a citotoxicidade dos compostos. O MTT é uma solução corada amarela que quando entra em contacto com células vivas se transforma num composto de cor roxa, logo a absorvância é proporcional ao número de células vivas.

Neste ensaio as células foram plaqueadas em placas de 96 poços à densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço e incubadas por de 24h a 37°C. No final das 24h removeu-se o meio dos poços utilizando um aspirador com trap flask (FTA-1, Biosan, Letónia) e foram adicionados os compostos diluídos em DMEM fresco a diferentes concentrações (0,1-1000 μM , volume final 100 μl) seguindo o esquema da placa da figura 2, e deixando a incubar por mais 24h.



Created in BioRender.com 

Figura 2:Esquema de uma placa de 96 poços para ensaio de MTT

No final das 24h, adicionou-se 10 μl de uma solução stock de 5 mg/mL de MTT em PBS (Alfa Aesar™) a cada poço e deixou-se a incubar durante 4h. Após as 4h retirou-se o meio e adicionou-se 100 μl de DMSO aos poços e efetuou-se a leitura da absorvância em dois comprimentos de onda (550 e 650 nm) utilizando um leitor de placas (*Multiskan SkyHigh*, ThermoFisher Scientific Corporation, USA). Células não tratadas (*untreated*) e tratadas com os veículos dos compostos (etanol e DMSO) foram utilizadas como controlo. Foram realizados quatro ensaios independentes com triplicados experimentais.

3.7. Estudo do efeito dos compostos ao nível da proliferação ou inibição celular

Para estudo da existência ou ausência de proliferação celular foram realizados ensaios de migração ("*wound-healing assay*") consistindo na realização de uma "*wound*" (ferida/risco) na monocamada de células e verificação da existência ou ausência de proliferação celular ao longo do tempo na presença e ausência dos compostos em estudo.

Neste ensaio as células foram plaqueadas em placas de 24 poços à densidade de $1,0 \times 10^5$ células/poço e deixadas a crescer durante 48h, a 5% de CO_2 e a 37°C . No final das 48h foi removido o meio dos poços e adicionado meio novo realizando, de seguida, o risco a meio de cada poço e por fim, adicionados 5 μL de cada diluição dos compostos a diferentes concentrações (1-1000 μM). As células foram visualizadas, microscopicamente, às 24h e às 48h após a adição dos

compostos aos poços. Células não tratadas (*untreated*) e tratadas com os veículos dos compostos (etanol e DMSO) foram utilizadas como controlo. Ao fim das 24h e posteriormente das 48h a largura do risco foi medida, tendo sido medidos três pontos distintos de cada risco, um na parte superior da imagem, outro a meio e outro na parte mais inferior, utilizando o software imageJ.

3.8. Estudo da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante, nomeadamente a atividade com *scavenger* de radicais livres dos compostos, foi avaliada através de um ensaio de DPPH (2,2 difenil-1-picrihidrazil, Sigma-Aldrich).

Numa placa de 96 poços foram adicionados 20 μL de soluções aquosas dos compostos a diferentes concentrações (1-10000 μM). Em cada poço foram adicionados 180 μL de solução etanólica de DPPH de concentração final 90 μM . Uma solução etanólica de quercetina (1-1000 μM), foi usada como controlo positivo do ensaio. A absorvância foi lida a 515 nm recorrendo ao leitor de placas em modo cinético durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Sendo realizados três ensaios independentes com triplicados experimentais. A percentagem de DPPH restante em cada poço, para cada composto, foi calculada.

3.9. Caracterização da atividade em modelos celulares por HPLC

As amostras de modelos celulares, nomeadamente sobrenadantes e lisados celulares, obtidas em experiências anteriores foram analisadas usando o método de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- abreviatura do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) como descrito em Teixeira, 2017 (Teixeira et al., 2017) A análise foi efetuada utilizando o sistema de HPLC Hitachi LaChrome Elite® (Hitachi High - Technologies Corporation, Tóquio, Japão) e uma coluna C18 (LiChrospher®100 RP-18, Merck Millipore, Alemanha).

Para realização do ensaio foi preparada uma solução de fase móvel de 0,5% $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ nas proporções 15:15:70. A fase móvel foi filtrada por filtro de membrana de 0,45 μm e sonicada por 30 min.

Foram preparadas soluções padrão a diferentes concentrações (312,5-50000 $\mu\text{g/L}$) a partir de soluções stock de 0,5 g/L de nitrotirosina (3-NT) e de tirosina (TYR) usando como solvente a fase móvel. Neste ensaio foi usado como taxa de fluxo 1 mL/min, a 25°C, com um volume de injeção de 25 μL e detetados em diferentes comprimentos de onda (190-400 nm). As curvas de

calibração e as respectivas equações de regressão, assim como os limites de detecção e de quantificação foram obtidas usando o Excel numa análise de regressão linear.

Para preparação das amostras biológicas e como descrito em Teixeira 2017 foi preparada uma solução de ácido trifluoracético a 15%, sendo adicionado 200 μ L de ácido a cada 200 μ L de amostra, vortexando durante 20 segundos e colocado a centrifugar durante 10 minutos a 8000 rcf. Após terminar a centrifugação o sobrenadante foi recolhido para novos tubos e voltou-se a centrifugar durante 10 minutos a 8000 rcf. No final o sobrenadante foi filtrado e recolhidos para vials. Cromatogramas de amostras e padrões foram analisados a 220nm.

3.10. Análise Estatística

Os resultados apresentados serão sempre o resultado de pelo menos três experiências independentes, realizadas em triplicado e serão expressos com média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram tratados com o software GraphPad Prism versão 10.2.3. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), assim como toda a construção de gráficos necessária. Os valores de IC₅₀ obtidos pela avaliação do efeito citotóxico dos compostos foram calculados através do software GraphPad Prism, aplicando uma regressão não linear do tipo dose-resposta sigmoidal (inclinação variável).

O significado estatístico dos resultados foi analisado por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações foram calculadas pelo teste de Dunnett. Considerou-se valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativos para um grau de confiança de 95%.

4. Resultados

4.1. Caracterização química dos compostos isômeros de *o*-acetilnaftol

Com o objetivo de caracterizar quimicamente os compostos em estudo realizaram-se ensaios de FTIR-ATR e DSC que ajudaram na obtenção de composição química, da estrutura molecular e comportamento térmico dos compostos.

De acordo com o espectro apresentado na Figura 3 para os dois isômeros, os derivados de naftaleno exibem uma banda de intensidade média na região de 1620-1580 cm^{-1} , além de bandas adicionais próximas a 1515 cm^{-1} e 1395 cm^{-1} . O grupo O-H quelado, como a ligação de hidrogênio intramolecular presente nos dois compostos, manifesta-se por um pico largo na região de 3200-2500 cm^{-1} , característico desse tipo de interação.

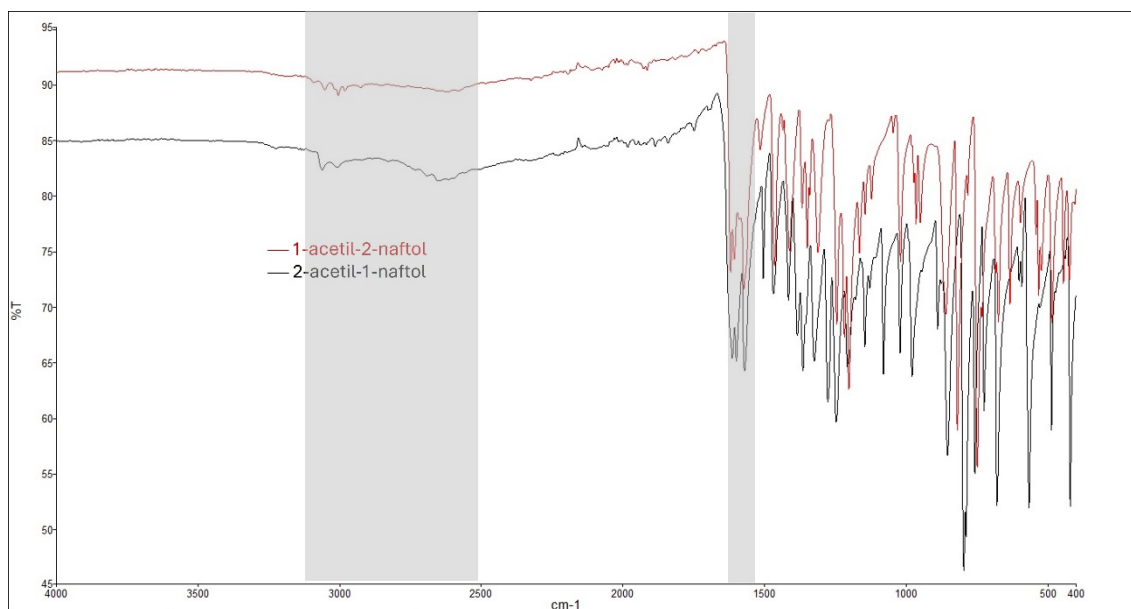


Figura 3: Espectros de infravermelho obtidos para os isômeros 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol utilizando 20 scans.

O DSC também possibilita a determinação das entalpias associadas a essas transições térmicas, fornecendo informações detalhadas sobre as propriedades termodinâmicas do composto. A temperatura de fusão do 2-acetil-1-naftol (Figura 5) é aproximadamente 373,15 K, enquanto, para o 1-acetil-2-naftol, é 338,15 K. No segundo ciclo de aquecimento do 1-acetil-2-naftol, observa-se um pico de cristalização a frio, conforme mostrado na curva de DSC da Figura 4. Durante a cristalização a frio, que ocorre durante o aquecimento, há liberação de calor à medida que os segmentos moleculares se organizam em uma estrutura cristalina.

