



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

EDUARDO HENRIQUE GUIMARÃES DA CRUZ

**“SÍNTESE DE HETEROCÍCLICOS
FOTOLUMINESCENTES E α -LAPACHONAS ARILAMINO
SUBSTITUÍDAS: APLICAÇÕES EM BIOLOGIA CELULAR
E NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER”**

**BELO HORIZONTE
JULHO DE 2013**

UFMG/ ICEX/ DQ. 969^a
D. 531^a

Eduardo Henrique Guimarães da Cruz

**SÍNTESE DE HETEROCÍCLICOS FOTOLUMINESCENTES
E α -LAPACHONAS ARILAMINO SUBSTITUÍDAS:
APLICAÇÕES EM BIOLOGIA CELULAR E NA
TERAPÊUTICA DO CÂNCER**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Química do Instituto de
Ciências Exatas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química –
Química Orgânica.

Belo Horizonte

2013

C955s
2013
D

Cruz, Eduardo Henrique Guimarães da
Síntese de heterocíclicos fotoluminescentes e
 α -lapachonas arilamino substituídas : aplicações em
biologia celular e na terapêutica do câncer / Eduardo
Henrique Guimarães da Cruz. 2013.
xix, 96 f. : il.

Orientador: Eufrânio Nunes da Silva Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

Inclui anexos.

1. Química orgânica - Teses 2. Naftoquinona - Teses
3. Agentes antineoplásicos - Teses 4. Compostos
heterocíclicos - Teses 5. Fotoluminescência - Teses I.
Silva Júnior, Eufrânio Nunes da, Orientador II.
Título.

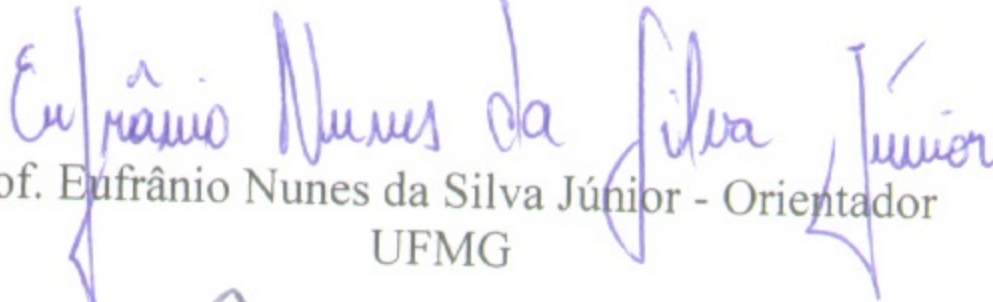
CDU 043



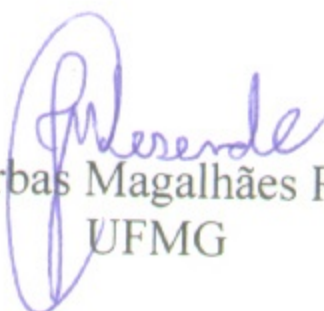
"Síntese de Heterocíclicos Fotoluminescentes e α -Lapachonas Arilamino
Substituídas: Aplicações em Biologia Celular e na Terapêutica do Câncer"

Eduardo Henrique Guimarães da Cruz

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Eufrânio Nunes da Silva Júnior - Orientador
UFMG


Prof. Ângelo de Fátima
UFMG


Prof. Jarbas Magalhães Resende
UFMG

Belo Horizonte, 16 de julho de 2013.



**“SÍNTESE DE HETEROCÍCLICOS
FOTOLUMINESCENTES E α -LAPACHONAS ARILAMINO
SUBSTITUÍDAS: APLICAÇÕES EM BIOLOGIA CELULAR
E NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER”**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Química.

Orientador:

Professor Doutor Eufrânio Nunes da Silva Júnior

Belo Horizonte

Julho de 2013



Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG
Dissertação de Mestrado – Eduardo H. G. da Cruz
Citação

“[...] Quem mói no asp’ro
não fantaseia.”

Guimarães Rosa,
Grande Sertão: Veredas



Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG
Dissertação de Mestrado – Eduardo H. G. da Cruz
Agradecimentos

Aos meus pais que tanto admiro. Sempre tão carinhosos e motivadores, sempre com tantas saudades de mim, sempre tão acolhedores.

Aos meus irmãos, que lavaram a louça muitas vezes no meu dia de lavar, pra que eu pudesse escrever a dissertação.



Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG
Dissertação de Mestrado – Eduardo H. G. da Cruz
Agradecimentos

À minha namorada Bárbara Sartore, pela paciência que teve em namorar um aluno de mestrado que mora em outra cidade. Por ser uma pessoa maravilhosa, por me fazer tão feliz e realizado. Também por me motivar a procurar construir uma carreira e querer ser um grande profissional.



AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao professor Eufrânio Nunes da Silva Júnior, por ser a personificação de tudo o que me motivou a entrar no mundo da pesquisa científica. Sua paixão pela química e desejo constante de superar os próprios limites traz entusiasmo a todos que com ele trabalham. Além disso, é um grande amigo e conselheiro.

À amiga Emilay Baessa, por tanto ter me ajudado, dado forças e me socorrido nos momentos de preocupação.

Aos amigos Caio Hussene e Diego Calixto, que trabalharam diretamente comigo e foram cabais para a execução deste projeto.

Aos amigos Gleiston Dias, Isadora de Melo, Guilherme Jardim, Beatriz Gandra e Ana Carolina Borges, que tornaram tão prazerosa a já prazerosa tarefa de fazer química.

A todos do Laboratório de Química Sintética e Heterocíclica, os quais estão entre as pessoas com quem mais gostei de conviver na minha vida. Agradeço profundamente pela forma como vocês me acolheram e por todos os momentos de felicidade que me proporcionaram.

Ao professor Brenno Amaro DaSilveira Neto da Universidade de Brasília, excelente parceiro, uma grande mente, que contribuiu de forma imprescindível neste trabalho.

Ao grande Pedro Pimenta, uma pessoa sensacional, divertida e boa de trabalho.

Ao professor José R. Corrêa e sua aluna Bruna C. Guido, ambos da Universidade de Brasília, pela parceria nos estudos de marcação celular.



Ao professor Heibbe C. B. de Oliveira da Universidade de Brasília pela colaboração em Química Computacional.

Ao professor José D. de Souza Filho pela excelente colaboração na área de Ressonância Magnética Nuclear.

À professora Claudia Pessoa e o pesquisador Bruno C. Cavalcanti da Universidade Federal do Ceará pela excelente colaboração na área de farmacologia experimental.

Ao professor Tiago Brandão, companheiro de laboratório, dono de grande simpatia, que demonstrou enorme boa vontade em me ajudar sempre que o procurei.

Aos pesquisadores Solange L. de Castro e Rubem Menna-Barreto da FIOCRUZ-RJ, incansáveis amigos do nosso grupo de pesquisa e colaboradores constantes.

À memória do professor Antônio Ventura Pinto, que infelizmente não cheguei a conhecer, mas cujo amor à pesquisa transparece em seu trabalho e cujas histórias contadas pelo professor Eufrânio nunca canso de ouvir e são fonte de inspiração.

A Maria do Carmo F. R. Pinto, que colaborou em diversos aspectos, se mostrando mais que uma colaboradora e sim uma verdadeira amiga do nosso grupo de pesquisas.

Ao professor Vitor F. Ferreira da Universidade Federal Fluminense, que nos forneceu subsídios para melhoria do laboratório possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Mozart, Thiago, Thaís, Bárbara e Eveline, ótimas pessoas com quem tenho o prazer de dividir o ambiente de trabalho.

Ao Felipe Medeiros, Graciane Ramos, Rafaela Pereira, Lucas, Yuri Rego, Juliana, Aretha, Lucas Micquéias, Breno, Leonardo Neto e Bruna Terra, pessoas com quem tenho a honra de conviver e encontrar nos corredores do departamento de química e que tantas vezes me deram um socorro, uma ajuda científica, uma força.



A todos os ótimos professores com quem tive contato no departamento de Química da UFMG. A colaboração de todos foi essencial para o meu desenvolvimento acadêmico.

A central analítica e a todos os funcionários do departamento de Química da UFMG que possibilitam que o funcionamento do DQ.

À banca examinadora por aceitar o convite.

Ao CNPQ, CAPES, FAPEMIG e PRPq-UFMG pela bolsa concedida e financiamento à pesquisa.



RESUMO

Dois novos derivados do lapachol, uma nor- β -lapachona e sua respectiva fenazina, acoplados ao núcleo benzotiadiazola (BTD) através de um anel 1,2,3-triazólico foram sintetizados e caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear 1D e 2D. Suas propriedades fotofísicas foram investigadas. Este trabalho também descreve a arquitetura molecular baseada em duas substituições no núcleo 2,1,3-benzotiadiazola nas posições 4- e 7-. Um lado foi substituído com um grupo capaz de realizar ESIPT (transferência protônica intramolecular no estado excitado) um processo que aumenta sua estabilidade e outro lado substituído com um grupo contendo o anel triazólico. Este anel conecta o núcleo BTD e uma estrutura de conhecida atividade antitumoral, um derivado quinoidal da nor- β -lapachona. Este novo derivado foi avaliado contra vinte linhagens de células tumorais e linhagens de células normais, V79, L-929 e PBMC. A quinona apresentou atividade contra todas as linhagens de células tumorais, inclusive mais ativa do que a doxorubicina (controle positivo) contra seis destas linhagens. A quinona também apresentou menos citotoxicidade contra as linhagens de células normais do que o controle positivo. Devido as suas interessantes propriedades fotofísicas e boa fluorescência, experimentos de bioimagem foram conduzidos com o derivado fenazínico e esse corante foi testado como marcador fluorescente para imagens celulares, mostrando sua localização preferencial, região perinuclear, em linhagens de células tumorais MDA-MB-231 (uma linhagem celular de câncer de mama invasivo). Visando a obtenção de novas substâncias com atividade antitumoral, também foram sintetizados oito derivados da α -lapachona com diferentes substituintes arilamino no anel C e submetidas a avaliação biológica.



ABSTRACT

Two new lapachol derivatives, a nor- β -lapachone and its respective phenazine, benzothiadiazole-triazole-linked have been synthesized and characterized by 1D and 2D NMR spectroscopy. Their photophysical properties were investigated. This work also describes the molecular architecture based on two substitutions on the important 2,1,3-benzothiadiazole (BTD) core at positions 4- and 7-. One side is substituted with a group capable of performing an ESIPT (excited-state intramolecular proton transfer), a stabilizing process, and the other side is substituted with a triazole-containing group. This triazole ring acts as a linker between the BTD core and a group of known antitumoral activity, a quinoidal derivative of nor- β -lapachone. This novel compound had its antitumoral activity evaluated against twenty cancer cell lines and against normal cells, V79, L-929 and PBMC. The quinone was very active against all cancer cell lines and it was more active than doxorubicin (positive control) against six cell lines. The quinone also shows lower cytotoxicity to normal cell lines, when compared to the positive control. Due to their interesting photophysical properties and good fluorescence, bioimaging experiments were conducted with the phenazine derivative and this dye was tested as a fluorescent cell-imaging probe, thus showing its preferable cellular location in the perinuclear region of MDA-MB-231 cancer cells (a breast invasive cancer cell lineage). Aiming at obtaining of new compounds with antitumor activity the synthesis of α -lapachone derivatives with some different arylamino substituents in ring C were performed. These compounds were submitted to biological studies.



ÍNDICE

Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Índice.....	xi
Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Esquemas.....	xviii

CAPÍTULO I

1. Introdução.....	1
1.1. Quinonas.....	1
1.2. Potencial antitumoral das quinonas: lapachol e derivados.....	3
1.3. Luminescência.....	10
1.4. Sondas fluorescentes.....	14
1.5. 2,1,3-benzotriazolozola e a química “Click” (formação de 1,2,3-triazóis).....	15
1.6. 2,1,3-benzotriazolozola: aplicação em sistemas biológicos.....	18
1.7. Quinonas fluorescentes: atividade antitumoral e localização subcelular.....	21
2. Proposta de trabalho.....	24
3. Resultados e discussão.....	28
3.1. Síntese da <i>nor-β-lapachona</i> acoplada ao núcleo 2,1,3-benzotriazolozola via química <i>click</i>	28
3.2. Avaliação farmacológica.....	42
3.3. Fotofísica.....	46
3.4. Obtenção da fenazina-BTD.....	49
4. Conclusão.....	61

CAPÍTULO II

1. Introdução.....	62
--------------------	----



1.1.	Estratégias para a obtenção de lapachonas bioativas.....	62
2.	Proposta de trabalho.....	67
3.	Resultados e discussão.....	69
3.1.	Síntese de derivados da α -lapachona arilamino substituídos.....	69
4.	Conclusão.....	79
	Experimental.....	80



LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares de Sangue Periférico)
δ	deslocamento químico
J	constante de acoplamento
$\nu_{\text{máx.}}$	freqüência de absorção máxima
λ	comprimento de onda
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
1D	unidimensional
2D	bidimensional
APT	“attached proton test” (teste de próton ligado)
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer” (Aumento sem Distorção pela Transferência de Polarização)
ppm	parte por milhão
C_0	carbono quaternário
DMSO- d_6	dimetilsulfóxido deuterado
COSY	“correlated spectroscopy” (espectroscopia de correlação)
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation” (Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações)
HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Coherence” (Coerência Heteronuclear Quântica Simples)
d	duplete
dd	duplo duplete
m	multiplete
q	quarteto
s	simpleto
t	triplete
sl	simpleto largo
E.M.	espectrometria de massas
I.V.	espectroscopia no infravermelho



p.f.	ponto de fusão
T.A.	temperatura ambiente
C.C.F.	cromatografia em camada fina
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (orbital molecular ocupado de mais alta energia)
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (orbital molecular descocupado de mais baixa energia)
BTD	benzotiadiazola
TBAF	fluoreto de tetrabutilamônio
TMS	trimetilsilano
TMSOTf	trimetilsilil trifluorometano sulfonato
THF	tetrahidrofurano
MeOH	metanol
DPEPhos	(oxidi-2,1-fenileno)bis(difenilfosfina)
<i>t</i> -BuOK	<i>tert</i> -butóxido de potássio
EDIA	etildiisopropilamina
DMSO	dimetilsulfóxido
ESIPT	Excited State Intramolecular Proton Transference (Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado)



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo característico médio de alguns eventos fotofísicos.....	12
Tabela 2. Atividade citotóxica apresentada pelo quinona-BTD (54) e pelo controle positivo Doxorubicina.....	43
Tabela 3. Índice de seletividade [Razão entre as citotoxicidades, expressas como IC ₅₀ (µM), contra L929, V79 e PBMC e as linhas de células tumorais referidas]. Quinona-BTD (54) e doxorubicina entre parênteses.....	45
Tabela 4. Dados de fotofísica da quinona-BTD (54).....	46
Tabela 5. Dados de fotofísica da fenazina-BTD (55).....	59
Tabela 6. Coloração e ponto de fusão das substâncias 74-81.....	73
Tabela 7. Dados de RMN de ¹ H (200,0 MHz, CDCl ₃), para os derivados 74-81.....	74
Tabela 8. Atividade citotóxica dos derivados arilamino substituídos e controle positivo, Doxorubicina.....	76
Tabela 9. Atividade citotóxica dos derivados arilamino substituídos e α-lapachona (62).....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Menaquinona (vitamina K ₁).....	2
Figura 2. Exemplos de quinonas com atividade antitumoral.....	5
Figura 3. Estratégias de modificações da β -lapachona (2).....	5
Figura 4. Nor- α -lapachona (5) e nor- β -lapachona (6) obtidas a partir do lapachol (1).....	6
Figura 5. Naftoquinonas e heterocíclicos com atividade antitumoral.....	10
Figura 6. Diagrama de Jablonski.....	11
Figura 7. Relação entre os máximos de absorção e emissão: Deslocamento de Stokes....	14
Figura 8. 2,1,3-benzotiadiazola (18) e 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola (19).....	15
Figura 9. Linhagens de células tumorais MCF-7 seletivamente marcadas na mitocôndria com as substâncias 33 (esquerda) e 34 (direita).....	19
Figura 10. Linhagem de células tumorais MCF-7. Núcleo celular marcado com DAPI (azul) e mitocôndrias marcadas com o composto 40 (verde).....	20
Figura 11. Análise por microscopia confocal, na linhagem celular DA3, da doxorrubicina (Imagens A-D) e do composto 46 (Imagens E-F).....	22
Figura 12. Microscopia confocal da linhagem tumoral T24.....	23
Figura 13. Estrutura da nor- β -lapachona 1,2,3-triazólica acoplada ao núcleo 2,1,3-benzotiadiazola.....	25
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H do nor-lapachol (12) (200 MHz, CDCl ₃).....	30
Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H da 3-bromo-nor- β -lapachona (13) (200 MHz, CDCl ₃).....	33
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H da 3-azido-nor- β -lapachona (10) (200 MHz, CDCl ₃).....	34
Figura 17. Espectro de RMN de ¹ H da Br-BTD-aminopiridina (37) (300 MHz, CDCl ₃).....	37
Figura 18. Espectro de RMN de ¹³ C-APT do composto (37) (75 MHz, CDCl ₃).....	37
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H da quinona-BTD (54) (200 MHz, CDCl ₃).....	41
Figura 20. Espectro de RMN de ¹³ C da quinona-BTD (54) (50 MHz, CDCl ₃).....	41
Figura 21. Espectro de massas de alta resolução da quinona-BTD (54).....	42

Figura 22. Atividade citotóxica contra vinte linhagens de células tumorais e três linhagens de células normais para a substância 54 e doxorubicina).....	45
Figura 23. Espectros de absorção em diversos solventes para a quinona-BTD (54).....	47
Figura 24. Espectros de emissão em diversos solventes para a quinona-BTD (54).....	48
Figura 25. Espectros de emissão a quinona-BTD (54) e o derivado benzotiadiazólico (38).....	48
Figura 26. Hipótese para a perda da fluorescência na quinona-BTD (54).....	49
Figura 27. Fenazinas descritas na literatura com importantes características luminescentes.....	50
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da Fenazina-BTD (55) (400 MHz, CDCl_3).....	52
Figura 29. Expansão do espectro de HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da Fenazina-BTD (55). (400 MHz, CDCl_3).....	53
Figura 30. Expansão do espectro de HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da Fenazina-BTD (55). (400 MHz, CDCl_3).....	54
Figura 31. Expansão do espectro de HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da Fenazina-BTD (55). (400 MHz, CDCl_3).....	54
Figura 32. Expansão do espectro de HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da Fenazina-BTD (55). (400 MHz, CDCl_3).....	55
Figura 33. Expansão do espectro de HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da Fenazina-BTD (55). (400 MHz, CDCl_3).....	55
Figura 34. Expansão do espectro de HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da Fenazina-BTD (55). (400 MHz, CDCl_3).....	56
Figura 35. Espectro de massas de alta resolução da BTD-Fenazina (55).....	56
Figura 36. Espectros de absorção em diversos solventes para a fenazina-BTD (55).....	57
Figura 37. Espectros de emissão em diversos solventes para a fenazina-BTD (55).....	58
Figura 38. Espectros de emissão a fenazina-BTD (55) e o derivado benzotiadiazólico (38).....	58
Figura 39. MDA-MB-231 marcado com 57 em adição ao corante comercial DAPI e imagens de contraste de fase.....	59
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (62) (200 MHz, CDCl_3).....	69
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da 4-bromo- α -lapachona (73) (200 MHz, CDCl_3)....	71



UFMG

Figura 42. Espectro de RMN de ^1H do derivado 75 (200 MHz, CDCl_3).....	73
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 75 , (50 MHz, CDCl_3).....	74
Figura 44. Atividade citotóxica de α -lapachonas arilamino substituídas e doxorubicina contra cinco linhagens de células tumorais e duas linhagens de células normais.....	77
Figura 45. Atividade citotóxica de α -lapachonas arilamino substituídas e α -lapachona contra três linhagens de células tumorais.....	78



LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Exemplos de quinonas advindas do benzeno, naftaleno, antraceno e fenantreno.....	1
Esquema 2. Síntese da β -lapachona (2) a partir do lapachol (1).....	3
Esquema 3. Processo redox induzido por quinonas.....	4
Esquema 4. Substâncias planejadas por modificação da β -lapachona (2).....	7
Esquema 5. Lapachonas e nor-lapachonas 1,2,3-triazólicas.....	8
Esquema 6. Nor- β -lapachonas arilamino substituídas.....	9
Esquema 7. Nor- β -lapachonas alcóxi-substituídas.....	9
Esquema 8. Níveis de energia dos orbitais moleculares e possíveis transições eletrônicas para o formaldeído.....	13
Esquema 9. Síntese da 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola (19).....	16
Esquema 10. Síntese de derivados da BTB acoplados ao núcleo 1,2,3-triazólico.....	17
Esquema 11. Síntese de derivados BTB acoplados ao núcleo 1,2,3-triazólico.....	17
Esquema 12. Síntese de derivados da BTB acoplados ao núcleo 1,2,3-triazólico.....	18
Esquema 13. Síntese de derivados BTB.....	19
Esquema 14. Síntese de derivados 2,1,3-benzotiadiazola.....	20
Esquema 15. Síntese de um derivado antracínico análogo à doxorubicina.....	21
Esquema 16. Síntese de uma antratiofenodiona luminescente.....	23
Esquema 17. Extração do lapachol.....	25
Esquema 18. Análise retrossintética proposta para a obtenção do derivado 3-azido-nor- β -lapachona.....	26
Esquema 19. Análise retrossintética proposta para a obtenção do derivado da 2,1,3-benzotiadiazola.....	27
Esquema 20. Análise retrossintética proposta para a obtenção do derivado da nor- β -lapachona acoplado ao núcleo 2,1,3-benzotiadiazola.....	27
Esquema 21. Proposta para obtenção do composto luminescente com atividade biológica.....	29
Esquema 22. Obtenção do nor-lapachol (12) via oxidação de Hooker.....	30
Esquema 23. Mecanismo proposto para a oxidação de Hooker.....	31



UFMG

Esquema 24. Mecanismo de formação do derivado bromado 13	32
Esquema 25. Mecanismo de formação do composto 10	33
Esquema 26. Mecanismo de ESIPT do composto 37	35
Esquema 27. Ciclo catalítico do acoplamento de Buchwald-Hartwig	36
Esquema 28. Ciclo catalítico do acoplamento de Sonogashira.....	38
Esquema 29. Desproteção do alcino para a formação da substância 51	38
Esquema 30. Obtenção da Quinona-BTD via química “Click”.....	39
Esquema 31. Ciclo catalítico de formação do triazol 1,4.....	40
Esquema 32. Fenazina fluorescente obtida a partir da β -lapachona.....	50
Esquema 33. Fenazina-BTD (55) obtida a partir da quinona-BTD (54).....	50
Esquema 34. Mecanismo de formação da fenazina 55	51
Esquema 35. Estratégias de modificação da β -lapachona (2).....	62
Esquema 36. Nor- β -lapachonas arilamino substituídas com atividade tripanocida.....	63
Esquema 37. Modificação no anel C para obtenção de 63 , derivado com atividade tripanocida.....	64
Esquema 38. Modificações visando à obtenção de substâncias tripanocidas.....	64
Esquema 39. Síntese de nor- β -lapachonas arilamino substituídas com potente atividade antitumoral.....	65
Esquema 40. Síntese de α -lapachonas 1,2,3-triazólicas.....	66
Esquema 41. Síntese de nor- α -lapachonas 1,2,3-triazólicas.....	66
Esquema 42. Síntese da α -lapachona (62).....	67
Esquema 43. Bromação da α -lapachona (62).....	68
Esquema 44. Inserção do grupo arilamino.....	68
Esquema 45. Formação da α -lapachona.....	69
Esquema 46. Mecanismo para a formação da α -lapachona (62).....	69
Esquema 47. Formação da 4-bromo- α -lapachona (73).....	70
Esquema 48. Mecanismo proposto para a bromação da α -lapachona (62).....	71
Esquema 49. Derivados arilamino substituídos 74-81 obtidos a partir de 73	73
Esquema 50. Mecanismo proposto para a inserção do grupo arilamino no derivado 73 ..	73

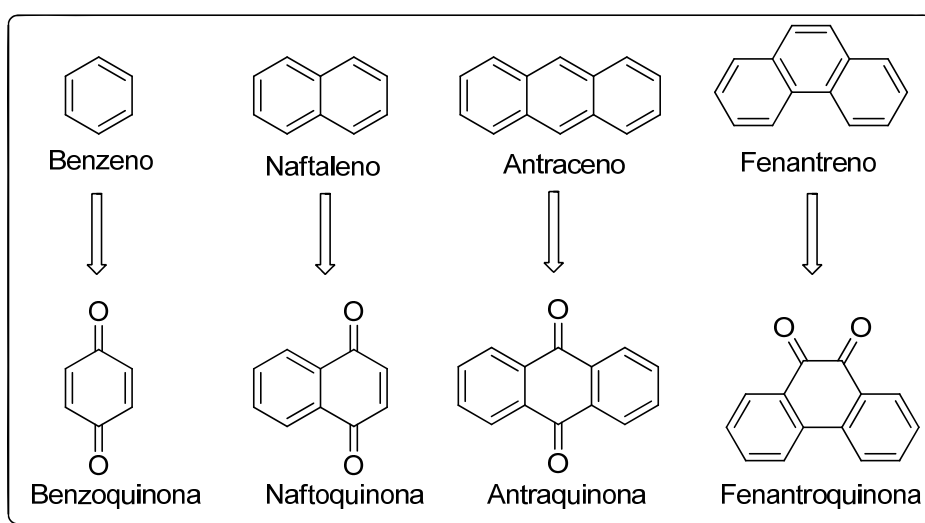


CAPÍTULO I
“SÍNTESE DE HETEROCÍCLICOS
FOTOLUMINESCENTES: APLICAÇÕES EM BIOLOGIA
CELULAR E NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER”

1. INTRODUÇÃO

1.1. Quinonas

Quinonas são substâncias α,β -dienônicas cíclicas. São classificadas de acordo com a estrutura do anel aromático correspondente, por exemplo, benzoquinonas,¹ naftoquinonas,² antraquinonas³ e fenantroquinonas,⁴ relacionadas com as estruturas do benzeno, naftaleno, antraceno e fenantreno, respectivamente (Esquema 1).



Esquema 1. Exemplos de quinonas relacionadas ao benzeno, naftaleno, antraceno e fenantreno.

Substâncias com o esqueleto quinoidal apresentam importantes atividades biológicas, devido propriedades de biooxidação-redução e a capacidade de catalisarem processos biológicos de transferência de elétrons.⁵ Esse esqueleto está presente em

1. Hu, P.; Huang, S.; Xu, J.; Shi, Z. J.; Su, W.; Construction of substituted benzene rings by palladium catalyzed direct cross-coupling of olefins: A rapid synthetic route to 1,4-naphthoquinone and its derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9926-9930.
2. Zakharova, O. D.; Ovchinnikova, L. P.; Goryunov, L. I.; Troshkova, N. M.; Shteingarts, V. D.; Nevinsky, G. A.; Cytotoxicity of new polyfluorinated 1,4-naphthoquinones with diverse substituents in the quinone moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *19*, 256-260.
3. Eyong, K. O.; Krohn, K.; Hussain, H.; Folefoc, G. N.; Nkengfack, A. E.; Schulz, B.; Hu, Q.; Newbouldiaquinone and newbouldiamide: A new naphthoquinone-anthraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 616-619.
4. Wang, W.; Nykamp, J.; Huang, X. D.; Gerhardt, K.; Dixon, D. G.; Greenberg, B. M.; Examination of the mechanism of phenanthrenequinone toxicity of *Vibrio fischeri*: Evidence for a reactive oxygen species-mediated toxicity mechanism. *Environ. Toxicol. Chem.* **2009**, *28*, 1655-1662.
5. Asche, C.; Antitumour quinones. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 449-467.

diversas substâncias participantes de processos biológicos, como, por exemplo, as menaquinonas (Figura 1).⁶

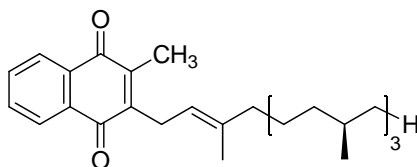


Figura 1. Menaquinona (vitamina K₁).

As quinonas constituem uma das principais famílias de metabólitos de distribuição natural. Dentre as substâncias quinoidais, o lapachol (**1**) e seus derivados representam uma importante classe de compostos devido a suas bioatividades.⁷ O lapachol (**1**) (Esquema 1) é uma naftoquinona encontrada em diversas espécies vegetais e foi isolado pela primeira vez por Arnaudon em 1858⁸ e sintetizada por Fieser em 1927.⁹

Sua principal ocorrência é na família Bignoniácea, principalmente no gênero *Tabebuia*, sendo facilmente extraída do cerne da madeira dos diversos tipos de árvores conhecidos como “ipês” (*Tabebuia sp.*). Várias atividades biológicas tornam o lapachol (**1**) uma molécula de grande interesse farmacológico, como atividade antitumoral,¹⁰ antimalarial¹¹ e tripanocida.¹²

A β-lapachona (**2**) (Esquema 1) é uma proeminente substância, encontrando-se em fase clínica II associada com a gemcitabina para o tratamento do câncer de pâncreas¹³ e, em associação com taxol, tem se mostrado efetiva contra tumores humanos de ovário e

6. das Dôres, S. M. C.; de Paiva, S. A. R.; Campana, A. O.; Vitamina K: Metabolismo e nutrição. *Rev. Nutr.* **2001**, *14*, 207-218.

7. Ferreira, S. B.; Rocha, D. R.; Carneiro, J. W. M.; Santos, W. C.; Ferreira, V. F.; A new method to prepare 3-alkyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinones: Synthesis of lapachol and phthicol. *Synlett.* **2011**, *11*, 1551-1554.

8. Arnaudon, M.; *C. R. Acad. Sci.* **1858**, *46*, 1152.

9. Fieser, L. F. The alkylation of hydroxynaphthoquinone III. A synthesis of lapachol. *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, *49*, 857-864.

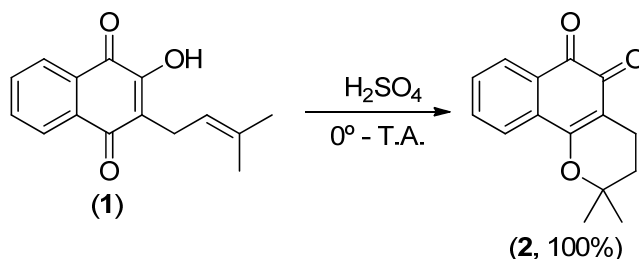
10. Oliveira, L. G.; Silva, M. M.; Paula, F. C. S.; Pereira-Maia, E. C.; Donnici, C. L.; Simone, C. A.; Frézard, F.; Silva Júnior, E. N.; Demicheli, C.; Antimony(V) and bismuth(V) complexes of lapachol: synthesis, crystal structure and cytotoxic activity. *Molecules.* **2011**, *16*, 10314-10323.

11. Andrade-Neto, V. F.; Goulart, M. O. F.; Filho, J. F. S.; Silva, M. J.; Pinto, M. C. F. R.; Pinto, A. V.; Zalis, M. G.; Carvalho, L. H.; Krettl, A. U.; Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1145-1149.

12. Moura, K. C. G.; Emery, F. S.; Pinto, C. N.; Pinto, M. C. F. R.; Dantas, A. P.; Salomão, K.; Castro, S. L.; Pinto, A. V.; Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: A review from an interdisciplinary study. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 325-338.

13. Bey, E. A.; Bentle, M. S.; Reinicke, K. E.; Dong, Y.; Yang, C. R.; Girard, L.; Minna, J. D.; Bornmann, W. G.; Gao, J.; Boothman, D. A.; An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β-lapachone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, *104*, 11832-11837.

próstata.¹⁴ A β -lapachona (**2**) também pode ser extraída do cerne de árvores do gênero *Tabebuia*, mas em quantidade muito baixa. Porém pode ser facilmente sintetizada a partir do lapachol (**1**) na presença de ácido sulfúrico (Esquema 2).



Esquema 2. Síntese da β -lapachona (**2**) a partir do lapachol (**1**).

1.2. Potencial antitumoral das quinonas: lapachol e derivados

O potencial das quinonas na terapêutica do câncer é conhecido há mais de três décadas, desde a publicação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos em 1974¹⁵ de um teste de avaliação de quinonas sintéticas e naturais que verificou sua atividade antitumoral. O lapachol teve sua atividade citotóxica avaliada clinicamente contra o carcinoma de Walker-256¹⁶ e o sarcoma de Yoshida,¹⁷ embora eficaz na regressão dessas neoplasias, mas desaprovado em decorrência dos efeitos colaterais provocados em testes clínicos.

Estudos de propriedades antitumorais e mecanismos de ação de compostos quinônicos mostraram que estes podem agir como inibidores de enzimas topoisomerases via intercalação no DNA e pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que levam ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à morte celular por apoptose.^{18,19}

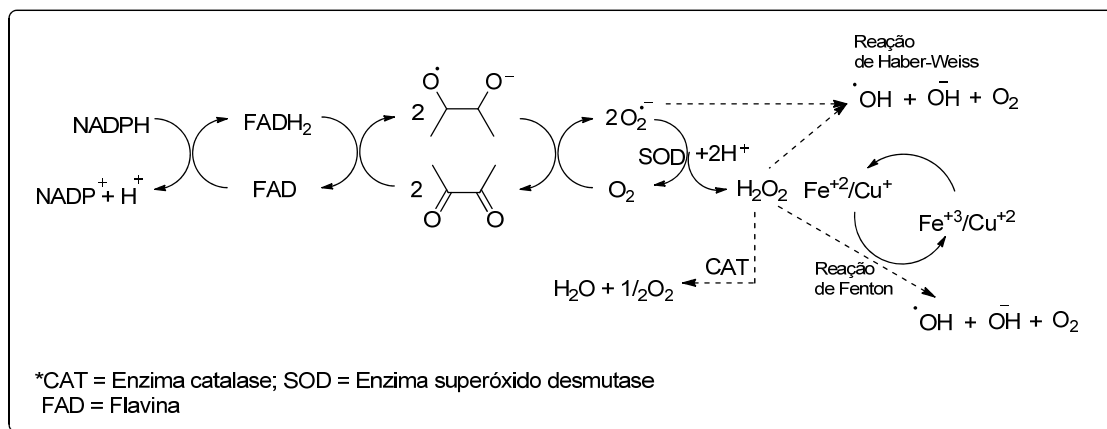
14. Ferreira, S. B.; Gonzaga, D. T. G.; Santos, W. C.; Araújo, K. G. L.; Ferreira, V. F.; β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Rev. Virtual. Quim.* **2010**, *2*, 140-160.

15. Driscoll, J. S.; Quinone structure-antitumor activity relationships. *Cancer Chemother. Rep.* **1974**, *4*, 3-4.

16. Subramanian, S.; Ferreira, M. M. C.; Trsic, M.; A structure-activity relationship study of lapachol and some derivatives of 1,4-naphthoquinones against carcinosarcoma Walker 256. *Struct. Chem.* **1998**, *9*, 47-57.

17. Silva, A. J. M.; Buarque, C. D.; Brito, F. V.; Aurelian, L.; Macedo, L. F.; Malkas, L. H.; Hickey, R. J.; Lopes, D. V. S.; Noël, F.; Murakami, Y. L. B.; Silva, N. M. V.; Melo, P. A.; Caruso, R. R. B.; Castro, N. G.; Costa, P. R. R.; Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2731-2738.

Essa capacidade de levar ao estresse oxidativo é o principal responsável pelo interesse nas quinonas. No Esquema 3, encontra-se um esboço resumido das possíveis etapas destes processos biológicos.¹⁹



Esquema 3. Processo redox induzido por quinonas (adaptado da Ref. 19).

Um substrato quinonoídico é reduzido com um elétron para formar o ânion semiquinona, em processo catalisado pelas enzimas NADPH citocromo P-450 redutase (E.C. 1.6.2.3), NADPH citocromo b5 redutase (E.C. 1.6.2.2) ou NADPH ubiquinona oxidoreductase (E.C. 1.6.5.3). Uma vez formada a espécie semiquinona, essa tem o poder de reduzir o oxigênio molecular ao ânion-radical superóxido que, na presença da enzima superóxido dismutase (SOD, E.C. 2,55,56), é transformado em H₂O₂ e em O₂. Esse ânion-radical superóxido, por catálise com metais de transição ou por reação com H₂O₂, gera o radical hidroxila no interior da célula. O H₂O₂ não é um radical livre, mas é uma substância bastante reativa e também pode promover a oxidação de algumas biomoléculas. O radical hidroxila e H₂O₂ são as principais espécies responsáveis pelo estresse oxidativo celular.¹⁹

Várias quinonas possuem reconhecida atividade antitumoral, como antraciclina (3) e mitoxantrona (4) (Figura 2). O fármaco doxorubicina (3), amplamente utilizado no tratamento de neoplasias é uma antraciclina.

18. Cavalcanti, B. C.; Cabral, I. O.; Rodrigues, F. A. R.; Barros, F. W. A.; Rocha, D. D.; Magalhães, H. I. F.; Moura, D. J.; Saffi, J.; Henriques, J. A. P.; Carvalho, T. S. C.; Moraes, M. O.; Pessoa, C.; Melo, I. M. M.; da Silva Júnior, E. N.; Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 145-163.

19. Silva, M. N.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V.; Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β-lapachona e derivados. *Quim. Nova.* **2003**, *26*, 407-416.

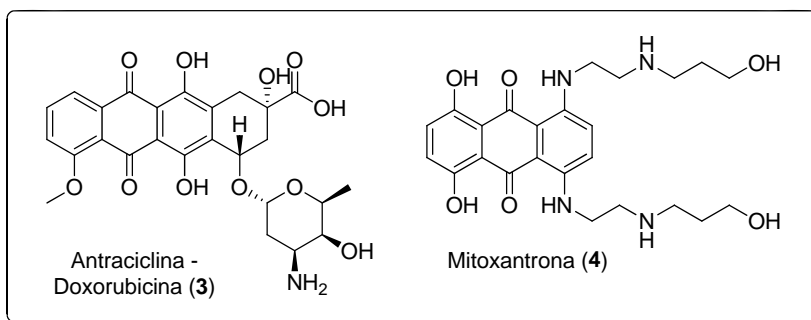


Figura 2. Exemplos de quinonas com atividade antitumoral.

Diversos grupos de pesquisas tem como foco o estudo do potencial antitumoral das naftoquinonas derivadas do lapachol (**1**).²⁰ A β -lapachona (**2**), como citado anteriormente, possui elevada atividade antitumoral e modificações na estrutura desse protótipo é uma abordagem explorada para a obtenção de novas estruturas com destacada capacidade de inibir tumores.²¹ Em geral, modificações no anel A ou C e/ou centro redox da β -lapachona (**2**) (Figura 3), são estratégias utilizadas para a obtenção de substâncias bioativas como será discutido a seguir.

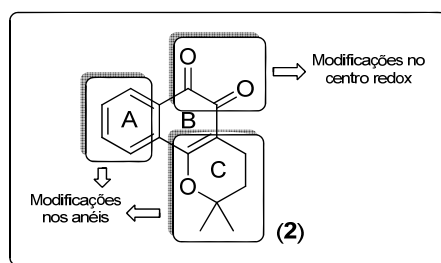


Figura 3. Estratégias de modificações da β -lapachona (**2**).

Outros promissores derivados do lapachol (**1**) são as furanonaftoquinonas (Figura 4), que se caracterizam pelo anel C com 5 membros (pirano versus furano). Estudos de citotoxicidade de compostos dessa família são mais recentes, porém várias moléculas com destacada atividade antitumoral já foram sintetizadas a partir de modificações no anel C da nor- α -lapachona (**5**) e nor- β -lapachona (**6**).

20. Eyong, K. O.; Kumar, P. S.; Kuete, V.; Folefoc, G. N.; Nkengfack, E. A.; Baskaran, S.; Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5387-5390.

21. Pérez-Sacau, E.; Díaz-Peñate, R. G.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Garcia-Castellano, J. M.; Pardo, L.; Campillo, M.; Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 696-706.

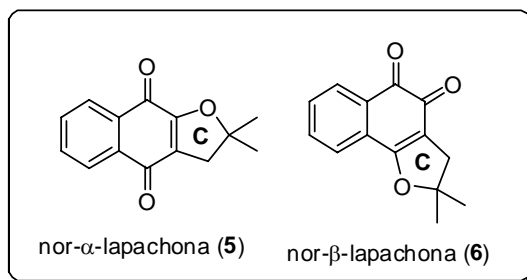
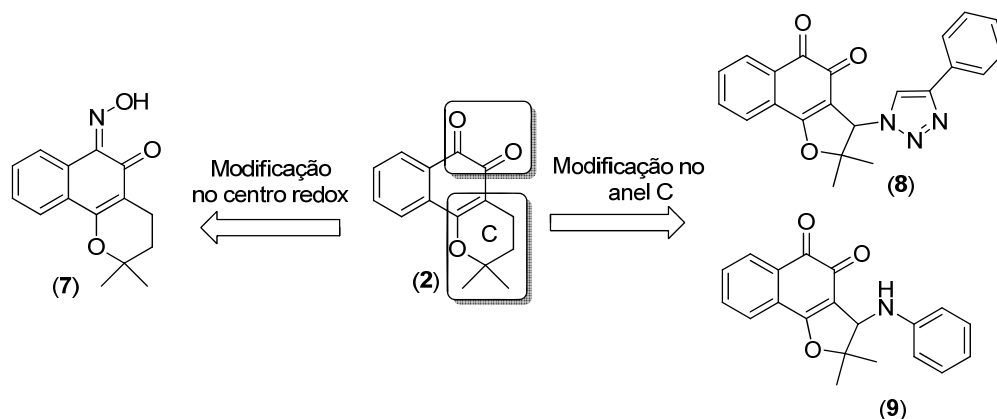


Figura 4. Nor- α -lapachona (5) e nor- β -lapachona (6) obtidas a partir do lapachol (1).

Integrando síntese orgânica e biologia experimental, nosso grupo de pesquisa descreveu recentemente a síntese de derivados da β - e nor- β -lapachona com potente atividade contra diversas linhagens de células tumorais.^{22,23} Para tal, foram empregadas estratégias como hibridação molecular²⁴ e troca bioisostérica,²⁵ que são poderosas metodologias para o desenho de novas substâncias baseadas em subunidades farmacofóricas.

A modificação do centro redox e a modificação do anel C levaram ao sucesso na obtenção de diversos derivados com atividade antitumoral (Esquema 4).



Esquema 4. Substâncias planejadas por modificação da β -lapachona (2).