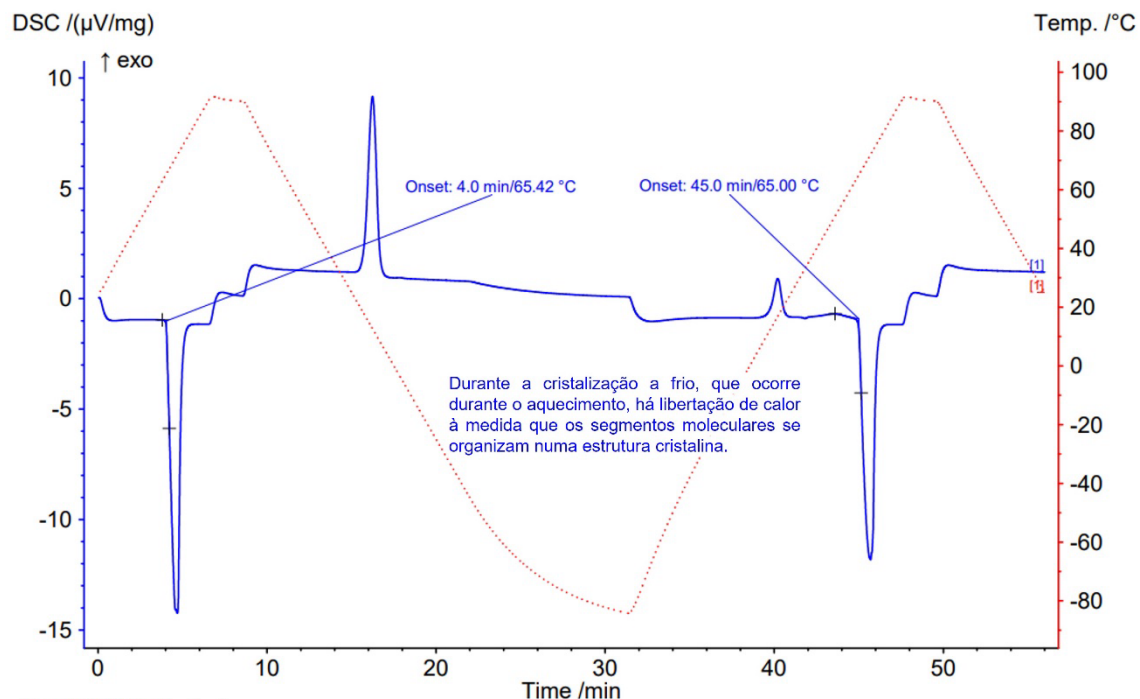


Figura 4: Curva de DSC do 1-acetil-2-naftol

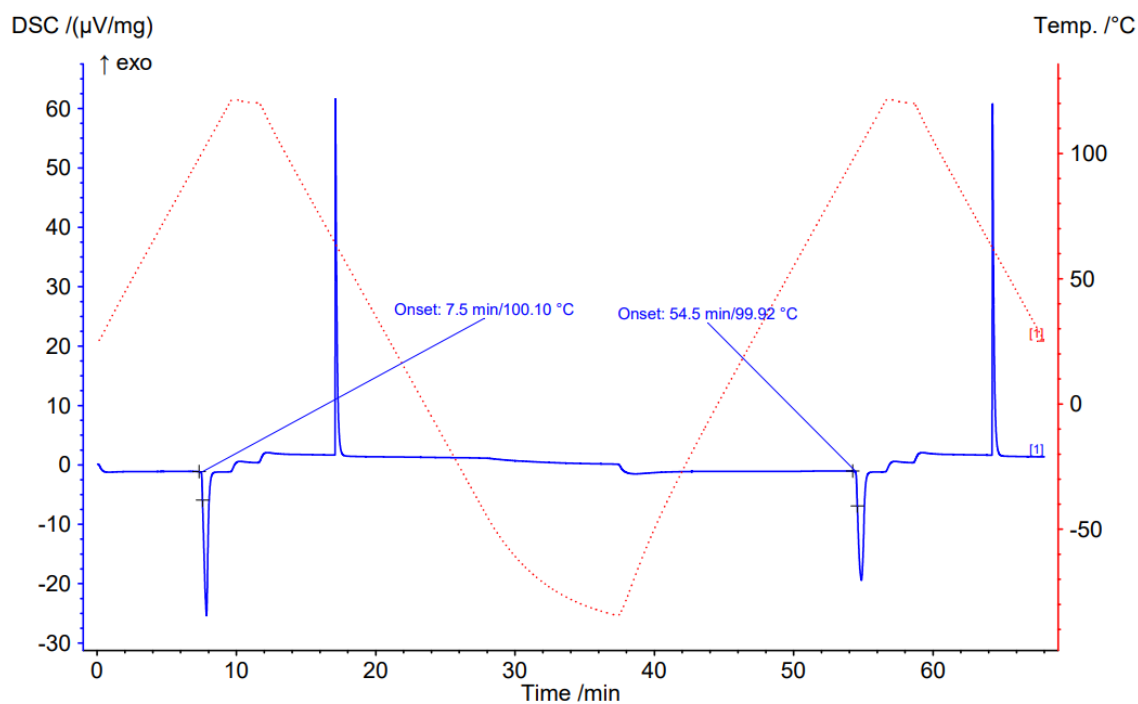


Figura 5: Curva de DSC do 2-acetil-1-naftol.

Com base na análise da forma dos picos de fusão, pode-se afirmar que os compostos apresentavam um elevado estado de pureza, superior a 99,9%. Este elevado grau de pureza foi adicionalmente confirmado por cromatografia gasosa utilizando detetor de ionização em chama (GC-FID), garantindo a consistência dos resultados obtidos.

4.2. Efeito citotóxico dos compostos isómeros de *o*-acetilnaftol em modelos celulares

Com o intuito de determinar o efeito citotóxico dos compostos isómeros de *o*-acetilnaftol recorreu-se ao ensaio colorimétrico de MTT, tendo-se determinado deste modo a viabilidade celular e valores de IC₅₀ para cada composto, em células Caco-2 e HT-29.

Os resultados deste ensaio foram agrupados consoante o tipo celular. Olhando primeiramente para os resultados obtidos nas células Caco-2 (Figura 6) verificamos que mesmo sendo as células tratadas com diferentes compostos em todos eles houve uma diminuição da percentagem de viabilidade celular quando tratadas com a maior concentração de composto. Sendo que o valor de IC₅₀, apresentado na tabela seguinte (tabela 1), mostra que o valor mais baixo foi obtido com células tratadas com o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO, representado na Figura 6B.

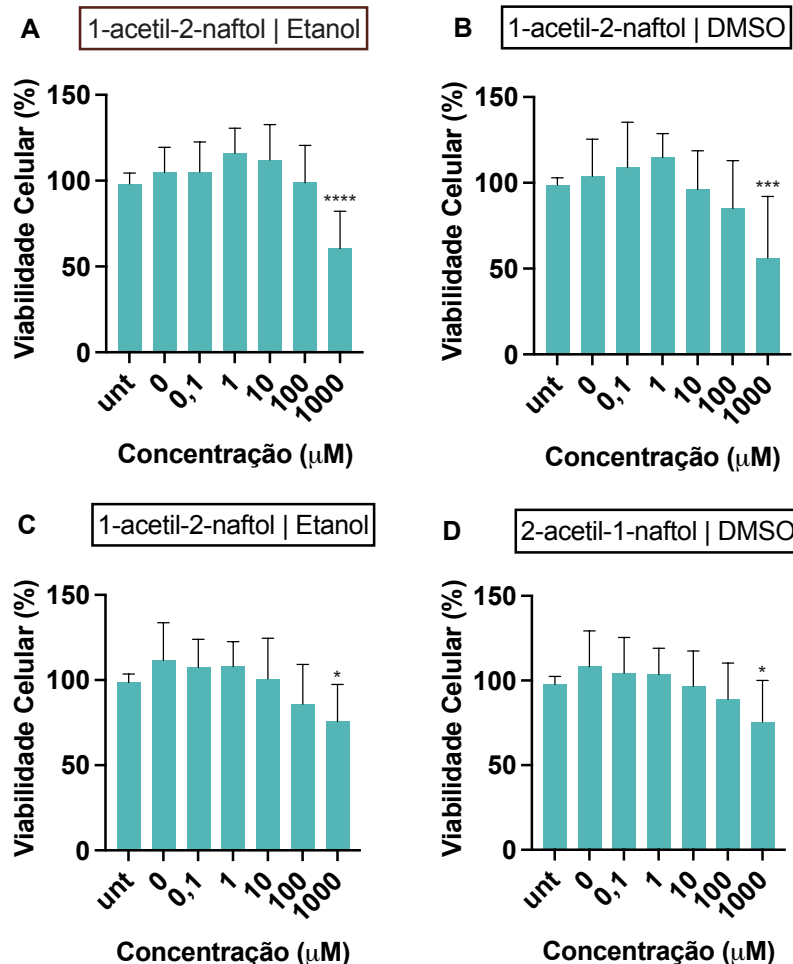


Figura 6: Determinação da viabilidade celular nas células Caco-2 na presença dos compostos através do ensaio de MTT. 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A); 1acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (B); 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (C) e 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (D). Todos os compostos encontram-se em concentrações crescentes. Unt significa células não tratadas (do inglês- *Untreated*) e foram utilizadas como controlo de viabilidade celular. Significância estatística foi testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com as células controlo foram calculadas pelo teste de Dunnet. * p < 0,05; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. Os resultados são expressos como média ± DP de 3 experiências independentes.

Verificando agora os resultados obtidos para as células HT-29 é notório que, tal como nas células Caco-2, existiu uma diminuição da percentagem de viabilidade celular nas células tratadas com a maior concentração de composto (Figura 7). Sendo que o valor de IC_{50} , apresentado na tabela 1, mostra que o valor mais baixo foi obtido com células tratadas com o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO, representado no gráfico da Figura 7B.

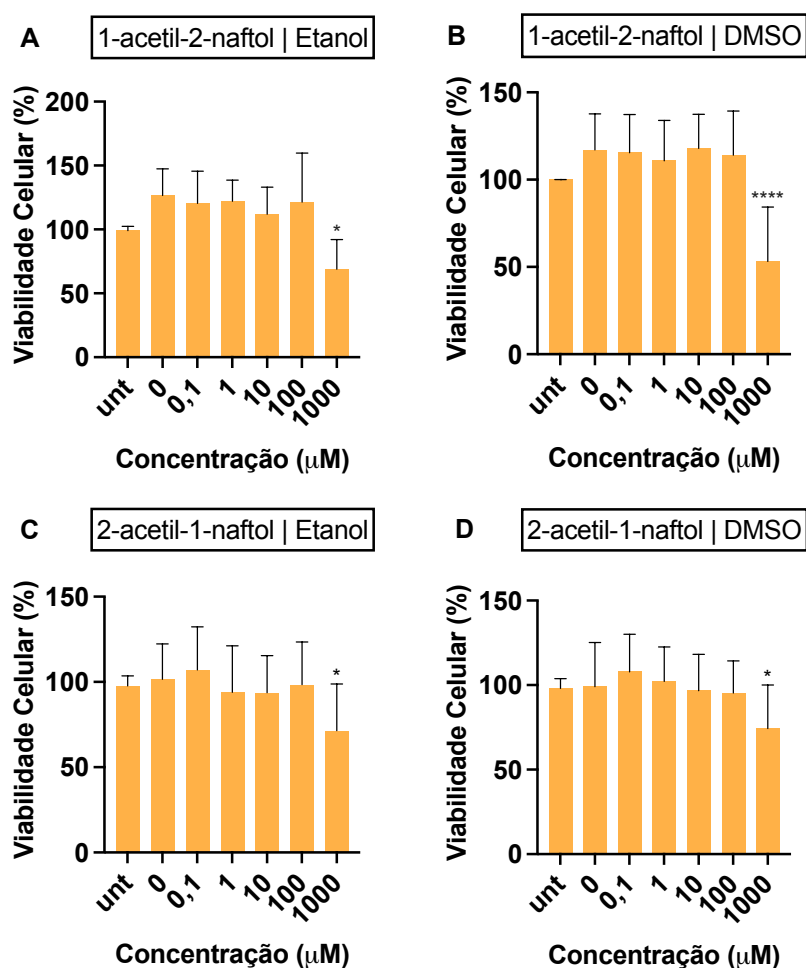


Figura 7: Determinação da viabilidade celular nas células HT-29na presença dos compostos através do ensaio de MTT. 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A); 1acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (B); 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (C) e 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (D). Todos os compostos encontram-se em concentrações crescentes. Unt significa células não tratadas (do inglês- *Untreated*) e foram utilizadas como controlo de viabilidade celular. Significância estatística foi testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com as células controlo foram calculadas pelo teste de Dunnet. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0.0001$. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes.