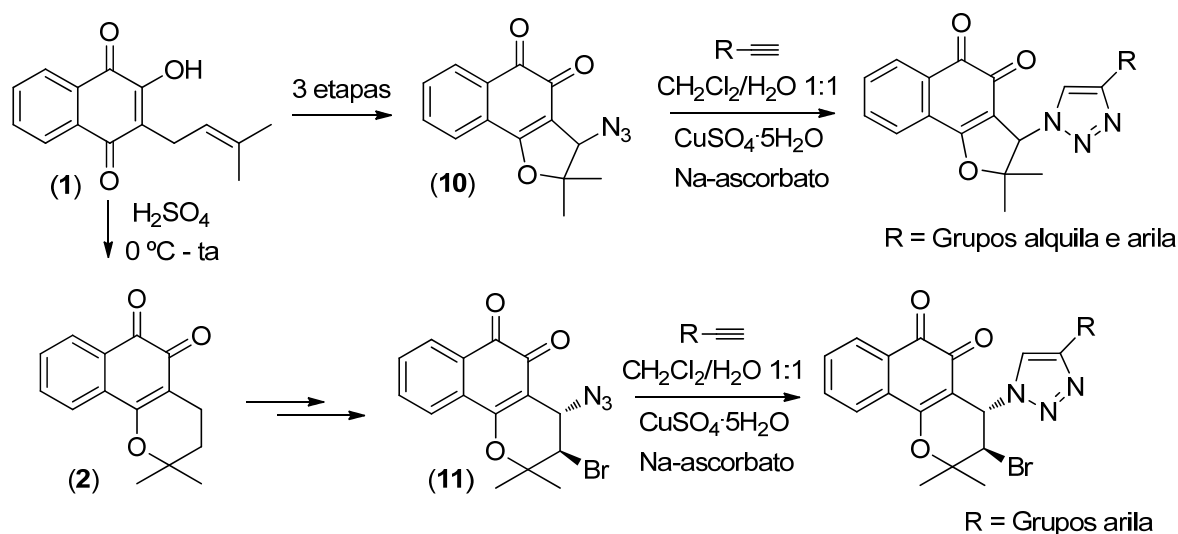
22. da Silva Júnior, E. N.; Moura, M. A. B. F.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Souza, M. C. B. V.; Araújo, A. J.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Moraes, M. O.; Ferreira, V. F.; Goulart, M. O. F.; Cytotoxic, trypanocidal activities and physicochemical parameters of nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 635-643.

23. da Silva Júnior, E. N.; Cavalcanti, B. C.; Guimarães, T. T.; Pinto, M. C. F. R.; Cabral, I. O.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; Moraes, M. O.; Andrade, C. K. Z.; Santos, M. R.; Simone, C. A.; Goulart, M. O. F.; Pinto, A. V.; Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 399-410.

24. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V. B.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829-1852.

25. Lima, L. M.; Barreiro, E. J.; Bioisosterism - A useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23-49.

Da Silva Júnior e colaboradores lograram êxito na obtenção de compostos bioativos através do acoplamento de naftoquinonas com o núcleo 1,2,3-triazólico. Por meio desta estratégia foram obtidos derivados com promissora atividade tripanocida,^{26,27,28} leishmanicida²⁹ e com atividade antitumoral frente a diferentes linhagens de células tumorais,¹⁸ indicando que o núcleo 1,2,3-triazólico intensifica a atividade da porção farmacofórica quinoidal (Esquema 5).



Esquema 5. Lapachonas e nor-lapachonas 1,2,3-triazólicas.

Um estudo recentemente publicado sugere que a atividade antitumoral das lapachonas 1,2,3-triazólicas envolve a indução de morte celular por apoptose via geração de espécies reativas de oxigênio.¹⁸

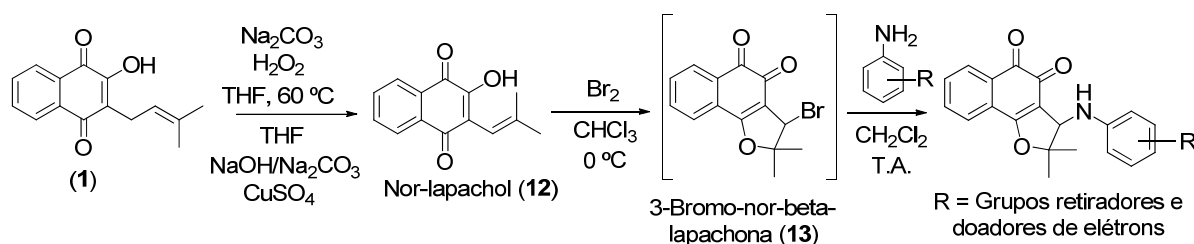
26. da Silva Júnior, E. N.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Silva, R. S. F.; Teixeira, D. V.; Souza, M. C. B. V.; Simone, C. A. S.; Castro, S. L.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. V.; Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1774-1780.

27. da Silva Júnior, E. N.; Guimarães, T. T.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Simone, C. A.; Pessoa, C.; Cavalcanti, B. C.; Sabino, J. R.; Andrade, C. K. Z.; Goulart, M. O. F.; Castro, S. L.; Pinto, A. V.; The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: Synthesis of imidazolic anthraquinones, nor- β -lapachone derivatives and β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3224-3230.

28. Fernandes, M. C.; da Silva Júnior, E. N.; Pinto, A. V.; Castro, S. L.; Menna-Barreto, R. F. S.; A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. **2012**, *139*, 26-36.

29. Guimarães, T. T.; Pinto, M. C. F. R.; Lanza, J. S.; Melo, M. N.; Monte-Neto, R. L.; Melo, I. M. M.; Diogo, E. B. T.; Ferreira, V. F.; Camara, C. A.; Valença, W. O.; Oliveira, R. N.; Frézard, F.; da Silva Júnior, E. N.; Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant *Leishmania* parasites: Synthesis of novel α - and nor- α -lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Eur. J. Med Chem.* **2013**, *63*, 523-530.

Outra modificação no anel C de lapachonas, que se mostrou eficaz para a obtenção de compostos bioativos, é a inserção do grupo arilamino. Em um trabalho recente estes derivados mostraram atividade contra seis linhagens de células tumorais [SF-295 (sistema nervoso central), HCT-8 (côlon), MDAMB-435 (melanoma), HL-60 (leucemia), PC-3 (próstata) e B-16 (melanoma murino)], sendo em muitos casos mais ativas do que o fármaco de controle, a doxorrubicina.³⁰ A síntese desses compostos é simples e passa por etapas com altos rendimentos, que utilizam reagentes de fácil acesso (Esquema 6). A primeira etapa no processo de preparação dessas moléculas envolve a síntese *in situ* da 3-bromo-nor-β-lapachona (**13**) a partir do nor-lapachol (**12**).³¹ O derivado **13** foi utilizado para as reações de substituição, obtendo-se as substâncias arilamino quinoidais (Esquema 6).³⁰

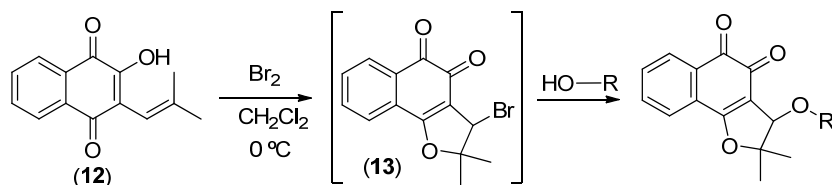


Esquema 6. Nor-β-lapachonas arilamino substituídas.

Outra estratégia de modificação no anel C é a obtenção de alcóxi nor-β-lapachonas, desenhadas por troca bioisostérica, quinona-NHR por quinona-OR. Essas substâncias também apresentaram potente atividade antitumoral.³⁰ Uma rota similar à descrita acima foi utilizada para a obtenção de nor-β-lapachonas alcóxi substituídas (Esquema 7). As reações de substituição foram realizadas com diferentes alcoóis.

30. da Silva Júnior, E. N.; Deus, C. F.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; Costa-Lotufu, L. V.; Montenegro, R. C.; Moraes, M. O.; Pinto, M. C. F. R.; Simone, C. A.; Ferreira, V. F.; Goulart, M. O. F.; Andrade, C. K. Z.; Pinto, A. V.; 3-Arylamino and 3-alkoxy-nor-β-lapachone derivatives: synthesis and cytotoxicity against cancer cell Lines. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 504-508.

31. Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; de Oliveira, C. G. T.; Síntese das α e β-nor-lapachonas, propriedades em meio ácido e reações com N-Bromosuccinimida. *An. Acad. Bras. Ci.* **1982**, *54*, 107-109.



Esquema 7. Nor- β -lapachonas alcóxi-substituídas.

Diversos pesquisadores descreveram nos últimos anos naftoquinonas obtidas a partir do lapachol (1), β -lapachona (2) e nor- β -lapachona (4) com propriedades antitumorais, sendo alguns dos derivados mais ativos do que o fármaco padrão doxorubicina. A Figura 5 mostra exemplos dessas estruturas.³²

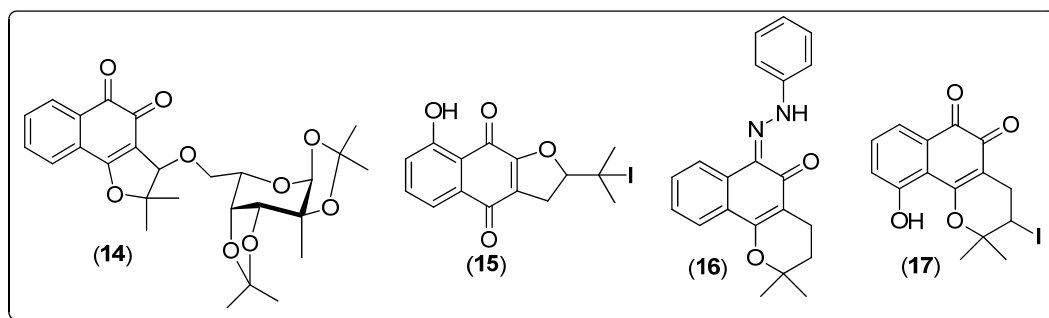


Figura 5. Naftoquinonas e heterocíclicos com atividade antitumoral.

Diante dos expressivos resultados de avaliação antitumoral apresentados pelas substâncias derivadas do lapachol (1), diversos estudos de mecanismo de ação foram realizados, visando-se entender como essas substâncias atuam para extirpar o câncer.³³

32. (a) Francisco, A. I.; Vargas, M. D.; Fragoso, T. P.; Carneiro, J. W. M.; Casellato, A.; Silva, F. A. C.; Ferreira, V. F.; Barbosa, J. P.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; Filho, J. D. B. M.; Moraes, M. O.; Mangrich, A. S.; Theoretical studies of the tautomerism in 3-(2-R-phenylhydrazono)-naphthalene-1,2,4-triones: Synthesis of copper(II) complexes and studies of antibacterial and antitumor activities. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1293-1302. (b) Campos, V. R.; Santos, E. A.; Ferreira, V. F.; Montenegro, R. C.; Souza, M. C. V. B.; Costa-Lotufo, L. V.; Moraes, M. O.; Regufe, A. K. P.; Jordao, A. K.; Pinto, A. C.; Resende, J. A. L. C.; Cunha, A. C.; Synthesis of carbohydrate-based naphthoquinones and their substituted phenylhydrazono derivatives as anticancer agents. *R. Soc. Chem. Adv.* **2012**, *2*, 11438-11448. (c) Bonifazi, E. L.; Ríos-Luci, C.; León, L. G.; Burton, G.; Padrón, J. M.; Misico, R. I.; Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2621-2630. (d) Cardoso, M. F. C. B.; Silva, I. M. C. B.; Santos Júnior, H. M.; Rocha, D. R.; Araújo, A. J.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Silva, F. C.; Santos, W. C.; Ferreira, V. F.; A new approach for the synthesis of 3-substituted cytotoxic nor- β -lapachones. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 12-16.

33. Araújo, A. J.; Souza, A. A.; da Silva Júnior, E. N.; Marinho-Filho, J. D. B.; Moura, M. A. B. F.; Rocha, D. D.; Vasconcellos, M. C.; Costa, C. O.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Ferreira, V. F.; Abreu, F. C.; Pinto, A. V.; Montenegro, R. C.; Costa-Lotufo, L. V.; Goulart, M. O. F.; Growth inhibitory effects of 3'-nitro-3-

Estudos com substâncias luminescentes foram desenvolvidos nos últimos anos visando à localização subcelular de substâncias com atividade antitumoral, além de facilitarem o estudo de mecanismos de ação farmacológica.³⁴ Nos próximos tópicos serão discutidos outros aspectos relevantes que são úteis para o entendimento do trabalho desenvolvido nesta dissertação.

1.3. Luminescência

O termo luminescência foi empregado pela primeira vez pelo físico alemão Eilhard Wiedemann em 1888, para designar os processos de emissão de luz, que não envolvem um aumento de temperatura.³⁵ Na luminescência o composto em um estado excitado sofre relaxação através da emissão de fótons, chegando a um estado de menor energia (geralmente o estado fundamental). O fenômeno pode ser classificado pela fonte de excitação, por exemplo, quando esta se dá através da absorção de fótons, o fenômeno é chamado fotoluminescência, quando a excitação é através de uma reação química o fenômeno é a quimiluminescência.³⁶

Quando um composto absorve energia, diferentes situações são possíveis para que ocorra a relaxação. O físico ucraniano Alexander Jablonski propôs um diagrama que ilustra os meios pelo qual a relaxação pode ocorrer, esse diagrama é conhecido como diagrama de Jablonski (Figura 6).³⁷

Ao atingir um estado excitado, um composto pode liberar energia por vias radiativas ou não-radiativas. As principais vias não-radiativas são: relaxação vibracional, conversão interna e cruzamento intersistemas. Na relaxação vibracional a molécula excitada perde rapidamente seu excesso de energia vibracional, devido a colisões com outras moléculas. A conversão interna é uma transição entre estados de energia de mesma

phenylamino nor- β -lapachone against HL-60: A redox-dependent mechanism. *Toxicol. in Vitro.* **2012**, *26*, 585-594.

34. Peterson, Q. P.; Hsu, D. C.; Goode, D. R.; Novotny, C. J.; Totten, R. K.; Hergenrother, P. J.; Procaspase-3 activation as an anti-cancer strategy: Structure-activity relationship of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and its cellular colocalization with caspase-3. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5721–5731.

35. Wiedemann, E.; Über Fluorescenz und Phosphorescenz, I. Abhandlung. *Annalen der Physik*, **1888**, *270*, 446-463.

36. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Valeur, B. Wiley-VCH Verlag GmbH. **2001**. 381p.

37. Lichtman, J.W., Conchello, J-A. Fluorescence microscopy. *Nature Methods.* **2005**, *2*, 910-919.

multiplicidade de spin. O cruzamento intersistemas é uma transição isoenergética entre dois estados de energia de diferentes multiplicidades de spin.

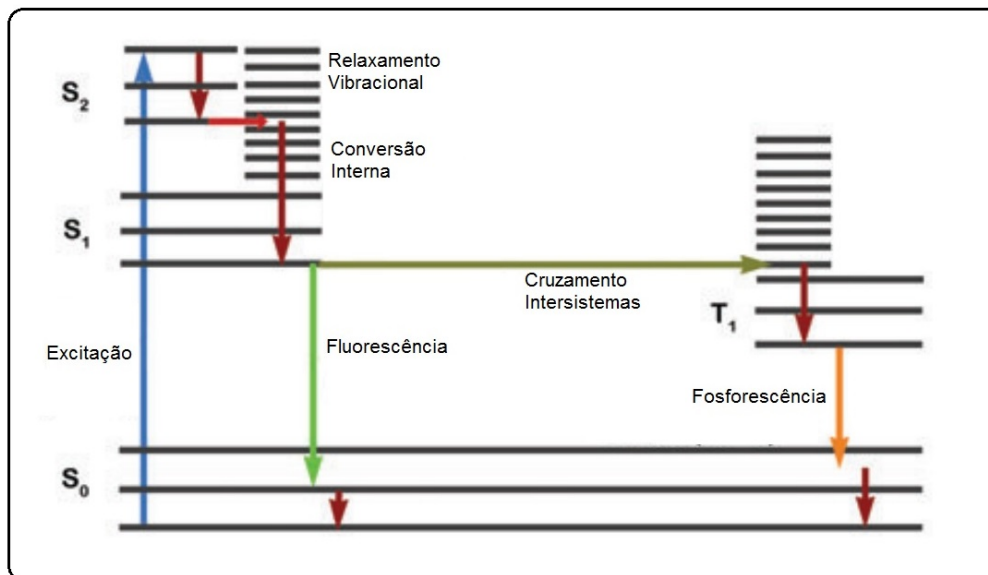


Figura 6. Diagrama de Jablonski (adaptado da Ref. 37).

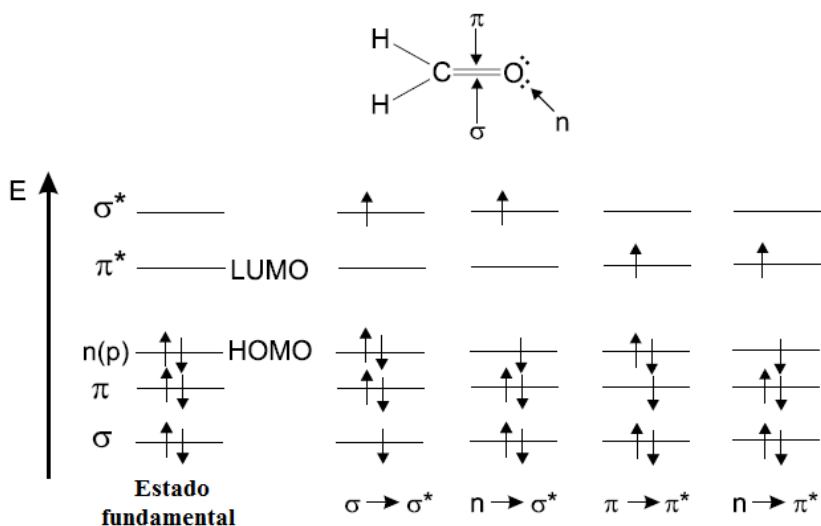
Por suas vez, os mecanismos radiativos são aqueles no qual o composto libera energia através da emissão de luz. Quando o composto sofre relaxação a partir de um estado excitado, que possua mesma multiplicidade de spin do estado fundamental (geralmente singleto para singleto), a emissão é chamada fluorescência. Quando a relaxação ocorre a partir de um estado excitado de multiplicidade diferente do estado fundamental (geralmente tripleto para singleto), o fenômeno é chamado fosforescência (Tabela 1). É importante ressaltar que o elétron não pode ser diretamente excitado do estado singleto para o estado tripleto, mas pode atingir esse estado através de cruzamento intersistemas.³⁷

Tabela 1. Tempo característico médio de alguns eventos fotofísicos (adaptado da Ref. 36)

Tempo característico (s)	
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Tempo de vida do estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7}$ (Fluorescência)
Cruzamento intersistemas	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Tempo de vida do estado excitado T_1	$10^{-6} - 1$ (Fosforescência)

A fração de moléculas que relaxa através da fluorescência define o rendimento quântico de fluorescência,³⁸ uma característica importante para aplicação de um sistema fluorescente. Nos tópicos que se seguem serão discutidos outros aspectos relacionados com o rendimento quântico.

O espectro de absorção mostra o coeficiente de extinção molar de um composto. Ele consiste em um conjunto de comprimentos de ondas que são absorvidos pela substância quando é incidida uma radiação com espectro contínuo sobre a amostra. O gráfico representa a fração da luz incidida versus o comprimento de onda. Os orbitais moleculares envolvidos, como, por exemplo, σ ou π (orbitais ligantes) possuem seu correspondente de maior energia, σ^* e π^* (orbitais antiligantes). Quando uma determinada substância absorve radiação eletromagnética (fótons), pode ocorrer uma excitação eletrônica do elétron alocado no orbital menos energético π (por exemplo) a um orbital mais energético π^* , transição π - π^* . O Esquema 8 exemplifica estas transições eletrônicas tomando como exemplo a molécula de formaldeído conforme descrito na literatura.³⁷ A energia destas transições em geral seguem a seguinte ordem: $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$.



Esquema 8. Níveis de energia dos orbitais moleculares e possíveis transições eletrônicas para o formaldeído. (adaptada da Ref. 36).

38. Demas, J. N.; Crosby, G. A.; The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review. *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 991–1024.

O espectro de excitação mostra a probabilidade de um fluoróforo ser excitado por um dado comprimento de onda de luz incidente. Este espectro é um gráfico da fluorescência emitida versus o comprimento de onda de excitação.³⁶

O espectro de emissão de um fluoróforo descreve a probabilidade de que um fóton emitido tenha determinado comprimento de onda. O espectro mostra a intensidade da fluorescência em função do comprimento de onda.

À diferença entre o comprimento de onda de absorção e o comprimento de onda de emissão, dá-se o nome de Deslocamento de Stokes, também uma característica importante para a aplicação de um fluoróforo em um sistema fluorescente, pois permite que não haja interferência no sinal pelo feixe de excitação (Figura 7).

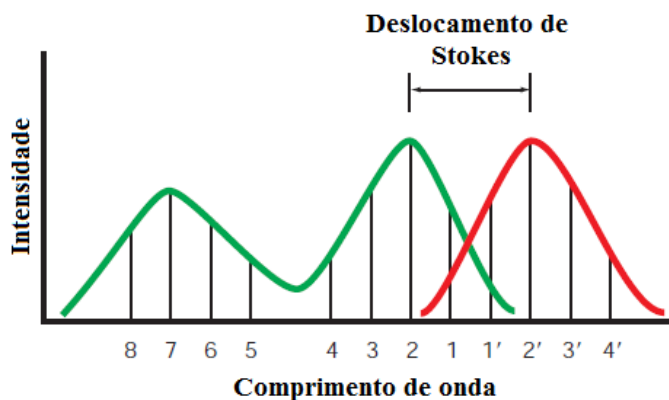


Figura 7. Relação entre os máximos de absorção e emissão: Deslocamento de Stokes (adaptada da Ref. 39).