Tabela 1: IC₅₀ e respectivo desvio padrão calculado para cada composto nas duas linhas celulares, com recurso a software GraphPad Prism

		Caco-2		HT-29	
		IC ₅₀ (μM)	Desvio Padrão	IC ₅₀ (μM)	Desvio Padrão
1-acetil-2-					
naftol		1623,032	391,188	2240,878	853,985
etanol					
1-acetil-2-					
naftol		1180,659	341,585	1436,033	462,446
DMSO					
2-acetil-1-					
naftol		2828,951	894,618	2528,602	858,703
etanol					
2-acetil-1-					
naftol		2877,563	892,366	2859,242	973,297
DMSO					

4.3. Efeito dos isómeros do o-acetilnaftol na proliferação celular

Com objetivo de determinar o efeito dos compostos estudados na proliferação celular foi realizado um ensaio de proliferação celular/migração ou "*wound-healing*" em células Caco-2 e HT-29, na presença e ausência dos isómeros do naftol.

Nas células Caco-2 (Figura 8 e 9) verificou-se que para as células sem tratamento (*untreated*), para as células tratadas apenas com o respetivo veículo e para as células tratadas com a concentração de 1000 μM de composto, em todas houve uma proliferação celular maior às 48h do que às 24h. Sendo que para algumas condições, principalmente, nas células tratadas com 2-acetil-1-naftol dissolvidas em DMSO houve uma elevada morte celular não sendo possível tirar conclusões a nível proliferativo ou inibitório.

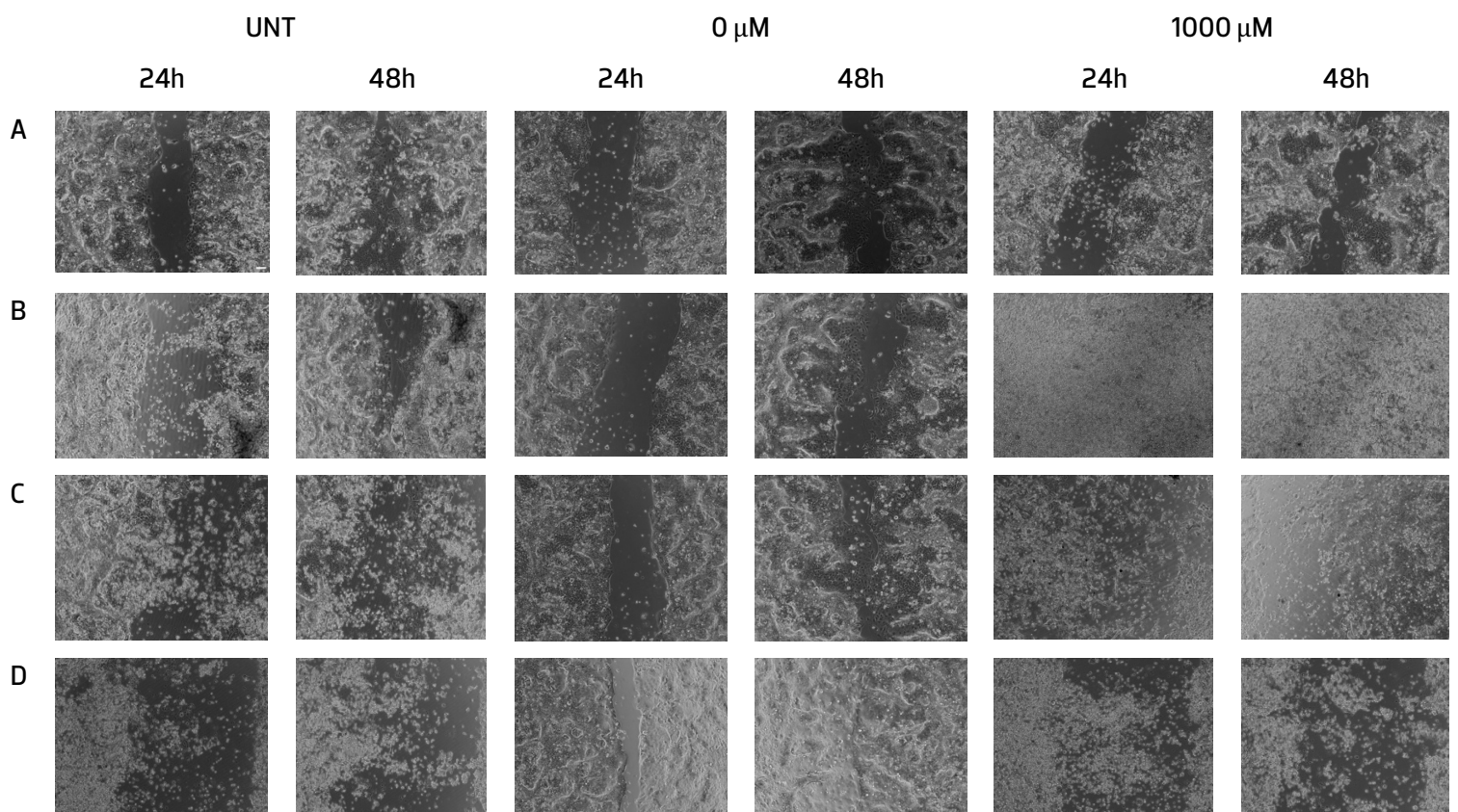


Figura 8: Imagens do ensaio de migração para determinação do efeito dos compostos 1-acetil-2-naftol em etanol (A), 1-acetil-2-naftol em DMSO (B), 2-acetil-1-naftol (C) e 2-acetil-1-naftol (D) na proliferação celular nas células Caco-2 ao final de 24h e 48h. Unt significa células não tratadas (*untreated*). Estão representadas as células apenas tratadas com os solventes (0 μM) e as células tratadas com a maior concentração de composto (1000 μM). Imagens representativas de 2 experiências independentes obtidas com auxílio do microscópio de campo claro na objetiva de 10x. A barra da escala representa 50 μm .

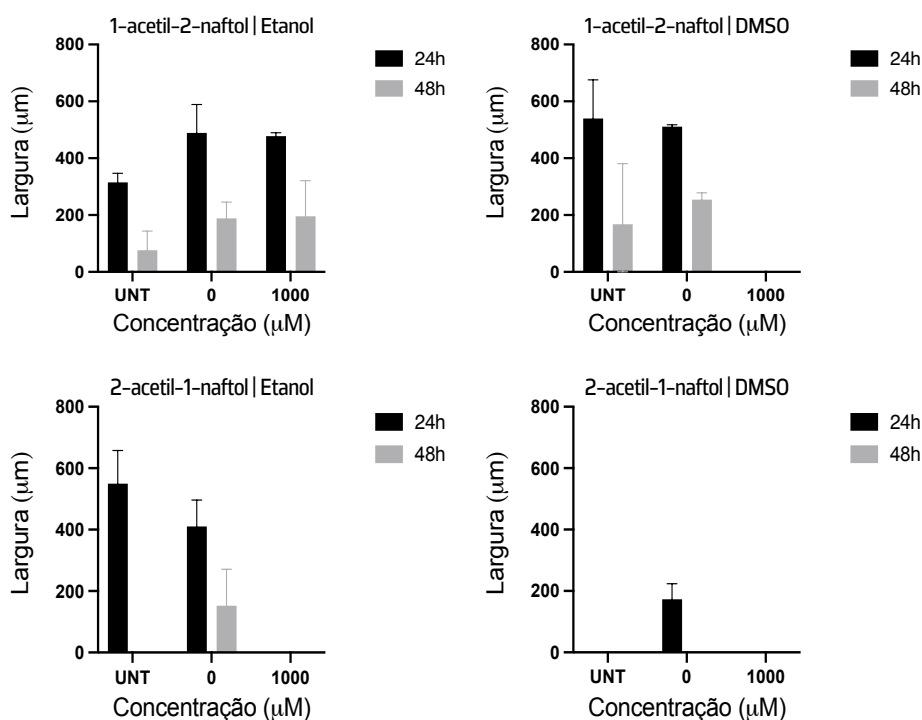


Figura 9: Efeito dos compostos na proliferação celular de Caco-2 às 24h e às 48h. A largura do risco na monocamada de células foi medida ao fim de 24 e 48h em 3 pontos distintos (software FIJI) e representada graficamente. Resultados representativos de 2 experiências independentes. Células não tratadas (unt) foram usadas como controlo. Resultados expressos como média \pm DP.

Nas células HT-29 verificaram-se resultados idênticos ao das células Caco-2, sendo que para as células sem tratamento, para as células tratadas apenas com o respetivo veículo e para as células tratadas com a concentração de 1000 μ M de composto, em todas houve uma proliferação celular maior às 48h do que às 24h (Figura 10 e 11). Sendo que para algumas condições nomeadamente nas células tratadas com maior concentração de composto se verificou uma elevada taxa de morte celular o que não nos permitiu tirar qualquer conclusão.