1.4. Sondas fluorescentes

Uma sonda fluorescente é um fluoróforo que está preparado para responder a um estímulo específico ou para localizar uma determinada região em uma espécie biológica. Nosso entendimento dos sistemas biológicos é dependente da capacidade de visualização dos mesmos, portanto as sondas fluorescentes constituem uma valiosa ferramenta para a química biológica e medicinal, através da qual é possível controlar uma grande variedade de processos celulares e elucidar o mecanismo de ação de várias substâncias biologicamente ativas, com a vantagem da sensibilidade e da seletividade oferecidas pela

39. Fluorescence Imaging: principles and methods, Handbook.

técnica da fluorescência.^{40,41} As vantagens das sondas fluorescentes, em geral, colocam-nas à frente de outras técnicas que utilizam marcadores radioativos, e sondas EPR (*electronic paramagnetic resonance*, ressonância paramagnética eletrônica).³⁶

Através da fluorescência é possível encontrar a localização subcelular de compostos bioativos. Recentemente, Liu e colaboradores,⁴² com o objetivo de estudar o mecanismo de ação de compostos de artemisinina com atividade antitumoral, obtiveram um derivado fluorescente através do acoplamento de uma molécula de artemisinina, que não apresenta fluorescência, com uma porção luminescente formada pelo grupo dansila. Através de microscopia de fluorescência foi possível concluir que a localização subcelular do composto em questão era o retículo endoplasmático.

1.5. 2,1,3-benzotiadiazola e a química “Click” (formação de 1,2,3-triazóis)

O núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) (**18**) (Figura 8) está entre os mais importantes da química de compostos luminescentes.⁴³ Seus derivados geralmente apresentam características muito interessantes para o emprego em sistemas luminescentes: conjugação π -extendida nas posições 4 e 7, são eficientes fluoróforos, possuem fortes interações π - π^* , alta polarizabilidade, formam estruturas cristalinas bem ordenadas e o núcleo BTD possui forte capacidade eletroretiradora.⁴⁴ Dentre os derivados da 2,1,3-benzotiadiazola, a 4,7-dibromo-BTD (**19**), apresenta-se como um importante análogo devido à possibilidade de inserção de diversos tipos de substituintes via reações de acoplamento, em sua maioria envolvendo catalisadores de Pd.⁴³ O composto **19** é

40. Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y.; Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906-918.

41. Crivat, G.; Taraska, J. W.; Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 8-16.

42. Liu, Y.; Lok, C. N.; Ko, B. C.; Shum, T. Y.; Wong, M. K.; Che, C. M.; Subcellular localization of a fluorescent artemisinin derivative to endoplasmic reticulum. *Org Lett.* **2010**, *2*, 1420-1423.

43. Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; da Silva Júnior, E. N.; Dupont, J.; 2,1,3-Benzothiadiazole and derivatives: synthesis, properties, reactions, and applications in light technology of small molecules. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 228-255.

44. Neto, D. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; Vasconcelos, N. M.; Corrêa, J. R.; Costa, M. B.; Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G.; Synthesis, properties and highly selective mitochondria staining with novel, stable and superior benzothiadiazole fluorescent probes. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1524-1532.

comercialmente disponível ou pode ser facilmente sintetizado a partir da 1,2-fenilenodiamina, via reação com cloreto de tionila como descrito no Esquema 9.⁴⁵

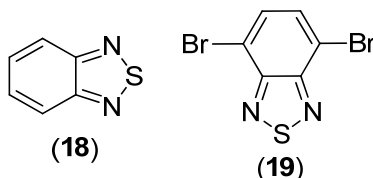
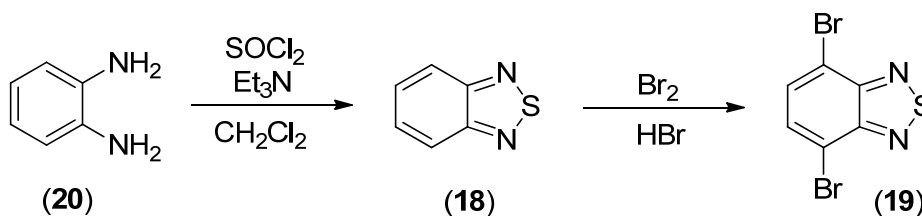


Figura 8. 2,1,3-Benzotriazol (18) e 4,7-dibromo-2,1,3-benzotriazol (19).



Esquema 9. Síntese da 4,7-dibromo-2,1,3-benzotriazol (19).

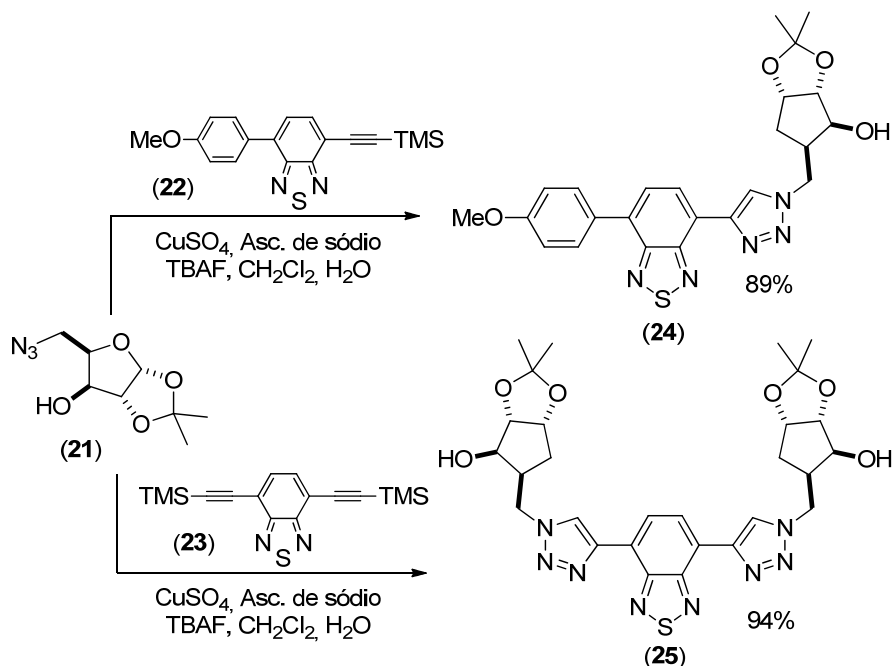
Em um trabalho recente, Moro e colaboradores⁴⁶ sintetizaram um composto luminescente baseado no núcleo 2,1,3-benzotriazol, que se mostrou eficiente como sonda seletiva para cátions Ni^{2+} . Apesar dos vários exemplos descritos na literatura para a obtenção de BTD-substituídas, esse exemplo foi escolhido devido ao composto de partida, 4,7-dibromo-2,1,3-benzotriazol, ter sido acoplado ao núcleo 1,2,3-triazólico via química “click” (Esquemas 10 e 11). Nos próximos tópicos será discutido o uso desta reação para o acoplamento de um núcleo quinoidal ao núcleo da benzotriazol.

A química “click” também foi a estratégia escolhida por Bryant e colaboradores, para a obtenção de uma sonda para Cu^{2+} , Ni^{2+} e Ag^+ com solubilidade em água (Esquema 12). O objetivo era acoplar dois substituintes etilenoglicol ao núcleo fluorescente. O anel

45. a) Hinsberg, O.; Ueber piaseleole und piathiole. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1889**, *22*, 2895-2902; b) Weinstock, L. M.; Davis, P.; Handelsman, B.; Tull, R. J.; General synthetic system for 1,2,5-thiadiazoles. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 2823-2829; c) Komim, A. P.; Street, R. W.; Carmack, M.; Chemistry of 1,2,5-thiadiazoles. III. [1,2,5]thiadiazolo[3,4-c][1,2,5]thiadiazole. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 2749-2752; d) Bryce, M. R.; Use of piperidine-1-sulphenyl chloride as a sulphur-transfer reagent in reactions with diamines: the preparation of sulphur–nitrogen heterocycles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1984**, *1*, 2591-2593.

46. Moro, A. V.; Ferreira, P. C.; Migowski, P.; Rodembusch, F. S.; Dupont, J.; Ludtke, D. S.; Synthesis and photophysical properties of fluorescent 2,1,3-benzothiadiazole-triazole-linked glycoconjugates: Selective chemosensors for Ni(II). *Tetrahedron.* **2013**, *69*, 201-206.

1,2,3-triazólico foi escolhido graças a sua eficiência sintética em realizar a ligação entre estruturas e também por ser interessante em sistemas de detecção de metal. Os autores também testaram diferentes calcogênios além do enxofre da estrutura benzotiadiazola, a fim de verificar a afinidade na detecção de diferentes metais.⁴⁷



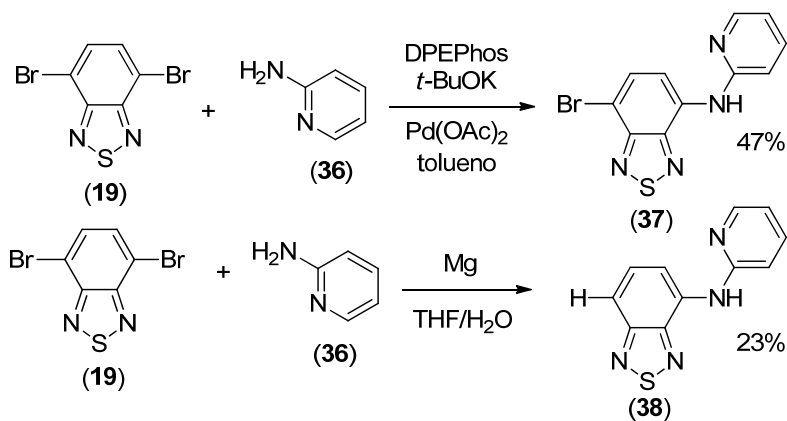
Esquema 10. Síntese de derivados da BTB acoplados ao núcleo 1,2,3-triazólico.

47. Bryant, J. J.; Lindner, B. D.; Bunz, U. H. F.; Water-soluble bis-triazolyl benzochalcogendiazole cycloadducts as tunable metal ion sensors. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 1038-1044.

1.6. 2,1,3-benzotiadiazola: aplicação em sistemas biológicos

A aplicação do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola em sistemas biológicos é relativamente nova e tem se mostrado eficaz. Neto e colaboradores⁴⁴ descreveram derivados da BTD acoplados a grupos capazes de realizar transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT, sigla em inglês) como marcadores seletivos de mitocôndrias. As estruturas dessas moléculas foram planejadas de forma a reunir diversas qualidades apreciáveis a um sistema fluorescente: boa planaridade, possibilidade de formação de ligação de hidrogênio intramolecular e conformação rígida. Para tal foi escolhido o substituinte aminopiridina, onde o nitrogênio do anel piridínico é importante no objetivo de possibilitar uma segunda ligação de hidrogênio intramolecular. O substituinte foi acoplado ao núcleo 2,1,3-benzotiadiazola através da reação de Buchwald-Hartwig como mostrado no Esquema 13.

Na Figura 9 são apresentadas imagens celulares de coloração intensa, promovida por ambos os marcadores, BTDs **33** e **34**, distribuídos no citoplasma. A coloração foi muito seletiva para mitocôndrias e quase nenhuma fluorescência de fundo foi observada.



Esquema 13. Síntese de derivados BTD (adaptado da Ref. 46).

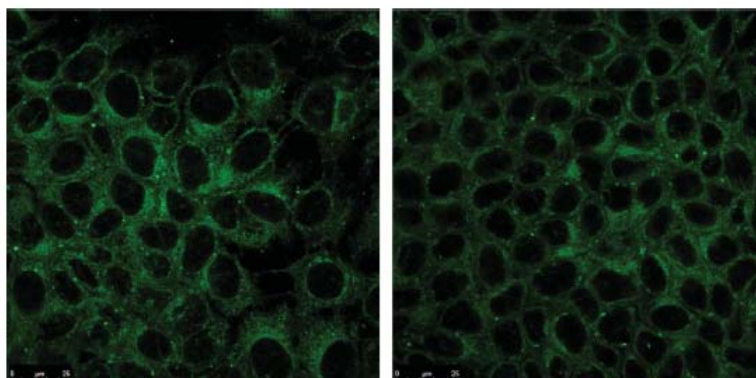
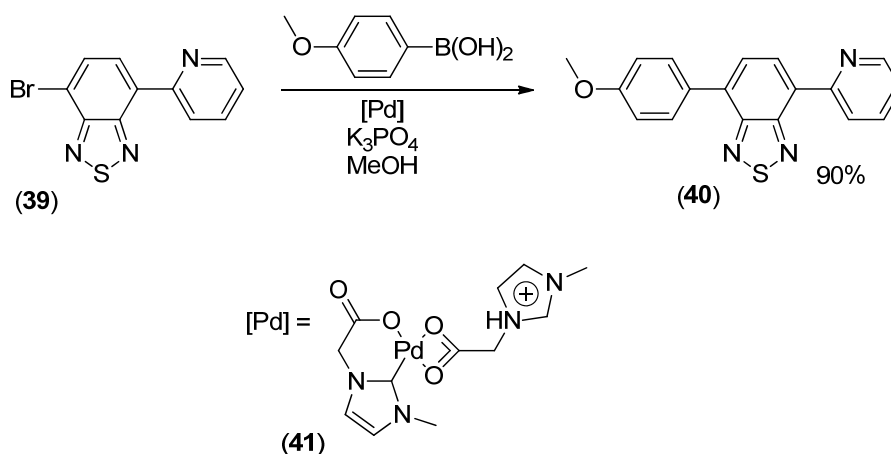


Figura 9. Linhagens de células tumorais MCF-7 seletivamente marcadas na mitocôndria com as substâncias **33** (esquerda) e **34** (direita) (adaptada da Ref. 46).

A partir do composto **39**, já relatado na literatura como marcador seletivo para mitocôndrias, Neto e colaboradores⁴⁸ sintetizaram o composto **40**. A inserção do novo substituinte estendeu o esqueleto π do composto causando um efeito conhecido como “light up” de intensificação da luminescência, obtendo-se então um derivado também eficiente na marcação seletiva de mitocôndrias, com maior deslocamento de Stokes e maior rendimento quântico. O acoplamento foi realizado através do protocolo de Suzuki (Esquema 14).



Esquema 14. Síntese de derivados 2,1,3-benzotiadiazola.

48. Neto, B. A. D.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Guido, B. C.; Gatto, C. C. de Oliveira, H. C. B.; Fasciotti, M.; Eberlin, M. N.; da Silva Júnior, E. N.; Selective and efficient mitochondrial staining with designed 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as live cell fluorescence imaging probes. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 770-781.

O composto **40** foi testado com êxito no monitoramento de processos de divisão celular (Figura 10). O composto permitiu a visualização das mitocôndrias durante todo o processo de divisão, mostrando-se promissor para estudos de processos celulares complexos, nos quais as mitocôndrias estejam envolvidas.

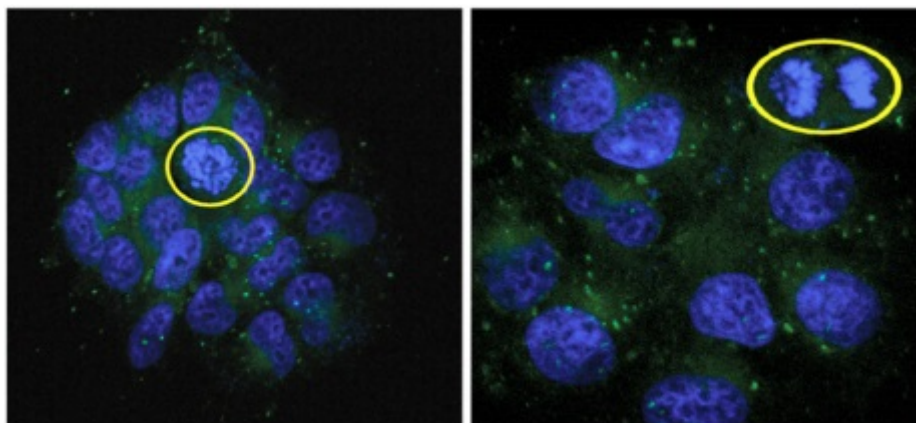
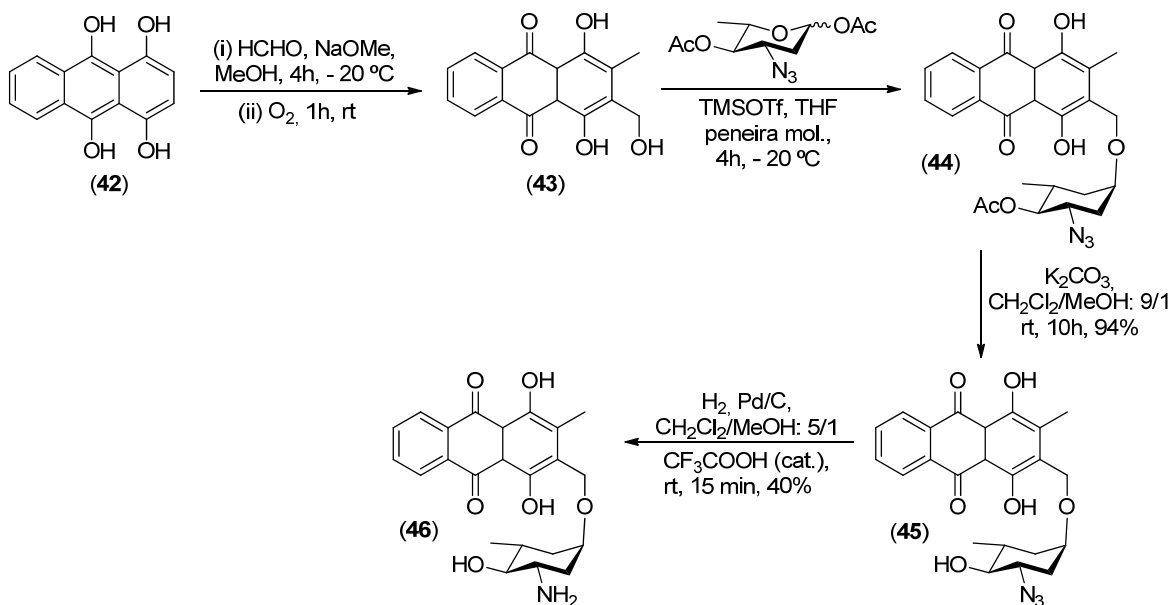


Figura 10. Linhagem de células tumorais MCF-7. Núcleo celular marcado com DAPI (azul) e mitocôndrias marcadas com o composto **40** (verde). A imagem da esquerda mostra a divisão celular no estágio da prometáfase. A imagem da direita mostra o estágio da telófase. (adaptada da Ref. 48).

1.7. Quinonas fluorescentes: atividade antitumoral e localização subcelular

Shaul e colaboradores⁴⁹ obtiveram derivados antracíclínicos análogos à doxorrubicina (Esquema 15) e testaram contra quatro linhagens tumorais, tendo encontrado resultados melhores do que da doxorrubicina para três delas. Tirando proveito da fluorescência inerente a essa família de compostos, foi realizado um experimento para encontrar a localização subcelular destes compostos (Figura 11). O experimento revelou a presença de doxorrubicina no núcleo celular, comportamento não apresentado pelo composto **46**, e mostrou a presença de ambos nos lisossomos.

49. Shaul, P.; Frenkel, M.; Goldstein, E. B.; Mittelman, L.; Grunwald, A.; Ebenstein, Y.; Tsarfaty, I.; Fridman, M. The Structure of anthracycline derivatives determines their subcellular localization and cytotoxic activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 323-328.



Esquema 15. Síntese de um derivado antraciclínico análogo à doxorrubicina.

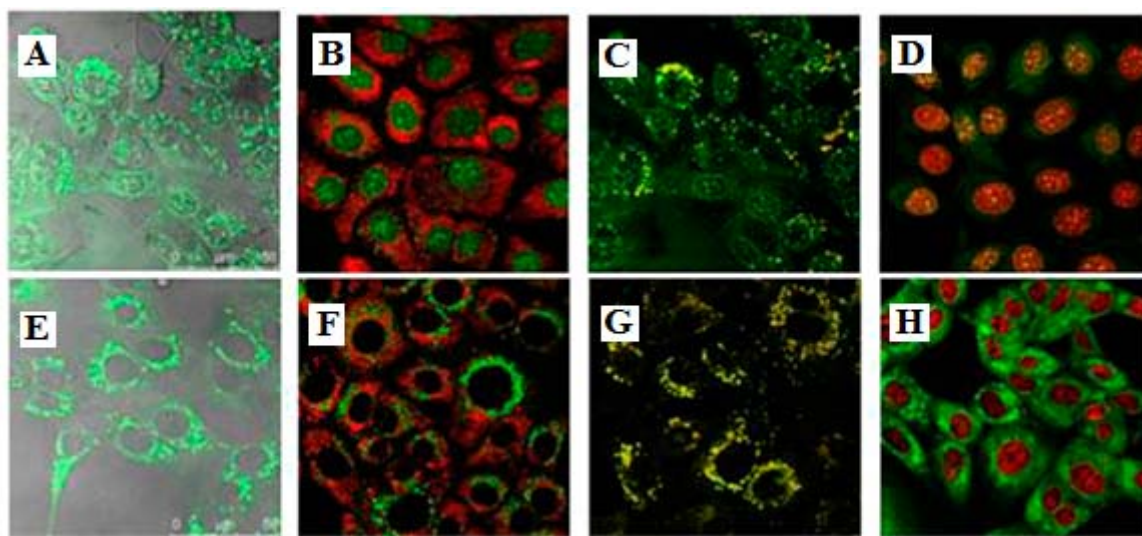
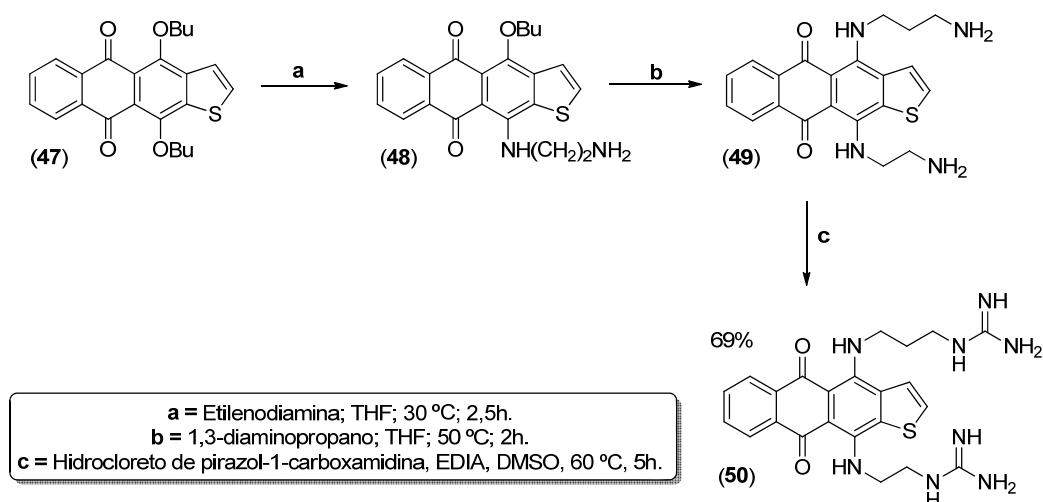


Figura 11. Análise por microscopia confocal, na linhagem celular DA3, da doxorrubicina (Imagens A-D) e do composto **46** (Imagens E-F). A localização subcelular foi avaliada utilizando o corante mitocondrial *MitoTracker deep red* ou o corante nuclear *DRAQ-5 deep red*. Experimentos de co-localização foram realizados utilizando o corante para lisossomos *LysoTracker green* para a doxorrubicina e *LysoTracker red* para o composto **46**. Em cada imagem, o derivado antraciclínico aparece em verde e o corante em vermelho. As imagens A e E mostram a distribuição de cada composto. Imagens B e F mostram a localização na mitocôndria. Imagens C e G mostram a co-localização no lisossomo. Imagens D e H mostram a co-localização nuclear de cada composto. (adaptada da Ref. 49).

Recentemente, outro exemplo foi descrito por Cogoi e colaboradores,⁵⁰ que sintetizaram uma série de antratiofenodionas com dois grupos alquilas de diferentes comprimentos com uma terminação guanidina, a fim de estudar sua interação com DNA e RNA G-quadruplexes (Esquema 16). Através da fluorescência desses compostos, foi possível também encontrar sua localização subcelular. Foi destacado nesse texto um dos compostos sintetizados, a partir do qual o experimento de imagem mostrou sua localização no citoplasma e no núcleo celular (Figura 12).



Esquema 16. Síntese de uma antratiofenodiona luminescente

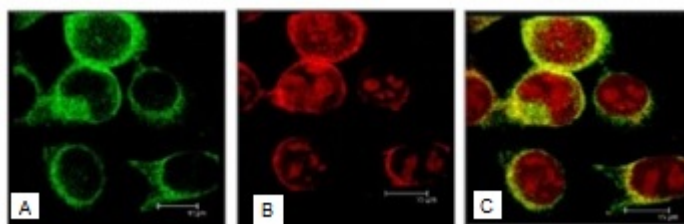


Figura 12. Microscopia confocal da linhagem tumoral T24. A imagem **A** mostra o citoplasma marcado com DRP1, sigla em inglês para dynamin-related protein 1 (verde). A imagem **B** mostra o composto **50**. A Imagem **C** mostra a sobreposição das duas imagens anteriores. (adaptada da Ref. 50).

50. Cogoi, S.; Shchekotikhin, A. E.; Membrino, A.; Sinkevich, Y. B.; Xodo, L. E.; Guanidino anthrathiophenediones as G-quadruplex binders: Uptake, intracellular localization, and anti-Harvey-ras gene activity in bladder cancer cells. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2764-2778.



O conhecimento da atividade antitumoral de derivados naftoquinoidais obtidos a partir do lapachol (**1**) e da β -lapachona (**2**), via modificações estruturais planejadas, aliado ao conhecimento de compostos luminescentes e estratégias sintéticas para a junção da porção farmacofórica (quinoidal) e uma porção luminescente (2,1,3-Benzotiadiazola) possibilita direcionar esforços para a obtenção de lapachonas 1,2,3-triazólicas acopladas a um sistema luminescente com possível atividade farmacológica e padrão de fluorescência adequado para estudos de localização subcelular e, conseqüentemente, estudos de mecanismos de ação farmacológica. O entendimento destes processos em um curto espaço de tempo pode tornar mais eficiente o árduo processo de obtenção de fármacos antitumorais.

2. PROPOSTA DE TRABALHO

Publicações recentes na literatura exploram a fluorescência de compostos com atividade biológica para estudar sua localização subcelular,^{51,52} indicando a importância desse estratagema para a compreensão do mecanismo de ação de substâncias ativas. Neste contexto, este trabalho visa desenvolver uma metodologia sintética para a preparação de uma substância naftoquinoidal com potencial atividade antitumoral, acoplada a uma porção luminescente, permitindo estudos de localização subcelular e posteriores estudos de mecanismos de ação farmacológica.

A estrutura proposta (Figura 13) é baseada em derivados *orto*-furanonaftoquinônicos do lapachol, modificados no anel C, com a inserção do grupo 1,2,3-triazólico, uma vez que essa classe de substâncias mostrou atividade citotóxica promissora frente a linhagens de células tumorais.^{22,23} A porção luminescente escolhida é derivada do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola, acoplada a uma molécula de aminopiridina, que na literatura recente mostrou possuir características muito importantes para o uso em sistemas luminescentes, como alto rendimento quântico de fluorescência e alto deslocamento de Stokes e se mostrou eficiente na marcação seletiva de mitocôndrias.⁴⁴

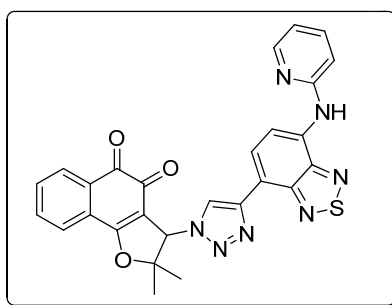
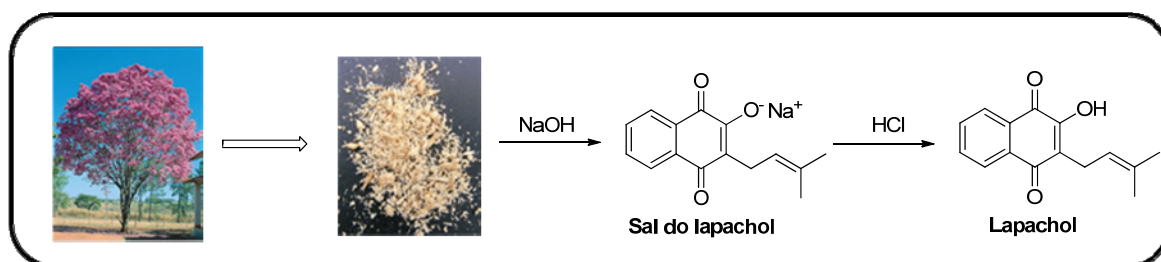


Figura 13. Estrutura da nor- β -lapachona 1,2,3-triazólica acoplada ao núcleo 2,1,3-benzotiadiazola.

Para esse objetivo sintético, propõe-se uma rota convergente (Esquemas 18-20), no qual os materiais de partida são o lapachol e a 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola.

51. Vendrell, M.; Zhai, D.; Er, J. C.; Chang, Y. T.; Combinatorial strategies in fluorescent probe development. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4391–4420.

O lapachol será extraído da serragem do cerne do ipê. Esse processo é facilmente realizado por extração ácido-base, *e.g.* NaOH, formando o sal do lapachol. A neutralização com HCl precipita o lapachol, que é filtrado e, após uma série de recristalizações em solvente orgânico (em geral hexano), é obtido com pureza apropriada para uso em síntese orgânica (Esquema 17).⁵³



Esquema 17. Extração do lapachol.

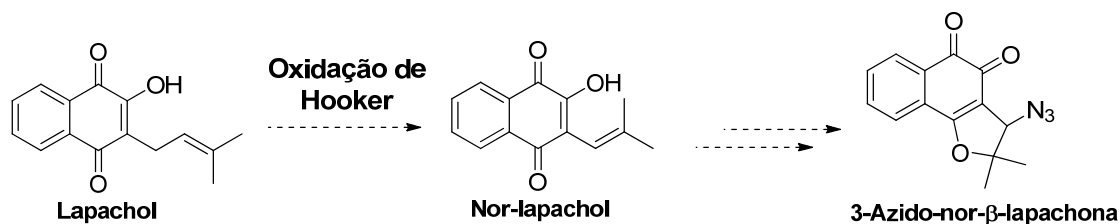
A partir do lapachol, será obtido o nor-lapachol de acordo com metodologia clássica descrita por Fieser,⁵⁴ conhecida como oxidação de Hooker. Após duas etapas, serão obtidos a 3-bromo-nor-β-lapachona, via reação de ciclização do nor-lapachol na presença de bromo em diclorometano, como previamente descrito,³¹ e em seguida, após uma reação de substituição nucleofílica, será inserido um grupo azida na quinona como descrito no Esquema 18.²² O derivado 3-azido-nor-β-lapachona será utilizada em uma reação de química click, uma importante reação de acoplamento entre um grupo azida e um alcino terminal, para formação de um anel 1,2,3-triazólico. É uma reação ambientalmente correta, estereoespecífica, com procedimentos experimentais simples e produtos obtidos em alto rendimento. Os subprodutos gerados apresentam baixa toxicidade e, em geral, podem ser removidos por métodos que não requerem cromatografia e, normalmente, as reações não apresentam sensibilidade em relação ao oxigênio e meio aquoso.⁵⁵

52. Citovsky, V.; Lee, L. Y.; Vyas, S.; Glick, E.; Chen, M. H.; Vainstein, A.; Gafni, Y.; Gelvin, S. B.; Tzfira, T.; Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation *in Planta*. *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 1120–1131.

53. Ferreira, V. F.; Aprendendo os conceitos de ácido e base. *QNEsc.* **1996**, *4*, 35-36.

54. Fieser, L. F.; Fieser, M.; Naphthoquinone Antimalarials. XII. The Hooker Oxidation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3215–3222.

55. Rostovtsev, V. V.; Green, G. L.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int.* **2002**, *41*, 2596-2599.



Esquema 18. Proposta para a obtenção do derivado 3-azido-nor-β-lapachona.

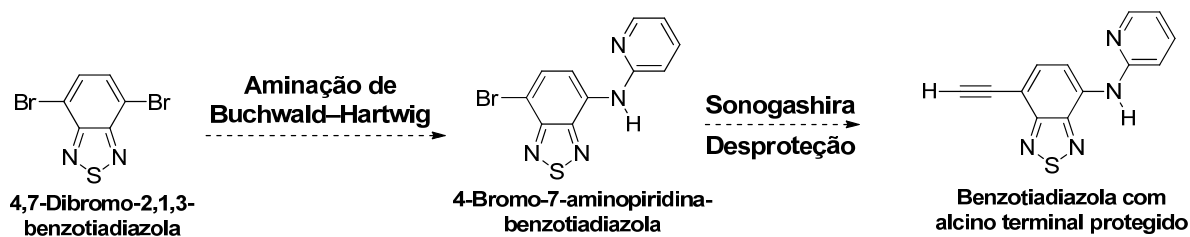
A 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola, por sua vez, será acoplada a uma molécula de aminopiridina, realizando-se uma reação conhecida como acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig,^{56,57} na presença de acetato de paládio, DPEphos e *tert*-butóxido de potássio em tolueno, resultando no produto de acoplamento, 4-bromo-7-aminopiridina-2,1,3-benzotiadiazola (Esquema 19). A inserção do grupo aminopiridina favorece a transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT, sigla em inglês), favorecendo sistemas luminescentes, como será discutido no próximo tópico. O próximo passo será a inserção de um alcino terminal no núcleo benzotiadiazola. Para tal será utilizado um alcino protegido, o trimetilsililacetileno. Essa inserção é realizada por meio de uma reação conhecida como acoplamento cruzado de Sonogashira.⁵⁸ Essa reação é catalisada por Pd(PPh₃)₂Cl₂ e será realizada sob condições de Sonogashira. O grupo protetor do alcino será retirado através da reação com fluoreto de potássio em metanol,⁵⁹ liberando assim a molécula com alcino terminal disponível para a próxima etapa (Esquema 19).

56. Shekhar, S.; Ryberg, P.; Hartwig, J. F.; Mathew, J. S.; Blackmond, D. G.; Strieter, E. R.; Buchwald, S. L.; Reevaluation of the Mechanism of the Amination of Aryl Halides Catalyzed by BINAP-Ligated Palladium Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3584-3591.

57. Csuk, R.; Barthel, A.; Raschke, C.; Convenient access to substituted acridines by a Buchwald-Hartwig amination. *Tetrahedron*. **2004**, *60*, 5737–5750.

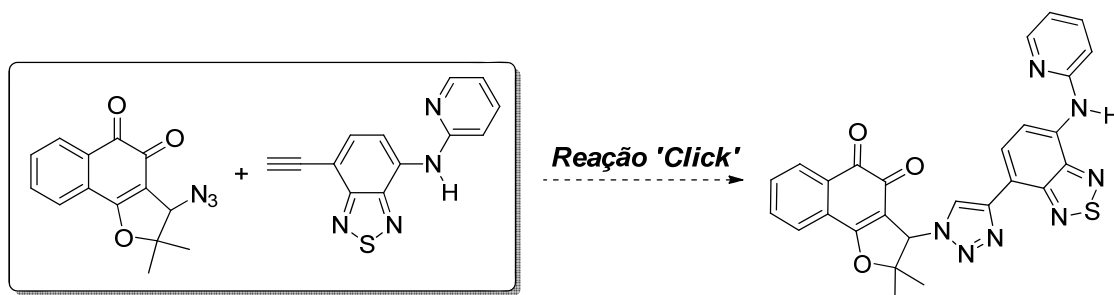
58. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N.; A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467-4470.

59. Saito, T.; Morimoto, M.; Akiyama, C.; Matsumoto, T.; Suzuki, K.; Stereocontrolled Convergent Total Synthesis of (f)-Furaquinocin D. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10757-10758.



Esquema 19. Proposta para a obtenção do derivado da 2,1,3-benzotriazola.

O acoplamento entre os derivados naftoquinoidais e benzotriazola será realizado através da reação de cicloadição de Huisgen, catalisada por Cu(I), reação conhecida como química “Click” (Esquema 20).⁵⁵



Esquema 20. Proposta para a obtenção do derivado da nor- β -lapachona acoplado ao núcleo 2,1,3-benzotriazola.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese da nor- β -lapachona acoplada ao núcleo 2,1,3-benzotiadiazola via química *click*.

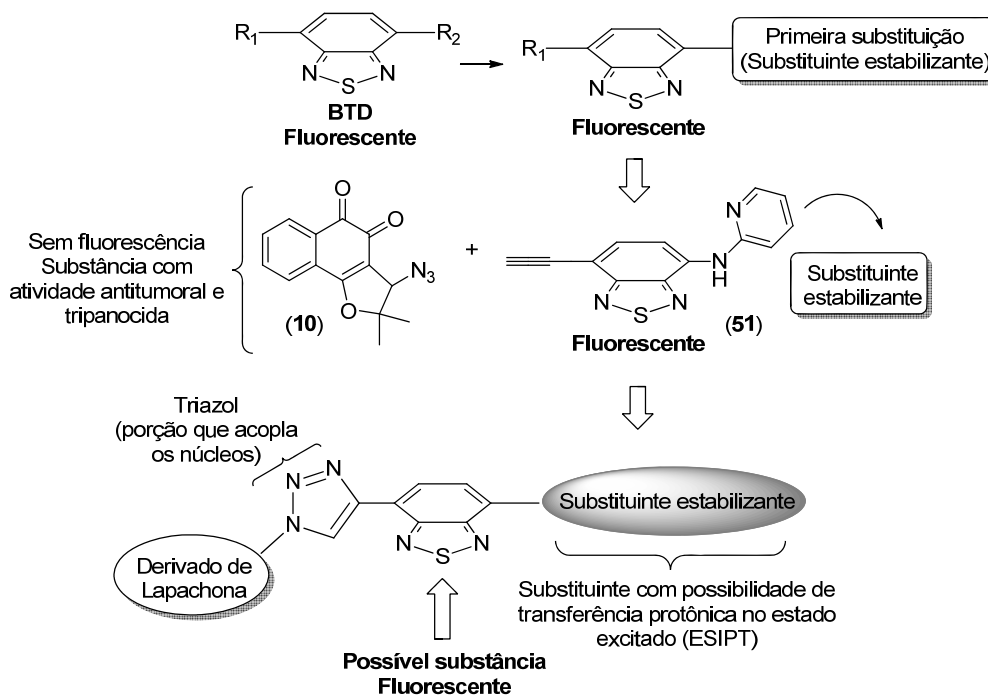
Como discutido anteriormente, nor- β -lapachonas 1,2,3-triazólicas apresentam destacada atividade antitumoral,¹⁸ tripanocida,^{26,27,28} antimicrobiana,⁶⁰ dentre outras não menos importantes. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu a atividade citotóxica de nor- β -lapachonas contra linhagens de células de leucemia.¹⁸ Diversos estudos foram realizados, visando o entendimento do mecanismo de ação das substâncias descritas. Os estudos sugerem que, aparentemente, a citotoxicidade dos compostos não envolve a inibição de topoisomerases, mas que o tratamento prejudica a atividade de reparação do ADN, provocando assim a morte celular.¹⁸

A fluorescência é uma técnica que emerge como aliada no entendimento dos mecanismos de atividade de substâncias com interesse farmacológico.⁴¹ Recentemente, Shaul e colaboradores⁴⁹ determinaram a localização subcelular de derivados antraciclínicos com atividade antitumoral, graças à fluorescência intrínseca desses compostos. Nesse ínterim foi do interesse deste trabalho acoplar uma porção luminescente a um derivado nor- β -lapachônico 1,2,3-triazólico, a fim de obter uma molécula com seu potencial bioativo aliado à capacidade de emitir fluorescência, o que irá permitir sua localização subcelular, possibilitando estudos mais detalhados sobre o mecanismo de ação intrinsecamente relacionado a essas estruturas.

Para compor a porção luminescente do análogo naftoquinoidal, foi selecionada a estrutura da BTD-aminopiridina, uma molécula que na literatura recente se mostrou eficaz na marcação seletiva de mitocôndrias como previamente discutido.⁴⁴ Essa molécula é derivada do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola, um composto comercialmente disponível e de grande uso na química de compostos luminescentes.⁴³ A esse núcleo foi acoplado uma molécula de aminopiridina, estendendo seu esqueleto π e conferindo a propriedade de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT, sigla em inglês), um mecanismo que estabiliza a molécula nesse estado estado mais energético e aumenta seu

60. Lourenço, A. L.; Abreu, P. A.; Leal, B.; da Silva Júnior, E. N.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Souza, A. M. T.; Novais, J. S.; Paiva, M. B.; Cabral, L. M.; Rodrigues, C. R.; Ferreira, V. F.; Castro, H. C.; Identification of nor- β -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against enterococcus faecalis clinical strain. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 684–689.

deslocamento de Stokes.⁶¹ A este composto foi inserido um alcino terminal para que, através da reação “Click”, fosse feito o acoplamento entre a porções fluorescente e bioativa (quinona). O Esquema 21 ilustra a estratégia para o desenho do derivado naftoquinoidal acoplado à 2,1,3-benzotiadiazola (Quinona-BTD).

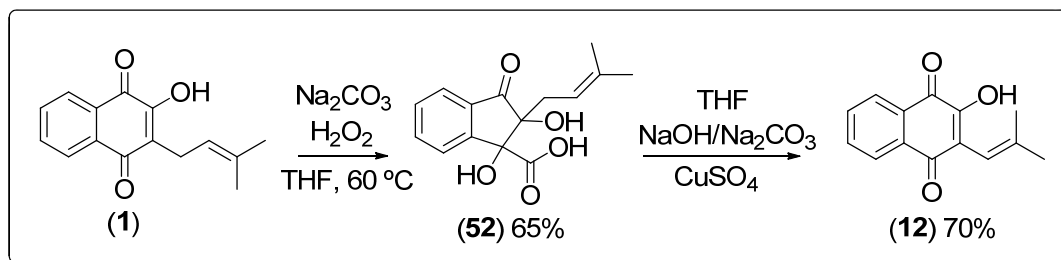


Esquema 21. Proposta para obtenção do composto luminescente com atividade biológica.

A proposta sintética se trata de uma rota convergente e a síntese dos compostos chave 3-azido-nor- β -lapachona (10) e do derivado 2,1,3-benzotiadiazola (51) para posterior acoplamento via reação de cicloadição 1,3-dipolar foi realizada com sucesso.

Para a obtenção do intermediário naftoquinoidal 3-azido-nor- β -lapachona (10), inicialmente, o material de partida, lapachol (1), foi convertido em nor-lapachol (12) via reação conhecida como oxidação de Hooker (Esquema 22).⁵⁴ O intermediário de Hooker (53), o qual foi utilizado para obtenção do nor-lapachol (12) em 70% de rendimento, foi preparado a partir do lapachol (1) em bom rendimento, 65%.

61. Zhao, J.; Ji, S.; Chen, Y.; Guo, H.; Yang P.; Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular



Esquema 22. Obtenção do nor-lapachol (**12**) via oxidação de Hooker.

Essa metodologia permite a obtenção do produto sem a necessidade de purificação por métodos cromatográficos. O intermediário de Hooker (**52**) foi obtido como um sólido branco com faixa de fusão entre 119-120 °C.