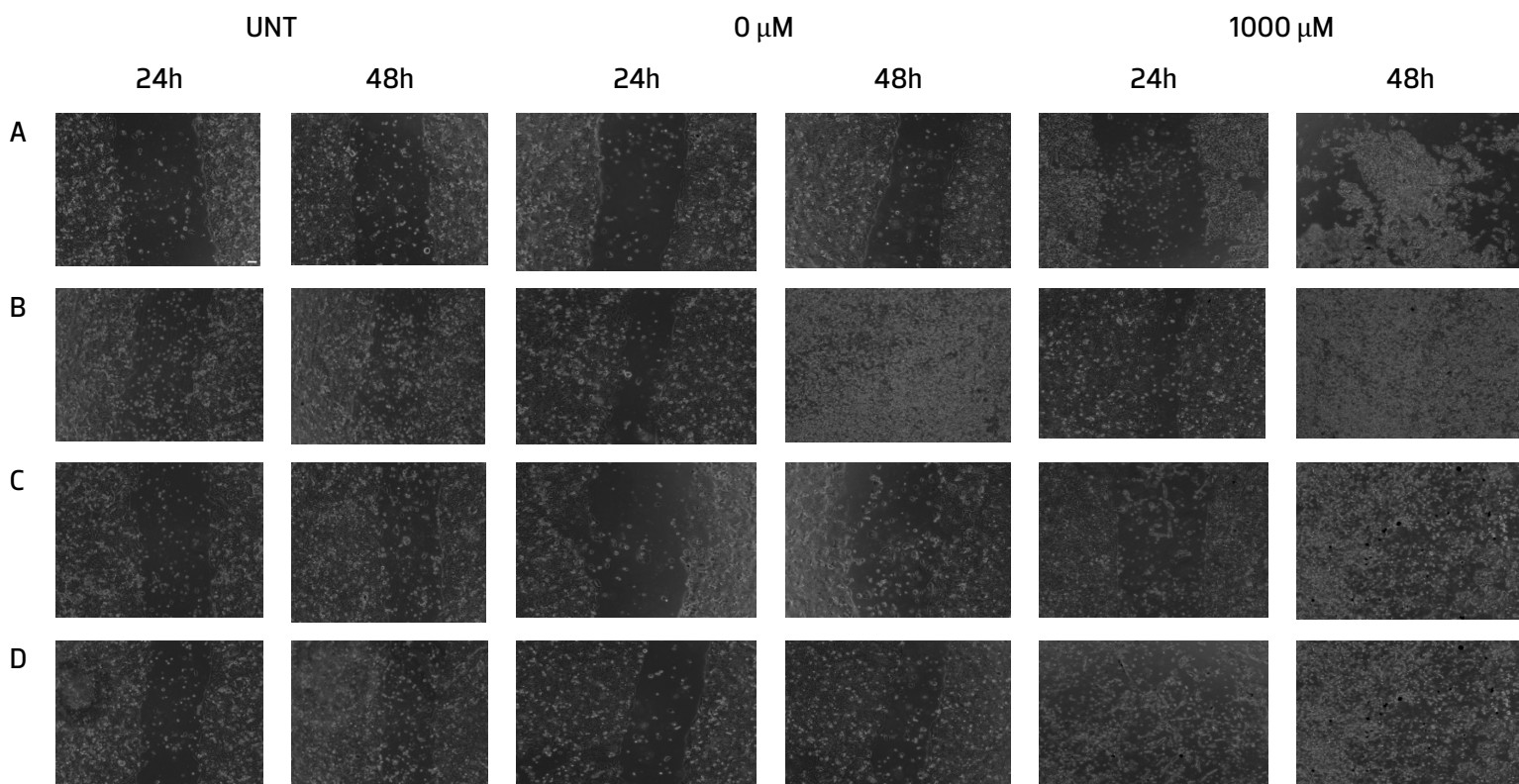


Figura 10: Imagens do ensaio de migração para determinação do efeito dos compostos 1-acetil-2-naftol em etanol (A), 1-acetil-2-naftol em DMSO (B), 2-acetil-1-naftol (C) e 2-acetil-1-naftol (D) na proliferação celular nas células HT-29 ao final de 24h e 48h. Unt significa células não tratadas (*untreated*), usadas como controlo. Estão representadas as células apenas tratadas com os solventes (0 μ M) e as células tratadas com a maior concentração de composto (1000 μ M). Imagens representativas obtidas com auxílio do microscópio de campo claro na objetiva de 10x. A barra da escala representa 50 μ m.

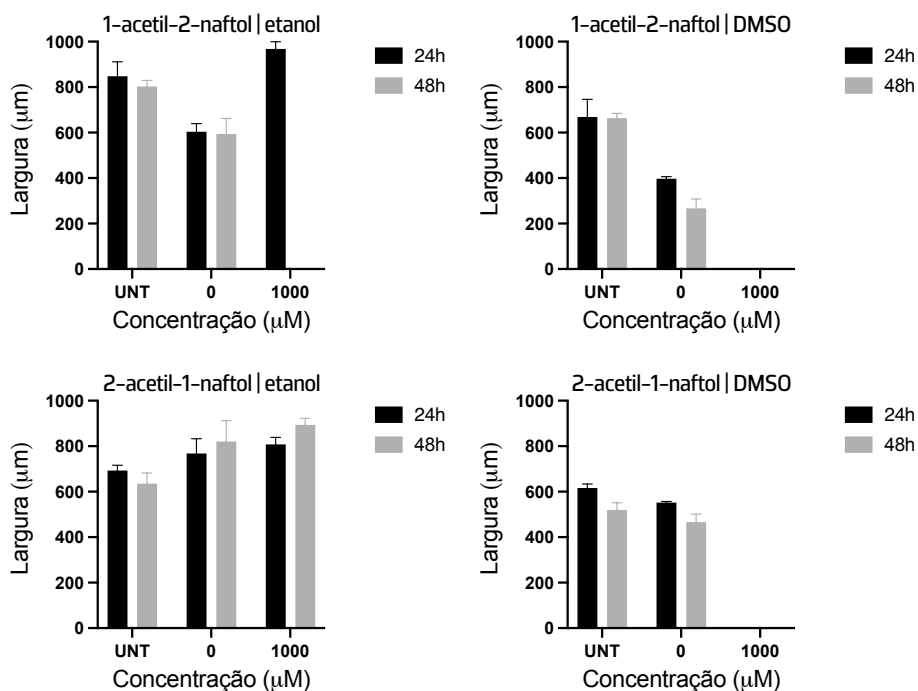


Figura 11: Efeito dos compostos na proliferação celular de HT-29 às 24h e às 48h. A largura do risco na monocamada de células foi medida ao fim de 24 e 48h em 3 pontos distintos (software FIJI) e representada graficamente. Resultados representativos de 2 experiência independentes. Células não tratadas (unt) foram usadas como controlo. Resultados expressos como média \pm DP.

4.4. A atividade antioxidante dos compostos in vitro

Neste ensaio foi avaliada atividade antioxidante dos compostos in vitro recorrendo a um ensaio de DPPH. Como controlo positivo foi usada uma solução etanólica de quercetina, que tal como verificado apresenta um elevado poder antioxidante a baixas concentrações.

Analisando o gráfico dos compostos (Figura 12) podemos verificar que ambos os compostos dissolvidos nos dois solventes, ou seja, para as quatro condições nas concentrações mais elevadas apresentam atividade antioxidante, principalmente na concentração de 10000 μ M.

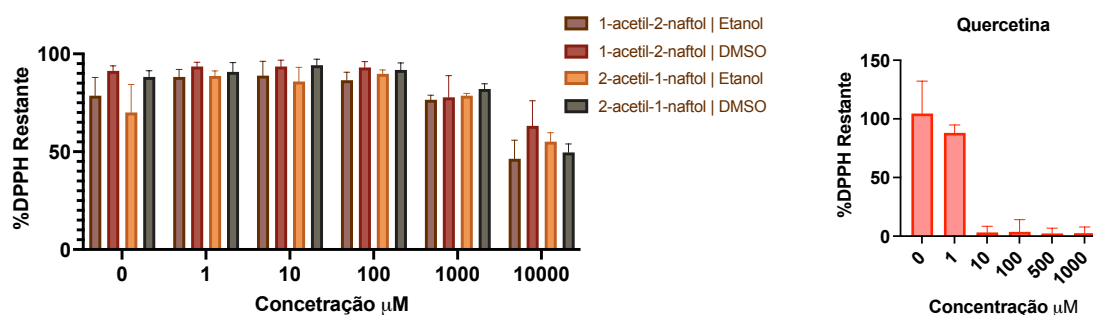


Figura 12: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de compostos (esquerda) e quercetina (direita) (μ M) usadas ao fim de 60 min. A quercetina e os compostos 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol e DMSO; 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol e DMSO foram utilizados em concentrações crescentes. A quercetina funcionou como controlo do ensaio. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes.

Para o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (Figura 13) verificou-se uma diminuição significativa da percentagem de DPPH na concentração de 10000 μM , enquanto noutras concentrações se verificou um aumento e noutras um ligeiro decréscimo desta percentagem à medida que a concentração de composto aumentava.

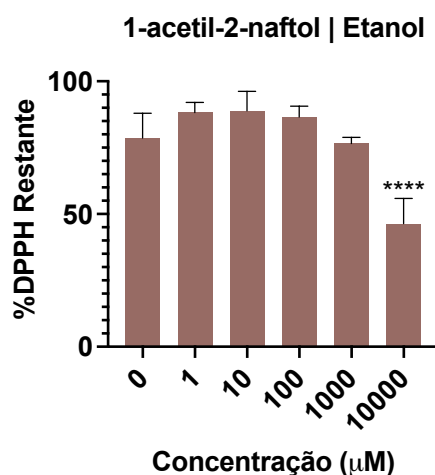


Figura 13: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (μM) usadas ao fim de 60 min. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes. Significância estatística testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com as células tratadas apenas com o solvente (0 μM) foram calculados pelo teste de Dunnett. **** $p < 0,0001$.

Para o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (Figura 14) verificou-se uma diminuição significativa da percentagem de DPPH nas concentrações de 1000 μM e de 10000 μM , sendo que para as outras concentrações mais baixas este valor se manteve praticamente igual ao das células não tratadas.

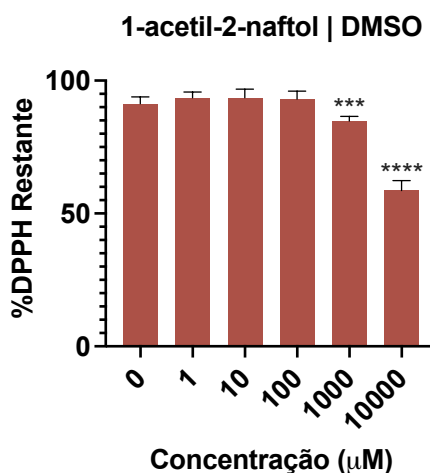


Figura 14: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (μM) usadas ao fim de 60 min. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes. Significância estatística testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com as células tratadas apenas com o solvente (0 μM) foram calculados pelo teste de Dunnett, *** $p = 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

Para o composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (Figura 15) verificou-se uma diminuição significativa da percentagem de DPPH na concentração mais elevada de 10000 μM , sendo que para as outras concentrações mais baixas se verificou uma ligeira subida na percentagem de DPPH.

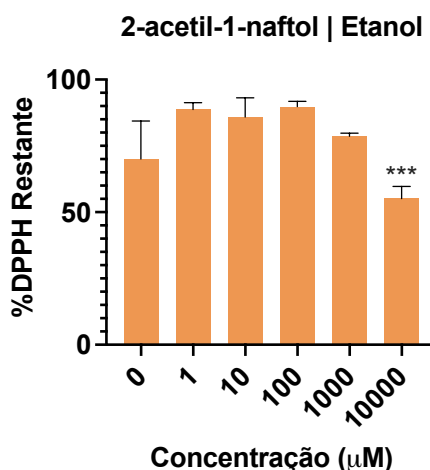


Figura 15: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (μM) usadas ao fim de 60 min. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes. Significância estatística testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com as células tratadas apenas com o solvente (0 μM) foram calculados pelo teste de Dunnett. **** $p=0,0009$.

Para o composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (Figura 16) verificou-se uma diminuição significativa da percentagem de DPPH na concentração mais elevada de 10000 μM , sendo que para as outras concentrações mais baixas se verificou que não existiu qualquer diminuição relevante desta percentagem.

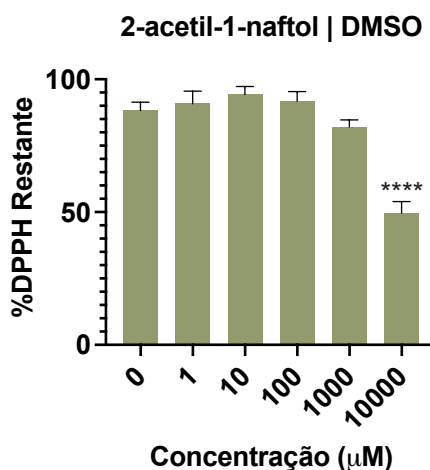


Figura 16: Percentagem de DPPH restante obtido para as concentrações de 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (μM) usadas ao fim de 60 min. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experiências independentes. Significância estatística testada por one-way ANOVA e valores de p individuais para as comparações com as células tratadas apenas com o solvente (0 μM) foram calculados pelo teste de Dunnett. **** $p<0,0001$

4.5. Impacto do isómeros do *o*-acetilnaftol no metabolismo celular

No sentido de avaliar o impacto destes derivados do naftol no metabolismo celular, foram analisados meios condicionados e lisados celulares de células Caco-2 e HT-29 tratadas e não tratadas com os isómeros a diferentes concentrações, por HPLC. Neste ensaio recorreu-se a um protocolo previamente validado e estabelecido no laboratório, para a determinação de tirosina e nitro-tirosina em amostras biológicas (Teixeira et al., 2017) . O método foi validado através da construção das curvas de calibração para a tirosina e nitro-tirosina, e determinação da linearidade, tempo de retenção, limite de deteção e limite de quantificação respetivos (Figura 17 e Tabela 2).

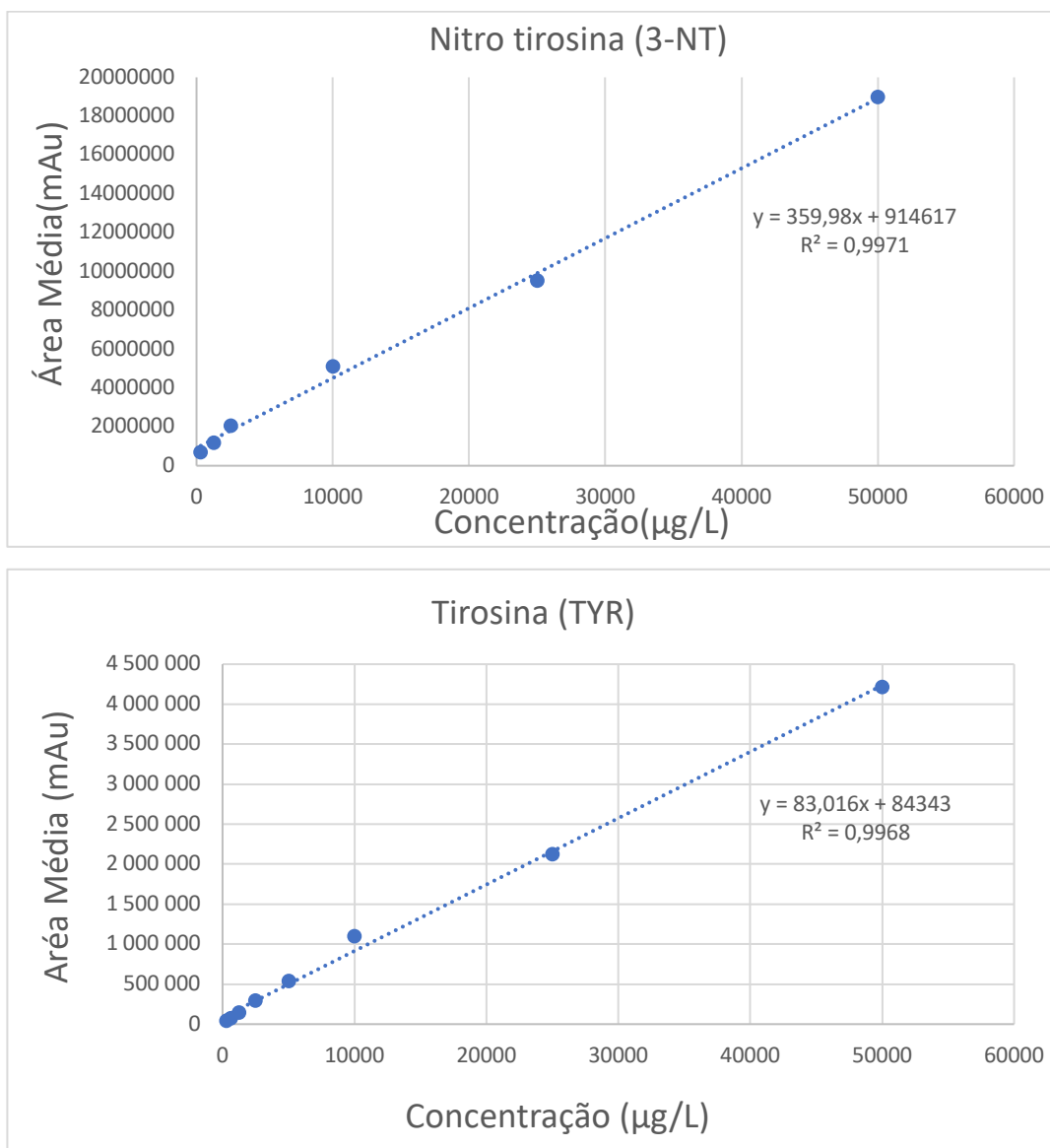


Figura 17: Curva de calibração da Nitro-tirosina (em cima) e da Tirosina (em baixo). Os pontos correspondentes ao padrão 2 e padrão 5 da nitro-tirosina não foram considerados para a construção da curva de calibração por apresentarem área média discrepante relativamente aos restantes padrões. Estão representadas as equações de regressão e os coeficientes de correlação respetivos. Os dados foram tratados utilizando o Excel.

Tabela 2: Representação do limite de detecção, do limite de quantificação, do tempo de retenção, do coeficiente de correlação e da equação de regressão da nitro-tirosina e tirosina.

	3-NT	TYR
Limite de Detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2052,26	1547,90
Limite de Quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6218,95	4690,59
Tempo de Retenção	$3,55 \pm 0,01$	$8,07 \pm 0,01$
Coeficiente de Correlação	0,99	0,99
Equação de regressão	$Y=359,98X+914617$	$Y=83,02X+84343$

Numa primeira análise, não se verificou qualquer presença dos padrões de tirosina ou nitro-tirosina em nenhuma das amostras analisadas.

No entanto, a análise dos espectros obtidos mostrou a presença de picos cujo padrão de frequência e intensidade variam de acordo com a presença e ausência de tratamento com os isômeros de *o*-acetilnaftol. Estes picos, verificou-se que correspondiam aos tempos de retenção obtidos para os isômeros de *o*-acetilnaftol analisados isoladamente com tempos de retenção de 3,77 para o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol, de 2,95 para o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO, de 1,27 para o composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol e 2,95 para o composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (Figura 18).

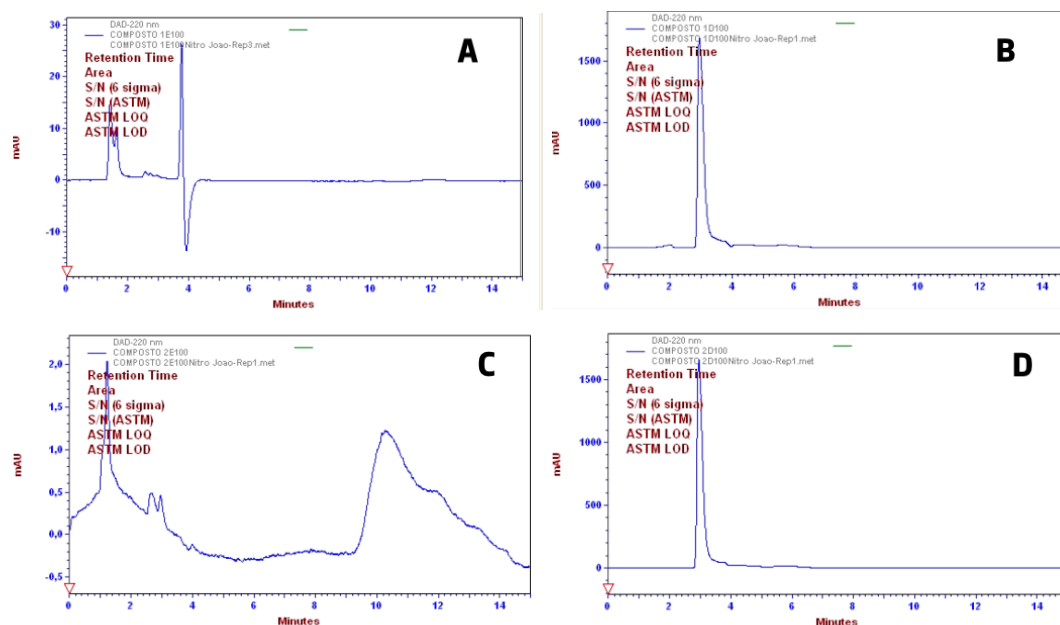


Figura 18: Representação dos cromatogramas dos dois compostos dissolvidos em diferentes solventes. Cromatograma representativo do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A); Cromatograma representativo do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO (B); Cromatograma representativo do composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol (C); Cromatograma representativo do composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (D).

Assim foi realizada uma análise dos cromatogramas direcionada para a identificação da presença ou ausência dos picos correspondentes aos isômeros de *o*-acetilnaftol nas amostras correspondentes aos lisados celulares e aos respectivos meios condicionados.

Nas células HT-29, o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido tanto em etanol como em DMSO mostrou que, possivelmente, em concentrações mais baixas, nomeadamente, na concentração de 10 μ M este se liga na totalidade às células com pico aos 3,75 minutos enquanto na concentração mais elevada, 100 μ M, o composto aparece apenas no meio condicionado com pico aos 3,75 minutos e não nas células, justificado pela possibilidade de em concentrações elevadas de composto existir morte celular num período de incubação de 48h (Figura 19).

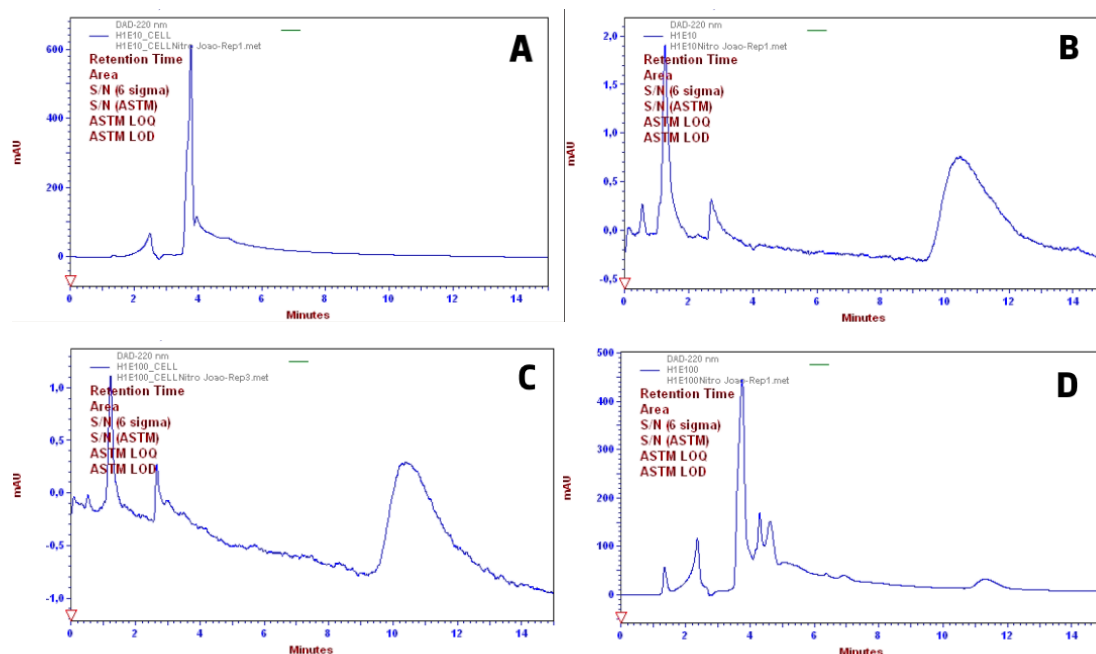


Figura 19: Representação dos cromatogramas das células HT-29 tratadas com a concentração de 10 μ M do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A) e do respetivo meio condicionado (B) e das células tratadas com concentração de 100 μ M do composto dissolvido em etanol (C) e do respetivo meio condicionado (D).