O nor-lapachol (**12**) foi obtido como um sólido alaranjado, faixa de fusão entre 119-120 °C. O espectro de RMN de ^1H (Figura 14) está em concordância com a literatura.³¹ Foram observados dois dupletos em δ 1,68 ($J = 1,2$ Hz) e em δ 1,99 ($J = 1,2$ Hz) referentes aos hidrogênios metílicos e dois multipletos referentes aos hidrogênios do anel aromático, em δ 8,20-8,08 e em δ 7,65-7,80. Os sinais em δ 8,20-8,08 mais desblindados são atribuídos aos hidrogênios vizinhos aos grupos carbonila que exerce um efeito característico a substâncias quinoidais deslocando os sinais para campo alto como mostrado na Figura 14.

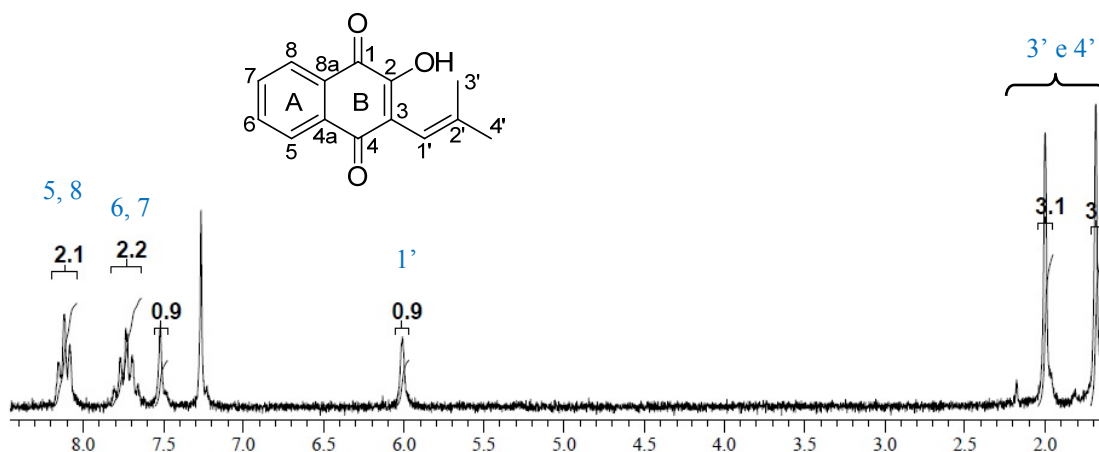
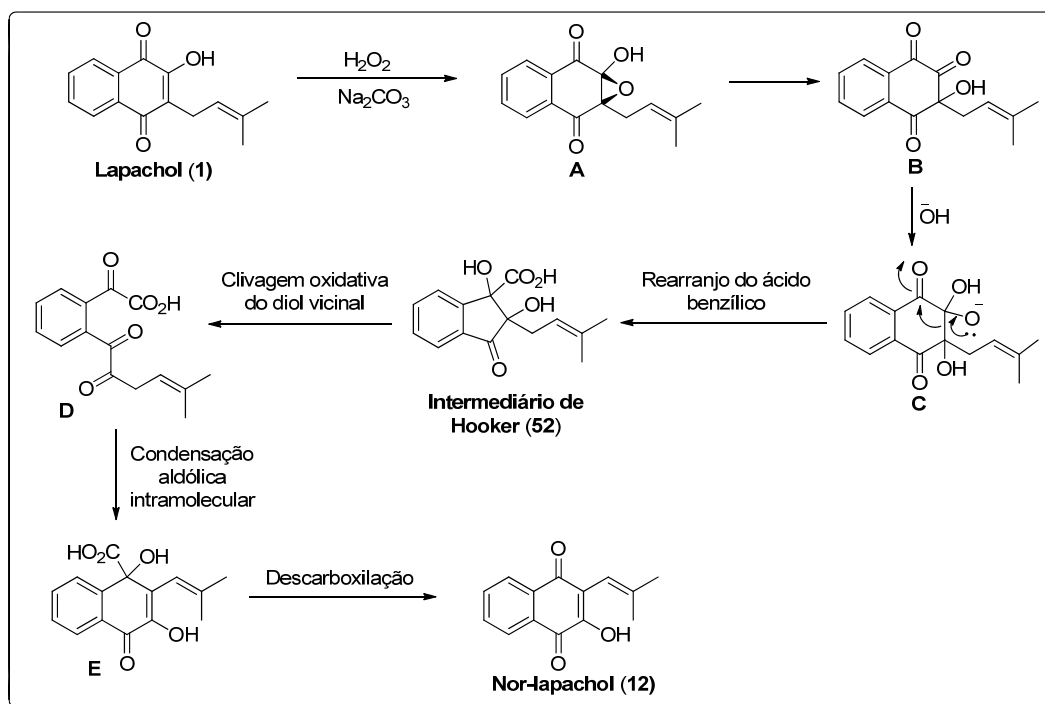


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H do nor-lapachol (**12**) (200 MHz, CDCl_3).

A primeira etapa, o método conhecido como oxidação de Hooker, leva o lapachol à perda de uma unidade metilênica (Esquema 23). O mecanismo dessa reação não foi completamente elucidado, mas se sabe que passa pela formação de um intermediário indanocarboxílico, também conhecido como “Intermediário de Hooker” (**52**).⁶² Recentemente, Eyong e colaboradores⁶³ descreveram uma proposta mecanística para a oxidação de Hooker (Esquema 23), iniciando com a oxidação da dupla ligação do anel quinoidal, levando ao intermediário instável epóxi-alcóol **A**. A abertura do epóxi em meio básico leva a **B**, que, através de um rearranjo do tipo “ácido benzílico” resulta no intermediário de Hooker (**52**). Uma clivagem oxidativa do diol vicinal leva a **D**, o qual, através de uma condensação aldólica intramolecular, leva a espécie **E**. Finalmente uma descarboxilação resulta no nor-lapachol (**12**).

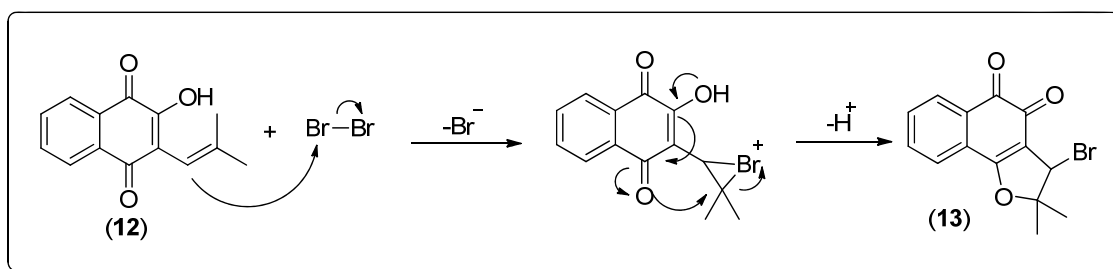


Esquema 23. Mecanismo proposto para a oxidação de Hooker (adaptado da Ref. 63).

62. Lee, K.; Turnbull, P.; Moore, H. W.; Concerning the mechanism of the Hooker oxidation. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 461-464.

63. Eyong, K. O.; Puppala, M.; Kumar, P. S.; Lamshöft, M.; Folefoc, G. N.; Spitteller, M.; Baskaran S.; A mechanistic study on the Hooker oxidation: synthesis of novel indane carboxylic acid derivatives from lapachol. *Org. Biomol.Chem.* **2013**, *11*, 459-468.

A próxima etapa foi a preparação do derivado bromado (**13**), a partir do norlapachol (**12**) em reação com Br₂ em diclorometano a baixa temperatura. Essa reação tem início com a adição do bromo à dupla ligação, formando o íon bromônio. Um ataque nucleofílico pelo par de elétrons do oxigênio leva a formação do produto (Esquema 24).³¹



Esquema 24. Mecanismo de formação do derivado bromado **13**.

Houve a formação do produto de coloração alaranjada, com rendimento quantitativo. Apesar da instabilidade do produto, que em geral é preparado e utilizado logo em seguida, uma pequena fração da substância foi isolada e imediatamente caracterizada por RMN de ¹H. Foram observados dois simpletos referentes aos hidrogênios dos dois grupos metila em δ 1,60 e 1,85, um sinal simpleto em δ 5,30, referente ao hidrogênio do carbono ligado ao bromo e dois multipletos referentes aos hidrogênios do anel aromático, em δ 8,20-8,10 e em δ 7,80-7,60 (Figura 15). O sinal simpleto em δ 5,30 referente ao hidrogênio 3 foi propositalmente destacado devido à próxima etapa sintética envolver a troca do átomo de bromo pelo grupo azida e o efeito de blindagem característico para o hidrogênio neste sítio confirma a obtenção do produto 3-azido-nor- β -lapachona (**10**).

Outro sinal característico foi observado como um multipletto em δ 8,20-8,10 referente ao hidrogênio 6 que devido ao efeito das carbonilas (*orto*), apresenta-se mais desblindado. Este sinal foi assinalado considerando dados previamente descritos.⁶⁴

64. da Silva Júnior, E. N.; de Souza, M. C. B. V.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Nogueira, C. M.; Ferreira, V. F.; Azeredo, R. B. V.; Complete and unambiguous assignments of ¹H and ¹³C chemical shifts of new arylamino derivatives of *ortho*-naphthofuranquinones. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 1158-1162.

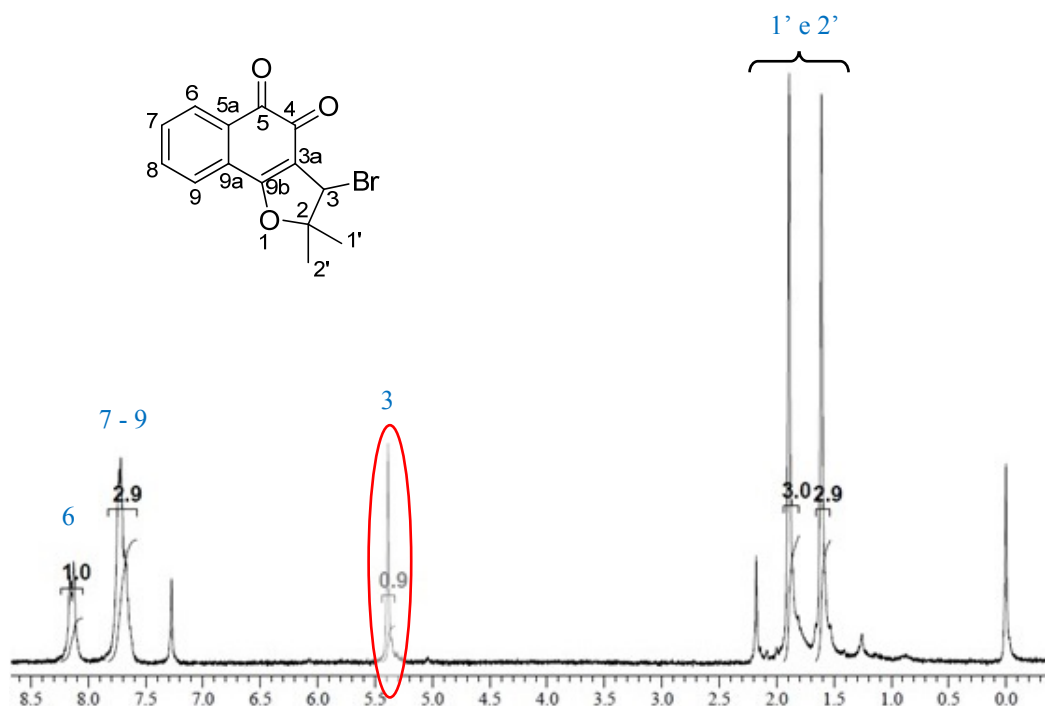
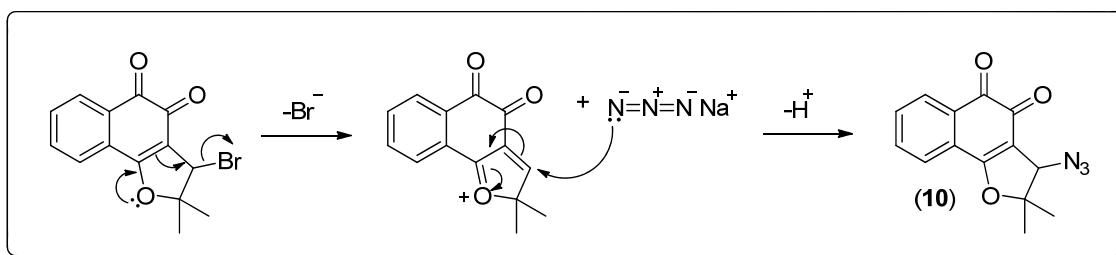


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H da 3-bromo-nor-β-lapachona (**13**) (200 MHz, CDCl₃).

A reação de substituição do bromo no composto **13** por azida foi realizada pela reação entre **13**, e azida de sódio (excesso) em diclorometano.²² O mecanismo de substituição ocorre com a assistência anquimérica exercida pelo par de elétrons do oxigênio do anel C, facilitando a saída do bromo com a formação do cátion oxônio. Então ocorre o ataque do grupo azida na espécie positiva formada, como mostrado no Esquema 25.



Esquema 25. Mecanismo de formação do composto **10**.

O rendimento da reação foi quantitativo e o produto obtido como um sólido amarelo com ponto de fusão de 200-202°C. O espectro de RMN de ¹H (Figura 16) está concordante com a literatura,²⁶ revelando dois simpletos referentes aos hidrogênios dos

dois grupos metila em δ 1,60 e δ 1,85. Multipletos em δ 8,20-8,10 e δ 7,80-7,65 referentes aos hidrogênios do anel aromático e um simpleto em δ 4,70 referente ao hidrogênio do carbono ligado ao grupo azida.

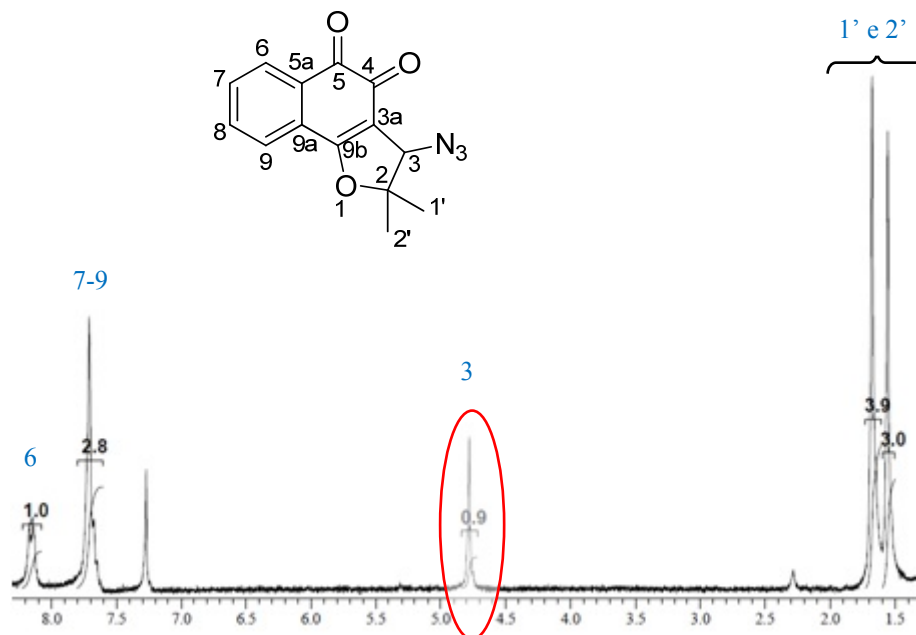
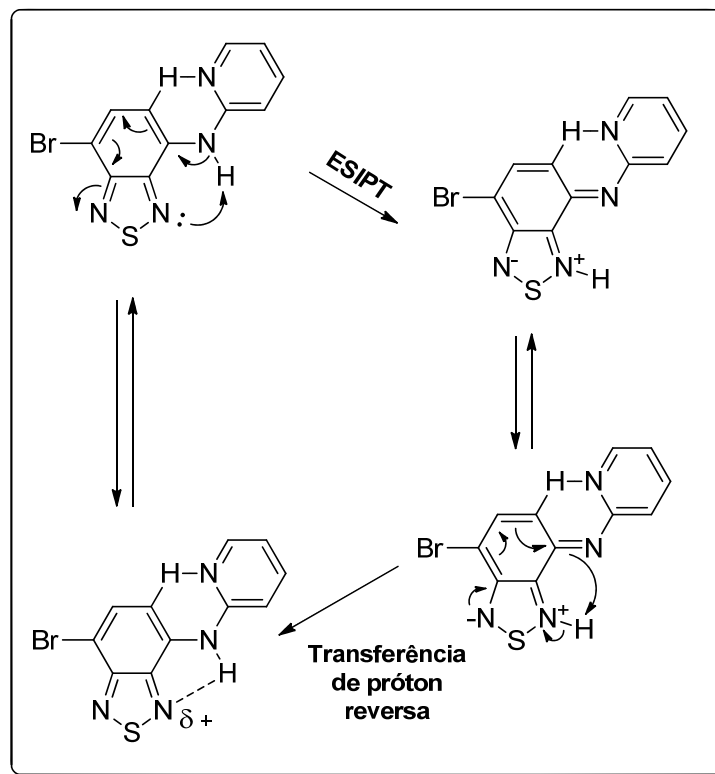


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H da 3-azido-nor- β -lapachona (**10**) (200 MHz, CDCl_3).

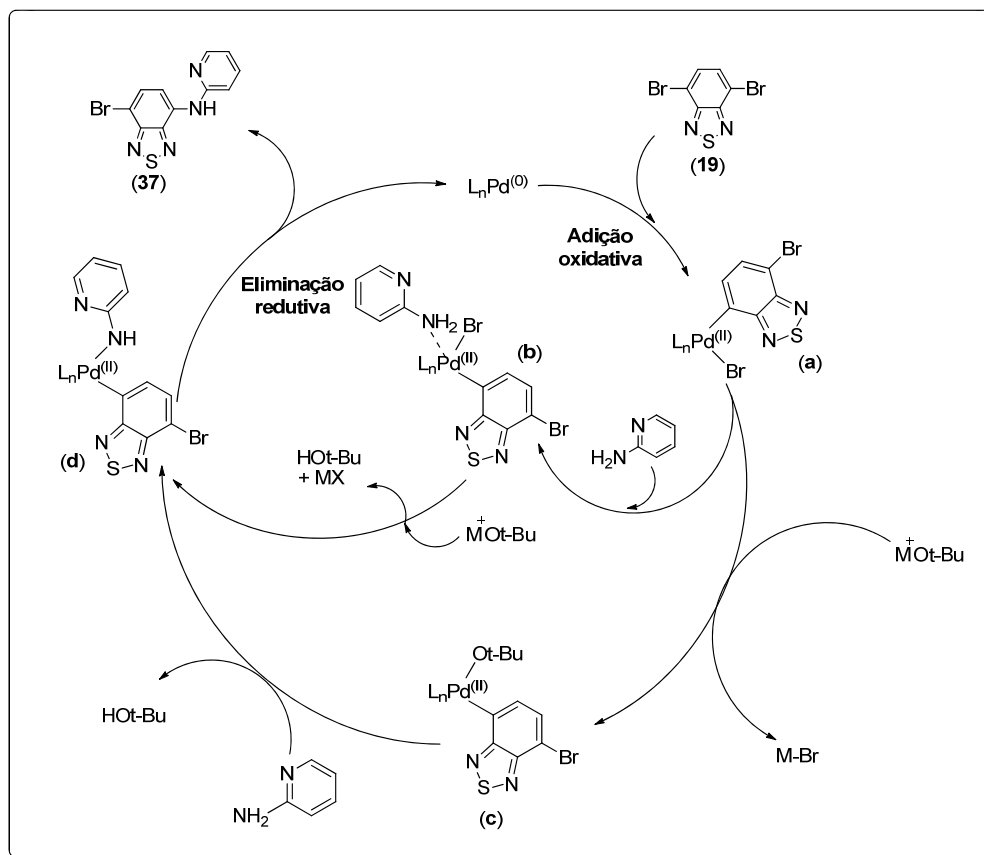
Após a preparação do análogo azido quinoidal foi iniciado a síntese do derivado da 2,1,3-benzotiadiazola, necessária para a conclusão da rota sintética proposta.

Para a síntese do composto BTD-aminopiridina acoplado a um alcino terminal, o material de partida foi a 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola (**19**), comercialmente disponível. A primeira etapa foi o acoplamento da 4,7-dibromo-BTD (**19**) ao grupo aminopiridina, a fim de obter o composto (**37**), o qual, como relatado na literatura, foi eficiente como marcador fluorescente seletivo para mitocôndrias, como discutido anteriormente.⁴⁴ Sabe-se que esse composto é capaz de realizar transferência intramolecular protônica no estado excitado (ESIPT), através de um mecanismo zwitteriônico, no qual o próton da amina é transferido para um dos nitrogênios do núcleo benzotiadiazola, como mostrado no Esquema 26.



Esquema 26. Mecanismo de ES IPT do composto **37**, adaptado da referência 46.

O acoplamento da aminopiridina na 2,1,3-benzotriazola foi realizado através da reação de Buchwald-Hartwig⁵⁶ e, interessadamente, como descrito por Neto e colaboradores, ao acoplar-se a amina, o sistema é desativado para uma segunda reação de acoplamento e apenas o produto monossustituído é obtido.⁴⁴ Como proposto por Shekhar colaboradores,⁶⁵ essa reação tem início com a adição oxidativa do Pd⁰ no haleto de arila correspondente. Na sequência, a estrutura **d** pode ser formada por duas possíveis vias: **(i)** pela substituição direta do haleto pela amina, através da formação de uma espécie com o nitrogênio da amina coordenado ao paládio **(b)**. A base forte então abstrai um próton da amina. **(ii)** através de um intermediário alcóxido-Pd(II) **(c)**. O grupo alcóxi retira um próton da amina e é substituído por esta levando à espécie **d**. Por fim, uma eliminação redutiva resulta no produto de acoplamento e regenera o catalisador (Esquema 27).⁶⁵



Esquema 27. Ciclo catalítico do acoplamento de Buchwald-Hartwig (adaptado da Ref. 65).