Analisando o composto 2-acetil-1-naftol nestas mesmas células, os resultados já diferem, pois neste composto independentemente do solvente verificou-se que na concentração mais alta de 100 μ M o composto se encontrava nas células com pico aos 3,05 minutos. Para concentrações mais baixas deste composto verificou-se que o composto aparecia representado tanto no meio condicionado como nas células (Figura 20).

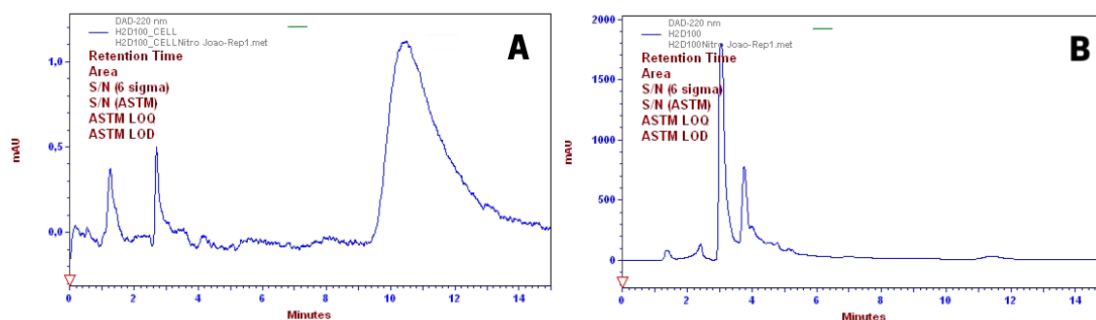


Figura 20: Representação dos cromatogramas das células HT-29 tratadas com a concentração de 100 μM do composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em DMSO (A) e do respetivo meio condicionado(B).

Para células Caco-2, o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol mostrou que, possivelmente, estaria presente nas células, assim como, no respetivo meio condicionado na concentração de 1 μM com pico aos 3,75 minutos, não apresentando outro resultado relevante tanto para etanol como para DMSO (Figura 21).

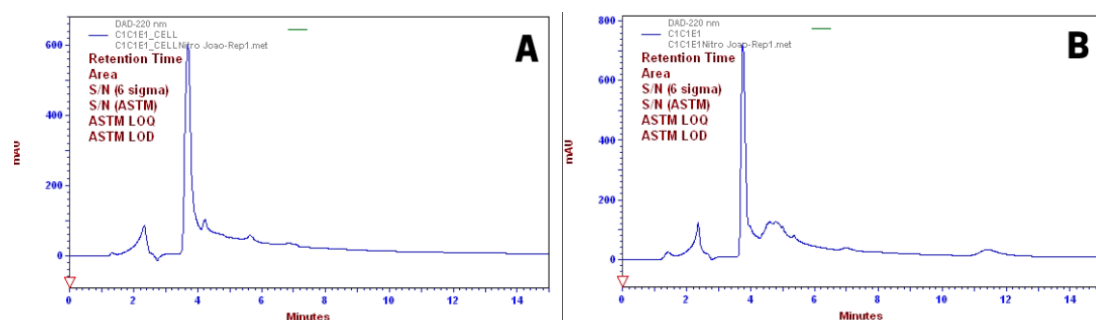


Figura 21: Representação dos cromatogramas das células Caco-2 tratadas com a concentração de 1 μM do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol (A) e do respetivo meio condicionado(B).

Nestas células, nomeadamente, nas células tratadas com o composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol conseguimos um dos resultados mais interessantes verificando-se que houve uma redução de um pico que aparecia por volta dos 3,0 minutos, diminuindo a intensidade do pico à medida que a concentração de composto aumenta (Figura 22).

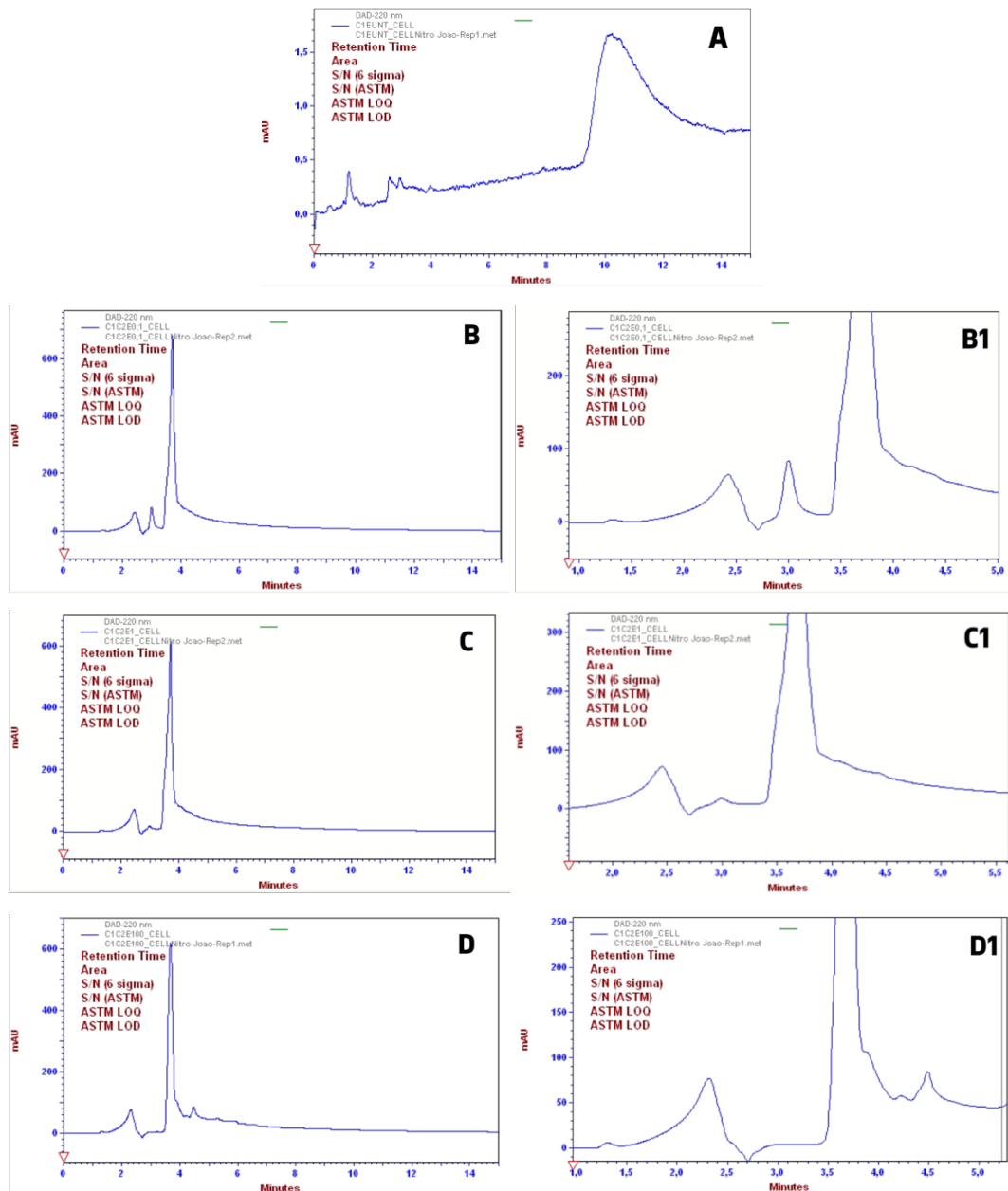


Figura 22: Representação dos cromatogramas do meio condicionado das células Caco-2 tratadas com as concentrações crescentes do composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol. Células *untreated* (A). Concentração 0,1 μM de composto (B e B1, ampliação de B); Concentração 1 μM de composto (C e C1 ampliação de C); Concentração 100 μM de composto (D e D1 ampliação de D).

5. Discussão

Este trabalho tinha como objetivo definir uma caracterização química e biológica dos dois compostos isómeros do naftol, o 1-acetil-2-naftol e o 2-acetil-1-naftol, com intuito de determinar um possível potencial biotecnológico e terapêutico. Para isso foi realizada uma caracterização química dos compostos seguida de uma caracterização biológica na qual foram usados ensaios *in vitro* e em modelos celulares.

A caracterização química dos isómeros estudados consistiu na realização de dois ensaios: o ensaio de FTIR-ATR e o ensaio de DSC, que permitiram a obtenção de aspetos importantes como a composição química, a estrutura molecular e o comportamento térmico dos compostos estudados para uma caracterização completa. Posteriormente foi realizada uma cromatografia gasosa utilizando detetor de ionização em chama de modo a confirmar o elevado estado de pureza dos compostos.

A caracterização biológica em modelos celulares foi realizada com recurso às linhas Caco-2 e HT-29, através de três ensaios distintos: o ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT) de forma a avaliar o efeito citotóxico dos compostos nos modelos celulares em estudo, o ensaio de migração (*wound-healing*) usado para determinar o efeito dos compostos na proliferação celular, e uma análise de meios condicionados e lisados celulares por HPLC para determinar o impacto destes isómeros no metabolismo celular.

Além disso foi realizado um ensaio da atividade antioxidante (DPPH) *in vitro* com objetivo de avaliar a possível atividade antioxidante dos compostos em estudo.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada usando um ensaio colorimétrico de MTT, que consiste na redução do MTT de cor amarelada, através das desidrogenases mitocondriais para cristais de formazan de cor roxa, algo que só acontece nas células vivas (Patravale et al., 2012). De acordo com a literatura compostos derivados dos naftóis apresentaram para ensaios de MTT valores reduzidos de IC₅₀ mostrando-se com potencial para induzir a apoptose e referidos como potenciais compostos anticancerígenos (Kaur et al., 2019).

Os resultados deste ensaio foram analisados consoante o tipo celular, tendo se verificado que para as células Caco-2 tratadas com ambos os compostos e independentemente do solvente onde foram dissolvidos, apresentavam uma diminuição da percentagem de viabilidade celular quando tratadas com a maior concentração de composto.

Verificou-se então que o resultado mais variável foi do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO em que obtivemos o IC₅₀ mais baixo, mas ainda assim sendo apenas um valor estimado de IC₅₀ pois no range de concentrações estudadas não conseguimos um valor concreto de IC₅₀. Olhando para os gráficos dos resultados obtidos podemos verificar que nas concentrações mais baixas, principalmente, de 0 µM, ou seja células tratadas apenas com os solventes, 0,1 µM e 1 µM que existe um pequeno aumento da percentagem de viabilidade celular, facto que não foi explorado neste estudo, sendo que o objetivo deste trabalho passava por verificar em que concentrações existia uma diminuição da percentagem de viabilidade celular. Foram também obtidos resultados em que existia uma ligeira diminuição da percentagem da viabilidade celular nas concentrações de 10 µM e 100 µM, mas diminuição essa que não foi tomada como relevante tendo em conta os desvios padrões.