O produto foi obtido em 47% de rendimento como um sólido amarelo com ponto de fusão na faixa de 147-149°C. O espectro de RMN de ^1H (Figura 17) se mostrou de acordo com a literatura.⁴⁴ Foi realizado um experimento de RMN de ^{13}C -APT, que é uma técnica capaz de diferenciar os átomos de carbono com relação ao número de hidrogênios diretamente ligados. Carbonos quaternários e carbonos ligados a 2 átomos de hidrogênio aparecem em fase diferente dos carbonos ligados a 1 ou 3 átomos de hidrogênio. Neste espectro (Figura 18), foi possível se observar em todos os sinais dos carbonos monohidrogenados (δ 147,7; 137,6; 133,9; 116,4; 111,6 e 111,3) e quaternários (154,0; 152,9; 147,9; 132,2 e 102,4).

65. Kürti, L.; Czako, B.; Strategic applications of named reactions in organic synthesis. Elsevier Academic Press, Boston. 2005. p. 70.

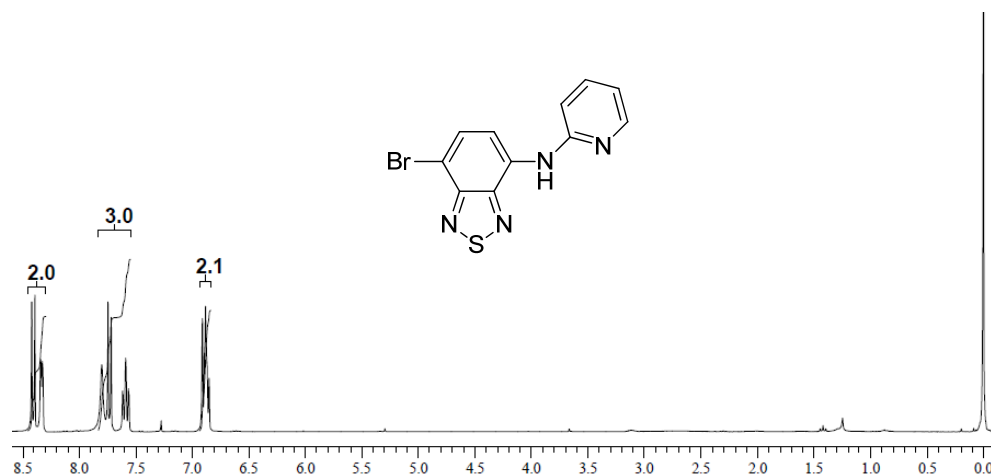


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H da Br-BTD-aminopiridina (**37**) (300 MHz, CDCl_3).

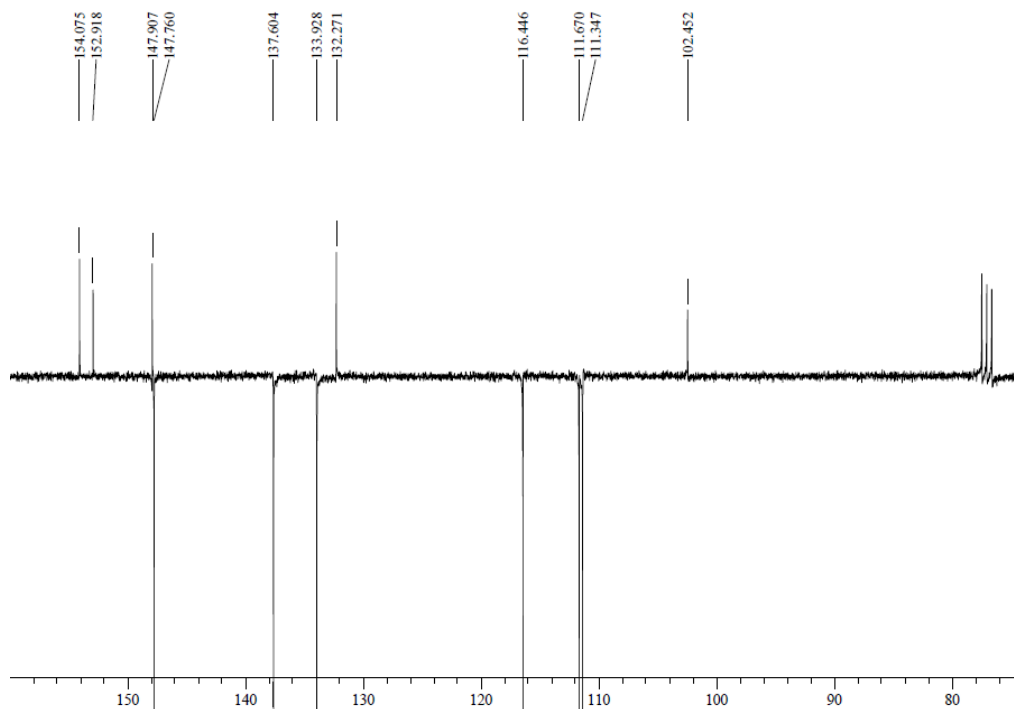
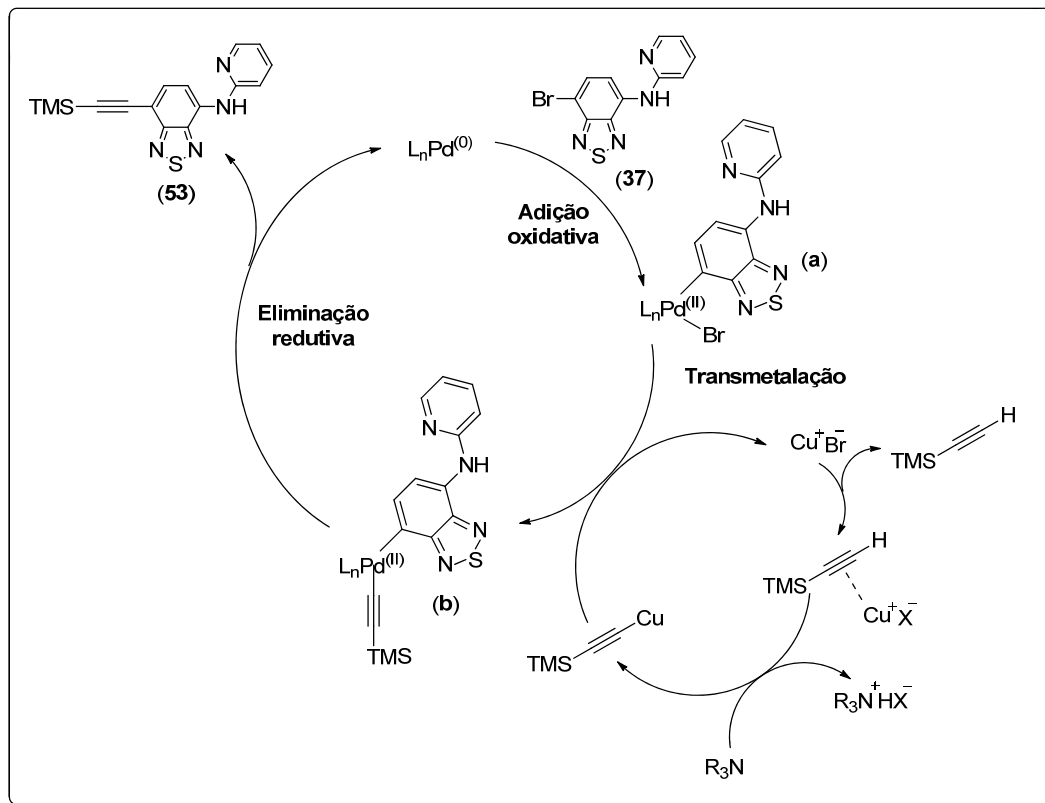


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C -APT do composto (**37**) (75 MHz, CDCl_3).

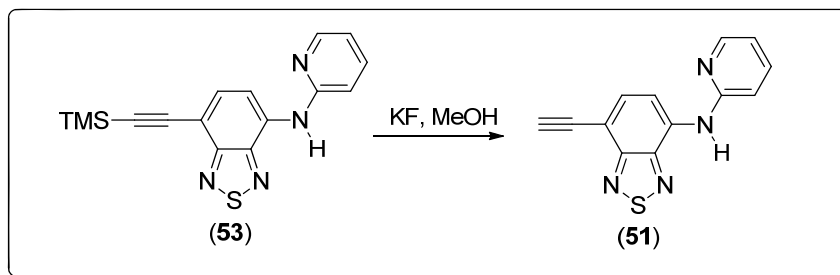
A próxima etapa consistiu em acoplar um alcino terminal ao núcleo da BTD-aminopiridina (**37**). Para tal foi escolhido o alcino protegido trimetilsililacetileno, a fim de evitar que um duplo acoplamento ocorresse ao alcino. Foi realizado então um acoplamento cruzado de Sonogashira, reação utilizada para acoplar alcinos terminais a carbonos sp^2 . A primeira etapa é uma adição oxidativa do Pd^0 ao haleto de arila (**a**). Há a formação de um acetileno de cobre que então sofre uma transmetalização com (**a**) levando à formação de (**b**),

que por fim sofre uma eliminação redutiva, resultando no produto de acoplamento (**54**) (Esquema 28).



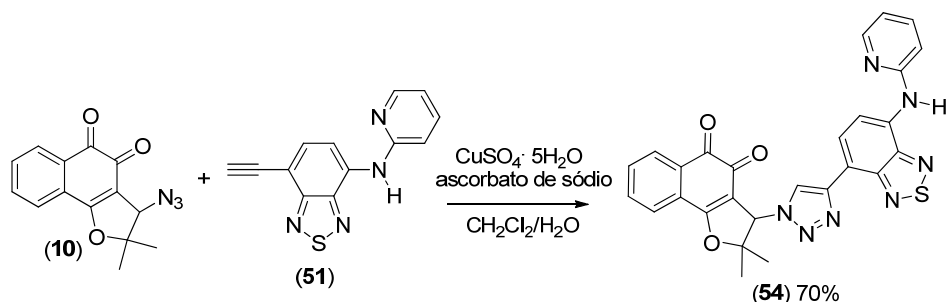
Esquema 28. Ciclo catalítico do acoplamento de Sonogashira (adaptado da Ref. 65).

Esse produto é instável e não pôde ser isolado. Ao término da reação foi realizada uma reação de desproteção com fluoreto de potássio em metanol a 50°C (Esquema 29). Esse método é muito utilizado para retirar grupos protetores com silício.⁵⁹ O produto formado (**55**) *in situ* foi, em seguida, utilizado na reação “Click”.



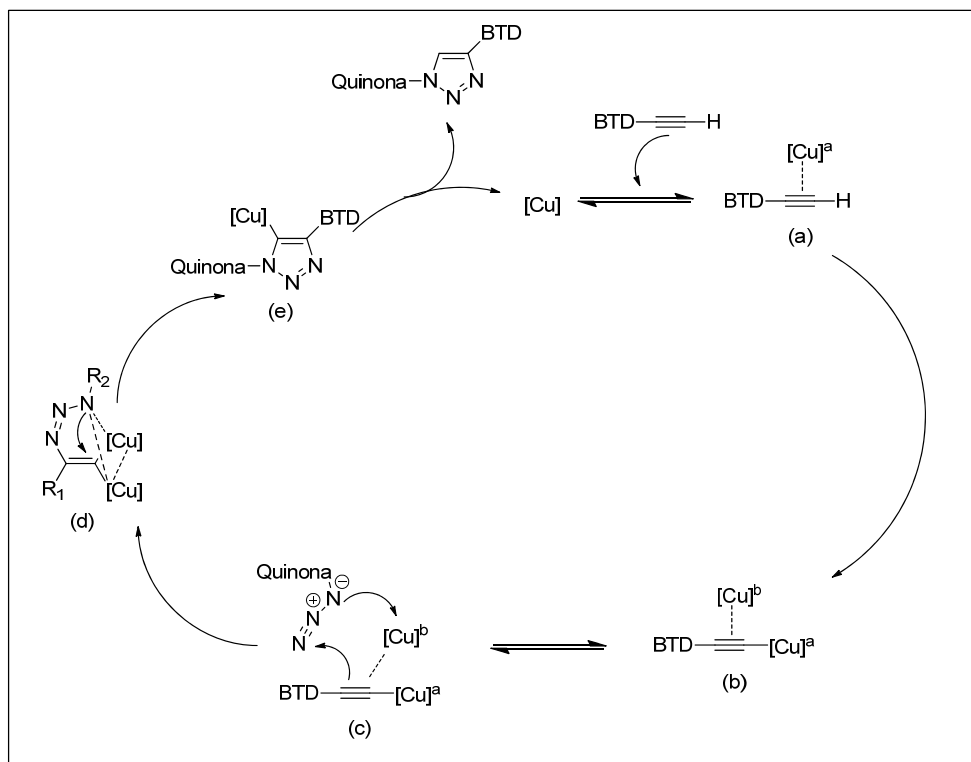
Esquema 29. Desproteção do alcino para a formação da substância **51**.

Foi então realizado o acoplamento entre o núcleo quinoidal (**10**) e a BTD (**51**) via reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I), também conhecida como química “Click”, obtendo-se o produto alvo inédito **54**, como descrito no Esquema 29.⁵⁵



Esquema 30. Obtenção da Quinona-BTD via química “Click”.

Quando o catalisador de Cu(I) é utilizado, essa reação é regioseletiva e leva a formação do triazol 1,4.⁶⁶ O catalisador escolhido foi o sulfato de cobre (II) pentahidratado, que é reduzido *in situ* à espécie ativa Cu(I), devido à presença do ascorbato de sódio. O mecanismo proposto atualizado foi publicado por Worrell e colaboradores e indica a participação de dois átomos de cobre quimicamente equivalentes agindo de forma concertada para a formação do triazol. Inicia-se com a coordenação (a) de um átomo de cobre ao alcino. Ocorre a formação do acetileto de cobre (b), o qual então coordena à azida, formando a espécie (c). O próximo passo é o ataque nucleofílico do nitrogênio da azida ao carbono β do acetileto que forma a primeira ligação covalente C-N, produzindo a estrutura (d), que rearranja para a estrutura (e), a qual, por fim, sofre uma eliminação redutiva levando ao triazol e regenerando o catalisador (Esquema 31).



Esquema 31. Ciclo catalítico de formação do triazol 1,4 (adaptado da ref. 66).

A quinona-BTD (**54**) foi obtida em 70% de rendimento, como um sólido alaranjado com uma faixa de fusão de 198,6-199,3°C. A substância **54** foi plenamente caracterizada via técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C . Foram também realizados experimentos de infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução. Em relação ao espectro de RMN de ^1H (Figura 19), destacam-se os sinais simples em δ 1,81 e δ 1,30, referentes aos hidrogênios metílicos, um simpleto em δ 5,30 bastante desblindado quando comparado ao derivado azido (**10**), referente ao hidrogênio do carbono metilênico ligado ao anel triazólico, e sinais multipletos em δ 8.60-8.15, δ 8.00-7.53 e δ 7.05-6.80, referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos. O espectro de ^{13}C (Figura 20) mostrou 27 sinais, assim como o esperado para a estrutura proposta.

66. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V.; Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*. **2013**, 340, 457-460.

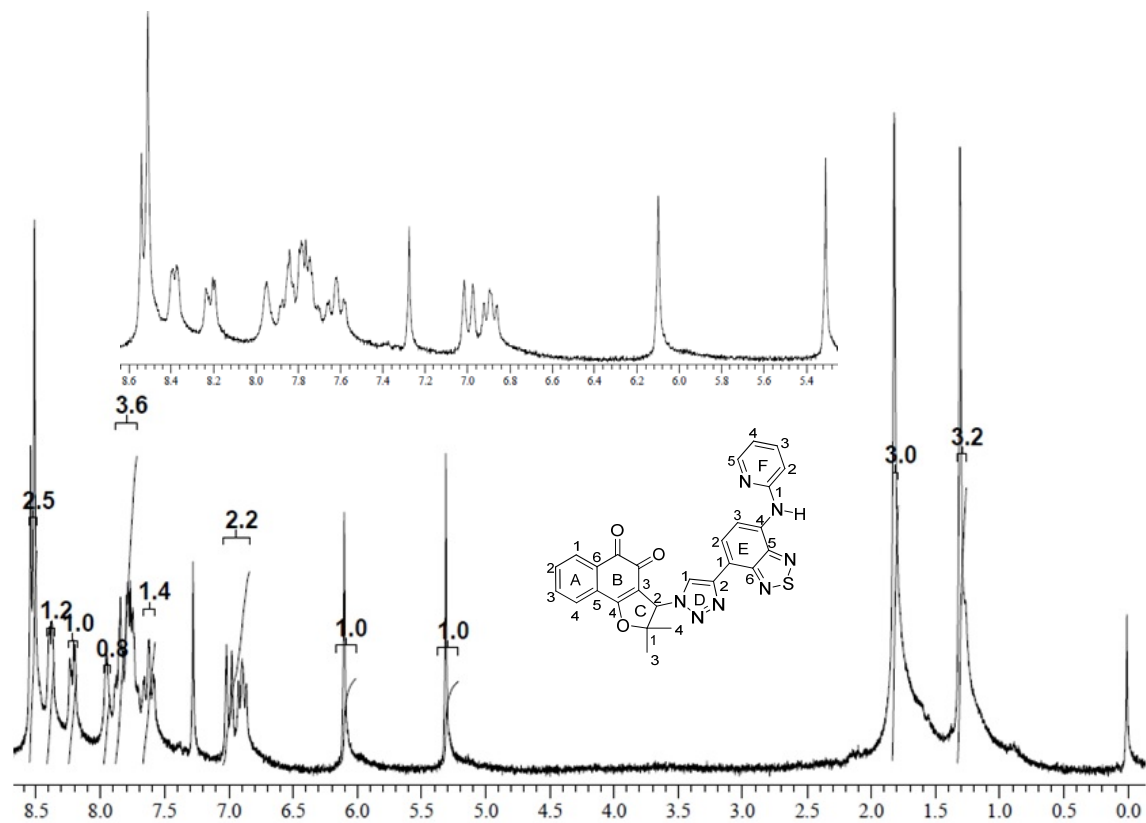


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da quinona-BTD (54) (200 MHz, CDCl_3).

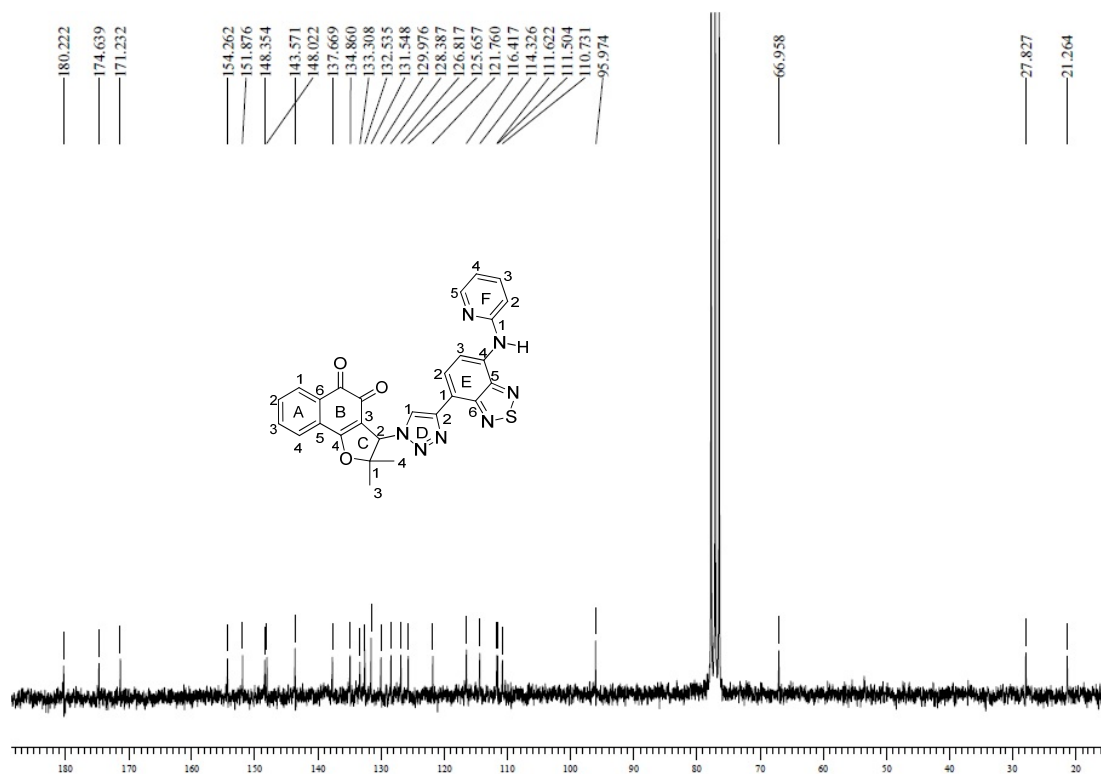


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C da quinona-BTD (54) (50 MHz, CDCl_3).

No espectro de massas de alta resolução (Figura 21), foi possível observar o valor de $522,1340$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, compatível com o valor calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_3\text{SH}^+ = 522,1348$.