Para as células HT-29 os resultados obtidos foram notoriamente idênticos aos resultados obtidos nas células Caco-2 tendo se verificado uma diminuição significativa da percentagem de viabilidade celular na concentração mais elevada de 1000 µM e tal como no outro tipo celular estudado foi nas células HT-29 tratadas com o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO que se verificou o valor de IC₅₀ mais baixo. Nestas mesmas células tratadas com as concentrações mais baixas de compostos, incluindo a concentração de 100 µM ao contrário do outro tipo celular em estudo, voltou-se a verificar um ligeiro aumento da percentagem de viabilidade celular não tendo sido tomado como relevante para o objetivo do nosso trabalho.

Podemos então concluir que tanto para as células Caco-2 como para as células HT-29 o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO é aquele que apresenta maior toxicidade celular dentro do range de concentrações estudado neste trabalho, sendo o que apresenta um valor de IC₅₀ mais baixo. Estes valores elevados de IC₅₀ significam que até nas maiores concentrações os compostos independentemente do solvente onde foram dissolvidos são pouco tóxicos e por isso podem ser usados como ferramentas biotecnológicas. Todos estes resultados de MTT foram obtidos às 24h após incubação com os compostos, olhando para os resultados obtidos noutras ensaios realizados neste trabalho e vendo um efeito diferente nas células às 48h seria interessante ter realizado um ensaio de MTT com visualização às 48h, e comparando com a literatura que ajuda a evidenciar a necessidade da realização de novos ensaios, foram em alguns ensaios com a mesma família obtidos resultados que mostraram um potencial anticancerígeno, associado à elevada citotoxicidade verificada nestes compostos (Kaur et al., 2019).

Com o intuito de estudar a possibilidade de os compostos terem um efeito na proliferação celular foi realizado um ensaio de migração nas duas linhas celulares, Caco-2 e HT-29. Para resultados deste ensaio foram adquiridas imagens das células às 24h e às 48h após incubação com os isômeros do naftol em concentrações crescentes e quantificada a proliferação/migração celular. Após análise dos resultados verificou-se que para as concentrações mais baixas de composto (0,1; 1; 10 e 100 μM) não apresentavam diferenças significativas relativamente ao efeito do veículo (etanol e DMSO) pelo que são apresentados os resultados obtidos para a concentração de 1000 μM . Células sem tratamento (*untreated*) são usadas como controlo.

Os resultados obtidos mostram diferenças do efeito na proliferação celular entre compostos e/ou solvente e para o mesmo composto entre linhas celulares.

Nas células Caco-2 verificamos que nas células sem tratamento, nas células tratadas com o respetivo veículo e nas células tratadas com o máximo de concentração estudada (1000 μM), houve uma diferença notória entre as fotos tiradas às 24h e às 48h, sendo que se verificou um aumento da proliferação celular. Nas células HT-29 verificamos resultados idênticos aos resultados obtidos na outra linha celular verificando-se que para todas condições analisadas (células não tratadas, células tratadas apenas com solventes e células tratadas com 1000 μM de composto) se verificou uma proliferação celular das 24 para as 48 horas.

De referir que em algumas condições se verificou a existência de morte celular, principalmente, nas células tratadas com os compostos às 48h o que tornou impossível a análise e medição da largura do risco.

Destes resultados podemos retirar que se verificou uma diminuição mais acentuada na largura do risco e, por sua vez, um aumento da proliferação celular nas células tratadas apenas com os solventes, podendo desconfiar que o efeito proliferativo verificado nas células tratadas com os compostos, possivelmente, se deve ao solvente em que os compostos foram dissolvidos.

Os resultados obtidos neste trabalho foram concordantes com a literatura, onde em ensaios de proliferação celular mas realizados utilizando outra metodologia se verificou uma proliferação celular tanto em células tratadas com os compostos como em células não tratadas (Kapuci et al., 2014).

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos estudados neste trabalho é importante, uma vez que tal como referido na introdução, o stress oxidativo, que é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade do organismo em neutralizar estas

espécies através da atividade antioxidante, desempenha um papel fundamental na ativação da inflamação(Furukawa et al., 2004). Os naftóis apresentam diversas atividades biológicas já conhecidas e sendo uma delas a atividade antioxidante(Freitas & Silva, 2020). Para tal foi realizado um ensaio in vitro de DPPH, que é um radical livre estável solúvel em etanol que na presença de antioxidantes se reduz em DPPH-H, o que leva à alteração da sua cor de violeta para amarelo numa absorbância de 515 nm (Rashed et al., 2016).

A quercetina foi utilizada como controlo positivo que tal como podemos verificar através da visualização do gráfico da Figura 12, apresenta elevada atividade antioxidante com uma redução da percentagem de DPPH muito significativa logo a partir das concentrações mais baixas de 1 μM e na concentração de 10 μM a percentagem já era praticamente nula, o que serviu para validar este método.

Atendendo à análise estatística obtida nos resultados dos compostos podemos afirmar que, estes resultados apesar de analisados isoladamente e tratados com compostos distintos e dissolvidos ambos tanto em etanol como em DMSO, a maior diminuição da percentagem de DPPH verificada foi obtida na maior concentração de composto (10000 μM) para todas as condições celulares testadas e em quase todo eles, à exceção do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO que também se verificou uma ligeira diminuição significativa na concentração de 1000 μM , foi esta concentração a única a verificar resultados significativos. Em todos os gráficos dos compostos como por exemplo no gráfico representado na figura 13 podemos verificar ligeiros aumentos da percentagem de DPPH, algo que não foi tomado como relevante, sendo para o âmbito deste trabalho mais interessante focar nas possíveis diminuições das percentagens de DPPH devido ao constrangimento de tempo não existiu a possibilidade de testar estes aumentos podendo, possivelmente, ser testado utilizando outro tipo de ensaio.

Apesar do resultado obtido sobre uma potencial atividade antioxidante destes compostos, haverá a necessidade de realizar outros ensaios de atividade antioxidante que possam clarificar esta atividade e ir de encontro a ensaios já realizados e descritos na literatura que mostram excelentes resultados de compostos desta mesma família em ensaios de DPPH e que provam o potencial antioxidante esperado para os compostos isómeros do naftol (Huong et al., 2023).

Com o objetivo de analisar o impacto dos compostos utilizados neste trabalho no metabolismo celular foram através de uma análise por HPLC analisados os lisados celulares e os respetivos meios condicionados de cada uma das células em estudo.

Foi então realizada a análise estatística da tirosina e da nitro-tirosina que funcionaram como controlo e como validação do método construindo as curvas de calibração e determinando a linearidade, o limite de deteção, o limite de quantificação e o tempo de retenção. Analisando a curva de calibração tanto da tirosina como da nitro-tirosina e os respetivos coeficientes de correlação (R^2) verificamos que o método foi validado obtendo-se valores de R^2 muito aproximados de 1. Foram também obtidos valores de tempo de retenção para a tirosina de $8,07 \pm 0,01$ e de $3,55 \pm 0,01$ para nitro-tirosina.

Inicialmente foram analisadas apenas os compostos em estudo à concentração de $100 \mu\text{M}$ para determinação do tempo de retenção de cada composto dissolvidos tanto em etanol como em DMSO, tendo-se valores de tempo de retenção de 3,77 para o composto 1-acetil-2-naftol em etanol, 2,95 para o composto 1-acetil-2-naftol em DMSO, 1,27 para o composto 2-acetil-1-naftol em etanol e 2,95 para o composto 2-acetil-1-naftol em DMSO.

Posteriormente, foram analisados os lisados celulares e os meios condicionados dos diferentes tipos celulares tendo se obtido resultados distintos. Apenas foram documentados os resultados que considerámos mais relevantes da experiência.

Nas células HT-29, o composto 1-acetil-2-naftol dissolvido tanto em etanol como em DMSO demonstrou que possivelmente em concentrações mais baixas de composto como a concentração de $10 \mu\text{M}$, este se apresentava ligado em grande parte à fração celular enquanto que nas maiores concentrações estudadas, ou seja, de $100 \mu\text{M}$ os compostos apareciam apenas no sobrenadante, facto justificável pelo facto de, possivelmente, a essas concentrações às 48h as células estavam mortas o que poderá ter levado à perda de material biológico. O composto 2-acetil-1-naftol demonstrou resultados distintos e contraditórios sendo que neste composto na maior concentração de $100 \mu\text{M}$ se encontrava nas células e na concentração mais baixa de $10 \mu\text{M}$ estava representado no sobrenadante.

Nas células Caco-2 obtiveram-se resultados distintos para os diferentes compostos. No composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em etanol foi verificado que possivelmente havia presença do composto tanto nas células como no sobrenadante na concentração de $1 \mu\text{M}$, sendo o único resultado relevante deste composto nestas células.

Já nas células Caco-2 tratadas com o composto 2-acetil-1-naftol dissolvido em etanol obtivemos os resultados mais interessantes deste ensaio e notoriamente os mais relevantes para estudos futuros, nomeadamente, nos lisados celulares onde se verificou a existência de um pico com tempo de retenção de 3,0 minutos na concentração de $0,1 \mu\text{M}$ de composto e que à medida que

se foi aumentando a concentração deste mesmo composto este pico foi desaparecendo , sendo que na concentração mais elevada já não existia, o que deixa a possibilidade deste composto interferir com o metabolismo celular, alterando o perfil cromatográfico, pois estes resultados foram apenas verificados nos lisados celulares ,ou seja, quando o composto se encontrava ligado à célula.

Já foram realizados outros ensaios idênticos ao ensaio descrito, sendo testada a mesma família de compostos onde foi validado o método e onde foram obtidos resultados que determinaram que o etanol se apresentou como o melhor solvente para dissolver os compostos (Sajkowski et al., 2023).

6. Conclusão

O trabalho desenvolvido detinha como principal objetivo estabelecer uma caracterização química e determinar a atividade biológica de dois compostos isômeros de *o*-acetilnaftol em modelos celulares, nomeadamente células HT-29 e Caco-2. Os resultados da caracterização química permitiram obter uma caracterização completa e precisa dos compostos e confirmar o estado de pureza dos mesmos. Com base nos resultados obtidos no ensaio colorimétrico de MTT conseguimos concluir que para as duas linhas celulares se verificou uma diminuição da viabilidade celular nas células tratadas com a concentração de 1000 μM de composto. O valor de IC_{50} do composto 1-acetil-2-naftol dissolvido em DMSO foi o valor mais baixo calculado, não sendo mesmo assim um valor que possa comprometer 50% das células às concentrações testadas. No ensaio de migração para testar o efeito dos compostos na proliferação celular, tendo em conta o aumento da proliferação verificada nas células tratadas com 1000 μM de composto, nas células tratadas apenas com solvente e nas células não tratadas e sendo nas células tratadas apenas com os solventes onde se verificou uma proliferação mais acentuada, podemos concluir que, possivelmente, o efeito proliferativo verificado nas células tratadas com composto se deva ao solvente em que os compostos foram dissolvidos. Quanto ao ensaio de atividade antioxidante (DPPH) concluímos que tanto o composto 1-acetil-2-naftol como o composto 2-acetil-1-naftol independentemente do solvente onde foram dissolvidos mostraram ter um efeito antioxidante significativo quando usados na concentração de 10000 μM . Por outro lado, na análise dos lisados celulares e dos respetivos meios condicionados realizado por HPLC, para além de determinarmos os tempos de retenção dos compostos estudados conseguimos concluir que o composto 1-acetil-2-naftol em baixas concentrações se ligava em grande parte à fração celular e que o composto apresentava um poder inibitório verificando-se a diminuição de um pico existente no tempo de retenção de 3,0 minutos à medida que a concentração deste composto aumentava. Dado aos resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular seria interessante realizar outros ensaios idênticos com a possibilidade de estudar outras concentrações de composto e avaliar o efeito citotóxico dos compostos às 48h, de modo a poder justificar a morte celular verificada no ensaio de migração das células quando tratadas com os compostos às 48h e garantir uma credibilidade dos resultados obtidos neste ensaio. No ensaio de DPPH seria interessante realizar ensaios de modo a encontrar justificação para o aumento de percentagem de DPPH verificada nas concentrações mais baixas de composto, obtendo-se uma análise fidedigna. Para a análise

dos lisados celulares e dos meios condicionados por HPLC haveria interesse de repetir o ensaio de modo a confirmar alguns dos resultados obtidos.

De um modo geral, conseguimos obter resultados dos compostos estudados neste trabalho principalmente a nível antioxidante, o que os torna interessantes para se tornarem ferramentas biológicas e usados para fins terapêuticos. Futuramente, propomos para além das correções já mencionadas dos ensaios realizados, a realização de novos ensaios sobre a atividade antioxidante e de ensaios que ajudem a avaliar outras atividades biológicas como a atividade anticancerígena e anti-inflamatória.

Referências Bibliográficas

- Acciarino, A., Diwakarla, S., Handreck, J., Bergola, C., Sahakian, L., & McQuade, R. M. (2024). The role of the gastrointestinal barrier in obesity-associated systemic inflammation. *Obesity Reviews*, 25(3), e13673. <https://doi.org/10.1111/obr.13673>
- Basen-Engquist, K., & Chang, M. (2011). Obesity and cancer risk: Recent review and evidence. *Current Oncology Reports*, 13(1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/s11912-010-0139-7>
- Blüher, M. (2019). Obesity: Global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(5), 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Fahed, G., Aoun, L., Bou Zerdan, M., Allam, S., Bou Zerdan, M., Bouferraa, Y., & Assi, H. I. (2022). Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020786>
- Fernandes, Q., Inchakalody, V. P., Bedhiafi, T., Mestiri, S., Taib, N., Uddin, S., Merhi, M., & Dermime, S. (2024). Chronic inflammation and cancer; the two sides of a coin. *Life Sciences*, 338, 122390. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122390>
- Flores-Dorantes, M. T., Díaz-López, Y. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). Environment and Gene Association With Obesity and Their Impact on Neurodegenerative and Neurodevelopmental Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 863. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00863>
- Freitas, V. L. S., & Silva, M. D. M. C. R. da. (2020). Structural and Energetic Insights on Two Dye Compounds: 1-Acetyl-2-Naphthol and 2-Acetyl-1-Naphthol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173827>
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752–1761. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>
- Huong, D. Q., Nam, P. C., & Duong, T. (2023). Experimental and theoretical insights into free radical capturing activity of 1,5-diaminonaphthalene and 1,5-dihydroxynaphthalene. *Journal of Molecular Structure*, 1285, 135537. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135537>
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840–846. <https://doi.org/10.1038/nature05482>
- Kapuci, M., Ulker, Z., Gurkan, S., & Alpsoy, L. (2014). Determination of cytotoxic and genotoxic effects of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol on human lymphocyte culture. *Toxicology and Industrial Health*, 30(1), 82–89. <https://doi.org/10.1177/0748233712451772>
- Kaur, H., Singh, J., & Narasimhan, B. (2019). Synthesis and evaluation of novel naphthol diazenyl scaffold based Schiff bases as potential antimicrobial and cytotoxic agents against human colorectal carcinoma cell line (HT-29). *BMC Chemistry*, 13(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0558-y>
- Keaney, J. F. J., Larson, M. G., Vasan, R. S., Wilson, P. W. F., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J. M., Sutherland, P., Vita, J. A., & Benjamin, E. J. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 434–439. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11>
- Lin, S. A., & Barker, N. (2011). Gastrointestinal stem cells in self-renewal and cancer. *Journal of*

- Gastroenterology, 46(9), 1039–1055. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0424-8>
- Luo, L., Jia, J. J., Zhong, Q., Zhong, X., Zheng, S., Wang, G., & He, L. (2021). Synthesis and anticancer activity evaluation of naphthalene-substituted triazole spirodienones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 213, 113039. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113039>
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., & Arrigo, T. (2014). Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 378–400. <https://doi.org/10.3390/ijms16010378>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Miller, A. A., & Spencer, S. J. (2014). Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.04.001>
- Montrose, M. H. (2004). Small Intestine, Absorption and Secretion. In L. R. Johnson (Ed.), *Encyclopedia of Gastroenterology* (pp. 399–404). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00650-X>
- Patravale, V., Dandekar, P., & Jain, R. (2012). 4–Nanotoxicology: Evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. In V. Patravale, P. Dandekar, & R. Jain (Eds.), *Nanoparticulate Drug Delivery* (pp. 123–155). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>
- Prescott, D., Lee, J., & Philpott, D. J. (2013). An epithelial armamentarium to sense the microbiota. *Seminars in Immunology*, 25(5), 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.007>
- Rashed, M. M. A., Tong, Q., Abdelhai, M. H., Gasmalla, M. A. A., Ndayishimiye, J. B., Chen, L., & Ren, F. (2016). Effect of ultrasonic treatment on total phenolic extraction from *Lavandula pubescens* and its application in palm olein oil industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.07.014>
- Sajkowski, L., Seward, T. M., & Mountain, B. W. (2023). Quantitative analysis of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol at nanomol levels in geothermal fluids using SPE with HPLC. *MethodsX*, 11, 102244. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102244>
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S., & Pujari, V. B. (2019). Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, 18(3), 121–126. https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18
- Teixeira, D., Prudêncio, C., & Vieira, M. (2017). Development of a new HPLC-based method for 3-nitrotyrosine quantification in different biological matrices. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1046, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.035>
- Vincent, H. K., Innes, K. E., & Vincent, K. R. (2007). Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 9(6), 813–839. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00692.x>
- Wang, Y., Chen, Y., Zhang, X., Lu, Y., & Chen, H. (2020). New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. *Journal of Functional Foods*, 75, 104248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104248>
- Acciarino, A., Diwakarla, S., Handreck, J., Bergola, C., Sahakian, L., & McQuade, R. M. (2024). The role of the gastrointestinal barrier in obesity-associated systemic inflammation. *Obesity*

Reviews, 25(3), e13673. <https://doi.org/10.1111/obr.13673>

Basen-Engquist, K., & Chang, M. (2011). Obesity and cancer risk: Recent review and evidence. *Current Oncology Reports*, 13(1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/s11912-010-0139-7>

Blüher, M. (2019). Obesity: Global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(5), 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>

Fahed, G., Aoun, L., Bou Zerdan, M., Allam, S., Bou Zerdan, M., Bouferraa, Y., & Assi, H. I. (2022). Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020786>

Fernandes, Q., Inchakalody, V. P., Bedhiafi, T., Mestiri, S., Taib, N., Uddin, S., Merhi, M., & Dermime, S. (2024). Chronic inflammation and cancer; the two sides of a coin. *Life Sciences*, 338, 122390. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122390>

Flores-Dorantes, M. T., Díaz-López, Y. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). Environment and Gene Association With Obesity and Their Impact on Neurodegenerative and Neurodevelopmental Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 863. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00863>

Freitas, V. L. S., & Silva, M. D. M. C. R. da. (2020). Structural and Energetic Insights on Two Dye Compounds: 1-Acetyl-2-Naphthol and 2-Acetyl-1-Naphthol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173827>

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752–1761. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>

Huong, D. Q., Nam, P. C., & Duong, T. (2023). Experimental and theoretical insights into free radical capturing activity of 1,5-diaminonaphthalene and 1,5-dihydroxynaphthalene. *Journal of Molecular Structure*, 1285, 135537. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135537>

Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840–846. <https://doi.org/10.1038/nature05482>

Kapuci, M., Ulker, Z., Gurkan, S., & Alpsoy, L. (2014). Determination of cytotoxic and genotoxic effects of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol on human lymphocyte culture. *Toxicology and Industrial Health*, 30(1), 82–89. <https://doi.org/10.1177/0748233712451772>

Kaur, H., Singh, J., & Narasimhan, B. (2019). Synthesis and evaluation of novel naphthol diazenyl scaffold based Schiff bases as potential antimicrobial and cytotoxic agents against human colorectal carcinoma cell line (HT-29). *BMC Chemistry*, 13(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0558-y>

Keaney, J. F. J., Larson, M. G., Vasan, R. S., Wilson, P. W. F., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J. M., Sutherland, P., Vita, J. A., & Benjamin, E. J. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 434–439. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11>

Lin, S. A., & Barker, N. (2011). Gastrointestinal stem cells in self-renewal and cancer. *Journal of Gastroenterology*, 46(9), 1039–1055. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0424-8>

Luo, L., Jia, J. J., Zhong, Q., Zhong, X., Zheng, S., Wang, G., & He, L. (2021). Synthesis and anticancer activity evaluation of naphthalene-substituted triazole spirodienones. *European Journal of*

Medicinal Chemistry, 213, 113039. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113039>

Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., & Arrigo, T. (2014). Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 378–400. <https://doi.org/10.3390/ijms16010378>

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>

Miller, A. A., & Spencer, S. J. (2014). Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.04.001>

Montrose, M. H. (2004). Small Intestine, Absorption and Secretion. Em L. R. Johnson (Ed.), *Encyclopedia of Gastroenterology* (pp. 399–404). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00650-X>

Patravale, V., Dandekar, P., & Jain, R. (2012). 4–Nanotoxicology: Evaluating toxicity potential of drug–nanoparticles. Em V. Patravale, P. Dandekar, & R. Jain (Eds.), *Nanoparticulate Drug Delivery* (pp. 123–155). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>

Prescott, D., Lee, J., & Philpott, D. J. (2013). An epithelial armamentarium to sense the microbiota. *Seminars in Immunology*, 25(5), 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.007>

Rashed, M. M. A., Tong, Q., Abdelhai, M. H., Gasmalla, M. A. A., Ndayishimiye, J. B., Chen, L., & Ren, F. (2016). Effect of ultrasonic treatment on total phenolic extraction from *Lavandula pubescens* and its application in palm olein oil industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.07.014>

Sajkowski, L., Seward, T. M., & Mountain, B. W. (2023). Quantitative analysis of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol at nanomol levels in geothermal fluids using SPE with HPLC. *MethodsX*, 11, 102244. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102244>

Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S., & Pujari, V. B. (2019). Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, 18(3), 121–126. https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18

Teixeira, D., Prudêncio, C., & Vieira, M. (2017). Development of a new HPLC–based method for 3-nitrotyrosine quantification in different biological matrices. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1046, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.035>

Vincent, H. K., Innes, K. E., & Vincent, K. R. (2007). Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 9(6), 813–839. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00692.x>

Wang, Y., Chen, Y., Zhang, X., Lu, Y., & Chen, H. (2020). New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. *Journal of Functional Foods*, 75, 104248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104248>