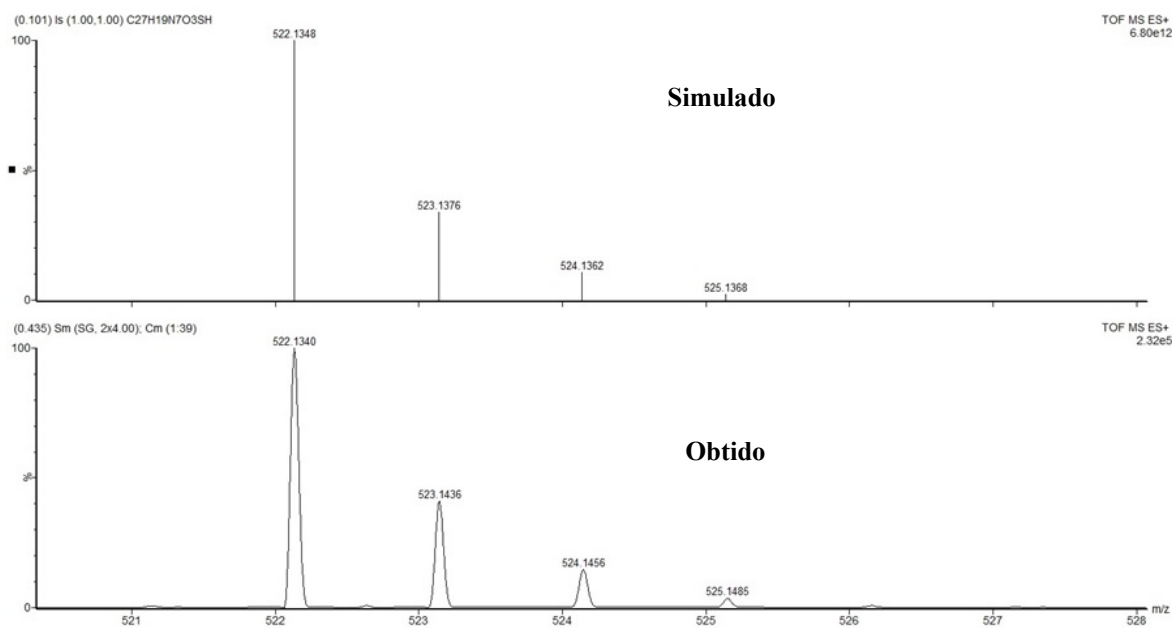


Figura 21. Espectro de massas de alta resolução da quinona-BTD (54).

3.2. Avaliação Farmacológica

A quinona-BTD (**54**) foi submetida a estudos farmacológicas e sua atividade citotóxica foi avaliada contra 20 linhagens de células tumorais e 3 linhagens de células normais. Estes estudos foram realizados em colaboração com grupo da Professora Doutora Cláudia Pessoa, da Universidade Federal do Ceará. Doxorubicina, um composto utilizado no tratamento do câncer, foi utilizado como controle positivo. Os compostos foram avaliados *in vitro*, baseado no ensaio MTT,⁶⁷ contra as seguintes linhagens celulares: MOLT-4 (leucemia), CEM (leucemia), K562 (leucemia), HL-60 (leucemia), OVCAR-8 (ovários), MDA-MB-435 (mama), MDA-MB-231 (mama), MCF-7 (mama), HS-578-T (mama), MX1 (mama), HS578t (mama), SW-620 (cólon), HCT-8 (cólon), COLO-205 (cólon), HCT-15 (cólon), SF295 (sistema nervoso central), PC3 (próstata), DU-145 (próstata), UACC-62 (melanoma) e NCI-H358 (carcinoma de pulmão de células não pequenas). As linhagens de células normais utilizadas foram V79 (fibroblastos murinos), L929 (fibroblatos murinos) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). A tabela 2 e a figura 22 apresentam os resultados obtidos. Nota-se que o derivado naftoquinoidal **54** foi altamente ativo ($IC_{50} < 2 \mu M$) frente a todas as linhagens de células tumorais, sendo que, em 6 delas (MDA-MB435, SF-295, HS578t, SW-620, HS-578-T e NCI-H358) foi mais ativo que o controle positivo, doxorubicina. Foi observado também que, frente às linhagens de células normais, **54** se mostrou muito menos citotóxico que a doxorubicina, sendo considerado apenas moderadamente ativo²¹ ($2 \mu M < IC_{50} < 10 \mu M$) frente a essas linhagens. Foi calculado o índice de seletividade, a razão entre as citotoxicidades das linhagens de células normais versus linhagens de células tumorais, calculada pela fórmula: IC_{50} (células normais) / IC_{50} (células tumorais), para a quinona-BTD **54** assim como para a doxorubicina. Os valores encontram-se na Tabela 3.

67. Mosmann, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55–63.

Tabela 2. Atividade citotóxica apresentada pelo quinona-BTD (**54**) e pelo controle positivo Doxorubicina.^a

Linhagens celulares	IC ₅₀ (µM) (95% CI)	
	54	Doxorubicina
HL-60	0,48 (0,30-0,59)	0,06 (0,007-0,011)
OVCAR-8	1,13 (0,97-1,32)	0,93 (0,79-1,06)
MDA-MB435	0,59 (0,44-0,74)	0,88 (0,65-1,02)
SF295	0,74 (0,69-0,78)	1,01 (0,87-1,25)
HCT-8	0,57 (0,47-0,69)	0,46 (0,34-0,52)
PC3	0,86 (0,70-0,97)	0,45 (0,38-0,53)
DU-145	0,80 (0,67-0,92)	0,37 (0,26-0,50)
MCF-7	1,24 (0,55-0,76)	0,61 (0,55-0,83)
MX1	0,63 (0,51-0,74)	0,14 (0,03-0,19)
HS578t	0,57 (0,42-0,78)	0,75 (0,58-0,92)
MOLT-4	0,53 (0,23-0,61)	0,09 (0,01-0,12)
CEM	0,59 (0,51-0,65)	0,04 (0,002-0,09)
K562	0,69 (0,57-0,86)	0,46 (0,31-0,64)
SW-620	0,55 (0,28-0,67)	0,77 (0,61-0,84)
COLO-205	0,78 (0,63-1,03)	0,59 (0,34-0,76)
HS-578-T	0,59 (0,42-0,74)	0,83 (0,64-1,03)
UACC-62	1,05 (0,93-1,16)	0,70 (0,52-0,81)
MDA-MB-231	0,61 (0,51-0,69)	0,62 (0,49-0,85)
HCT-15	0,57 (0,47-0,65)	0,41 (0,28-0,60)
NCI-H358	0,70 (0,59-0,80)	0,90 (0,73-1,14)
L929	2,84 (2,55-3,11)	0,51 (0,47-0,58)
V79	2,61 (2,27-3,02)	0,37 (0,18-0,56)
PBMC	3,98 (3,51-4,35)	0,90 (0,78-1,14)

^aResultados para linhagens celulares cancerosas e normais, obtidas por regressão não linear para todas as linhagens por 3 experimentos independentes.

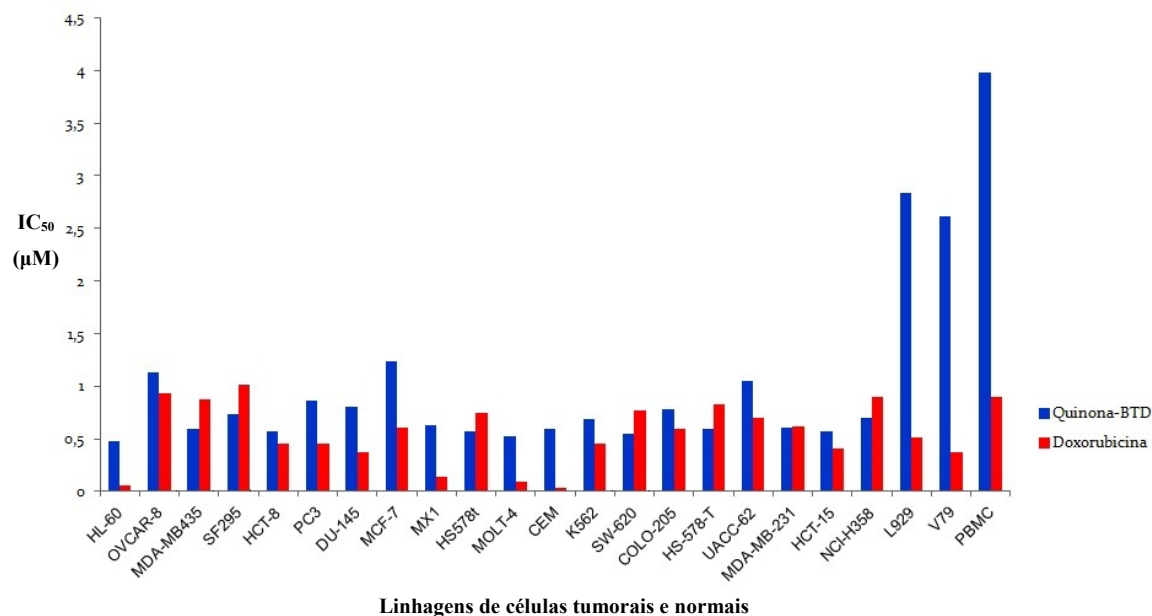


Figura 22. Atividade citotóxica contra vinte linhagens de células tumorais e três linhagens de células normais para a substância **54** e doxorubicina.

Tabela 3. Índice de seletividade [Razão entre as citotoxicidades, expressas como IC_{50} (μM), contra L929, V79 e PBMC e as linhas de células tumorais referidas]. Quinona-BTD (**54**) e doxorubicina entre parênteses.

Linhagens de células tumorais	Linhagens celulares normais		
	L929	V79	PBMC
HL-60	5,91 (8,5)	5,43 (6,16)	8,29 (15,0)
OVCAR-8	2,51 (0,54)	2,30 (0,39)	3,52 (0,96)
MDA-MB435	4,81 (0,57)	4,42 (0,42)	6,74 (1,02)
SF295	3,83 (0,50)	3,52 (0,36)	5,37 (0,89)
HCT-8	4,98 (1,10)	4,57 (0,80)	6,98 (1,95)
PC3	3,30 (1,13)	3,03 (0,82)	4,62 (2,0)
DU-145	3,55 (1,37)	3,26 (1,0)	4,97 (2,43)
MCF-7	2,29 (0,83)	2,10 (0,60)	3,20 (1,47)
MX1	4,50 (3,64)	4,14 (2,64)	6,31 (6,42)
HS578t	4,98 (0,68)	4,57 (0,49)	6,98 (1,20)

MOLT-4	5,35 (5,66)	4,92 (4,11)	7,50 (10,0)
CEM	4,81 (12,75)	4,42 (9,25)	6,74 (22,5)
K562	4,11 (1,10)	3,78 (0,80)	5,76 (1,95)
SW-620	5,16 (0,66)	4,74 (0,48)	7,23 (1,16)
COLO-205	3,64 (0,86)	3,34 (0,62)	5,10 (1,52)
HS-578-T	4,81 (0,61)	4,42 (0,44)	6,74 (1,08)
UACC-62	2,70 (0,72)	2,48 (0,52)	3,79 (1,28)
MDA-MB-231	4,65 (0,82)	4,27 (0,59)	6,52 (1,45)
HCT-15	4,98 (1,24)	4,57 (0,90)	6,98 (2,19)
NCI-H358	4,05 (0,56)	3,72 (0,41)	5,68 (1,0)

Observa-se que, em comparação com a doxorubicina, os índices de seletividade são favoráveis ao derivado naftoquinoidal, sendo que, em sua maioria, **54** apresenta valores maiores do que os valores observados para o controle positivo.

3.3. Fotofísica

As propriedades fotofísicas da quinona-BTD (**54**) foram avaliadas e estão na Tabela 4.

Tabela 4. Dados de fotofísica da quinona-BTD (**54**).

Substância	Solvente	λ_{\max} (abs)(nm) ^a	Log ϵ	(ϵ)	λ_{\max} (em)(nm) ^a	Deslocamento de Stokes (nm)
	Acetonitrila	446	3,95	9083	598	152
	Acetato de etila	453	3,72	5258	590	137
	Tolueno	459	3,93	8631	578	119
Quinona-BTD (54)	Diclorometano	455	4,00	10128	592	137
	Etanol	455	4,00	10067	605	150
	Hexano	465	4,02	10503	-	-
	DMSO	461	3,77	5927	614	153
	Água	444	3,27	1889	-	-

^a valores para soluções (10^{-4}).

Nas Figuras 23 e 24 são mostrados os espectros de UV-vis (absorção) e fluorescência (emissão) da substância **54**.

O rendimento quântico de fluorescência foi calculado através de comparação com um padrão de H-BTD-NHPy (**38**). A curva de absorção da quinona-BTD (**54**) e do padrão foram plotadas no mesmo gráfico e o ponto no qual as curvas se interceptaram foi anotado, para que nesse comprimento fosse excitada uma amostra de ambos. As áreas das curvas de excitação de **54** e da BTD foram utilizadas na seguinte equação:

$$\varphi_A = \varphi_P \cdot (\text{Grad}_A \cdot \eta_A^2) / (\text{Grad}_P \cdot \eta_P^2)$$

Onde:

φ_A = Rendimento quântico da amostra; φ_P = Rendimento quântico do padrão; Grad_A = Área da curva de emissão da amostra; Grad_P = Área da curva de emissão do padrão; η_A = Índice de refração do solvente da amostra; η_P = Índice de refração do solvente do padrão

O rendimento quântico de fluorescência encontrado para a substância (**54**) em acetonitrila foi 0,02, um valor considerado muito baixo para o uso como sistema luminescente. Como pode ser observada na Figura 25, a intensidade de fluorescência da quinona-BTD (**54**) em comparação com derivado da BTD (**38**) é muito pequena.

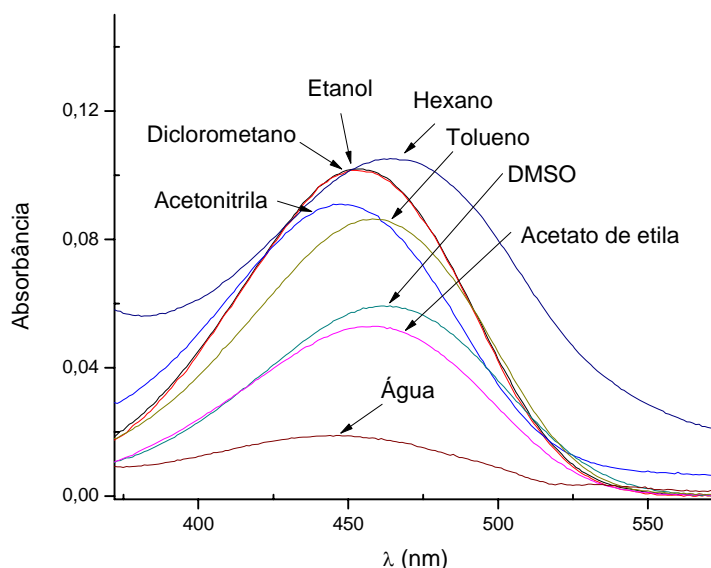


Figura 23. Espectros de absorção em diversos solventes para a quinona-BTD (**54**).

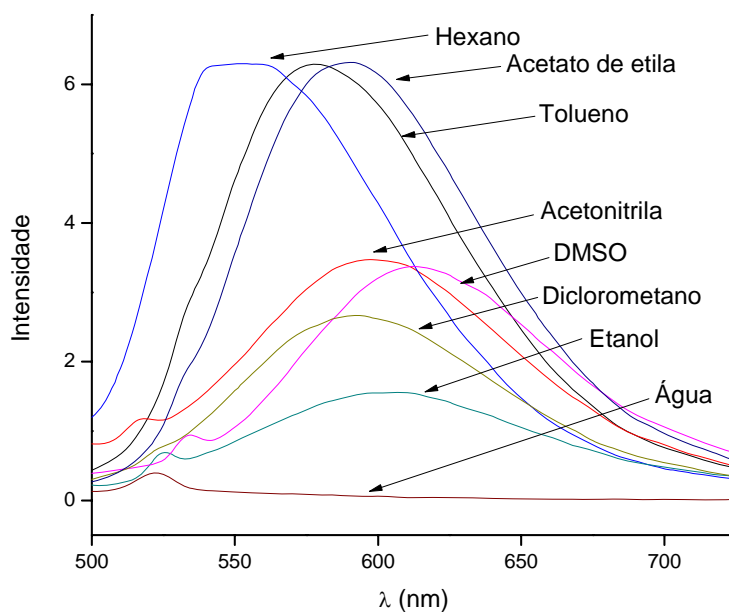


Figura 24. Espectros de emissão em diversos solventes para a quinona-BTD (54).

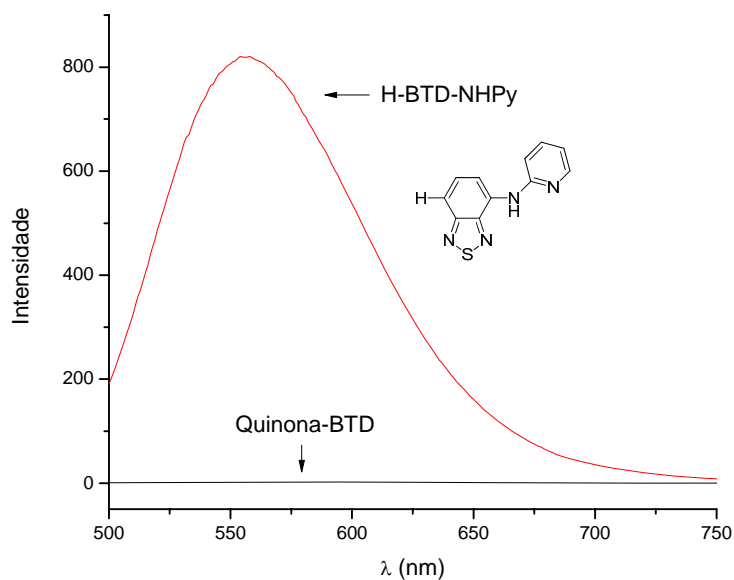


Figura 25. Espectros de emissão a quinona-BTD (54) e o derivado benzotiadiazólico (38).

Depois de avaliados os aspectos fotofísicos da quinona-BTD (54), foi notado que a quinona-BTD não apresenta características para atuar como agente luminescente, apesar de apresentar significativa atividade antitumoral. A molécula apresentou potente atividade

antitumoral, mas baixo padrão de luminescência com um valor de rendimento quântico de 0,02, quando comparado com a H-BTD-NHPy (**38**), que apresentou rendimento quântico igual a 0,31.⁴⁴

A baixa fluorescência de **54** pode ser atribuída a uma liberdade rotacional em torno da ligação triazólica-BTD, que pode ter desfavorecido a formação de estruturas bem ordenadas, interações $\pi-\pi^*$ e a conjugação do sistema como mostrado na Figura 26.

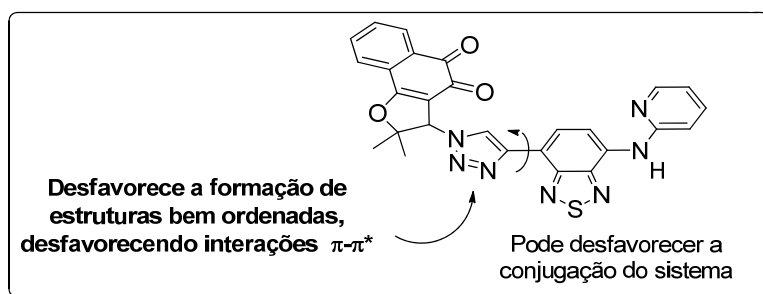


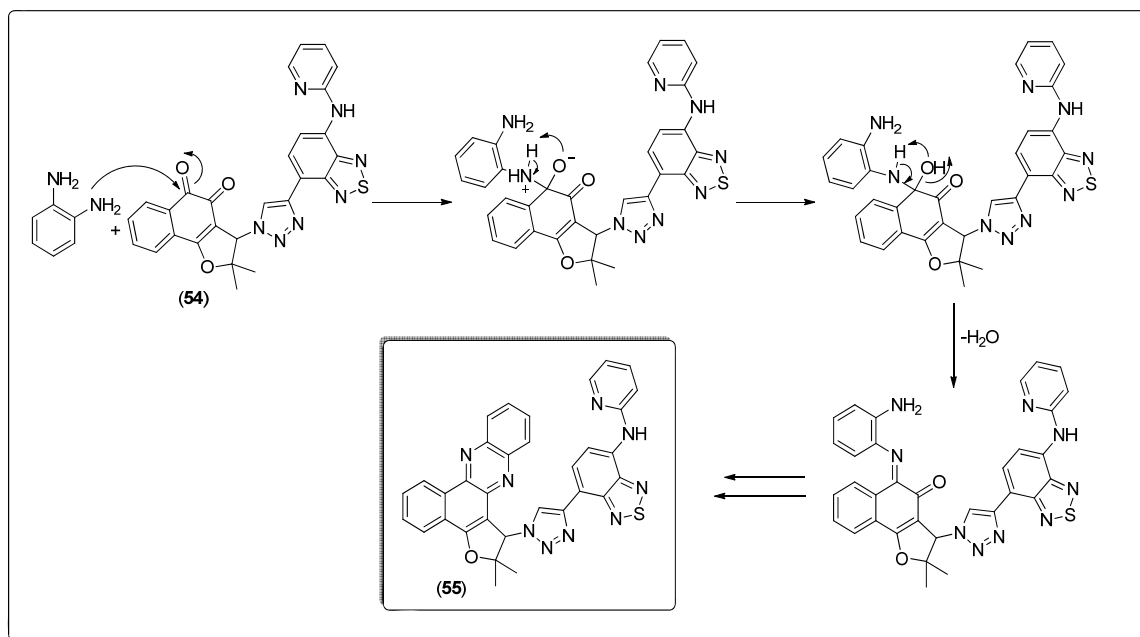
Figura 26. Hipótese para a perda da fluorescência na quinona-BTD (**54**).

3.4. Obtenção da Fenazina-BTD

Devido às propriedades fotofísicas apresentadas pela quinona-BTD (**54**) impossibilitarem a utilização desta molécula a fim de estudos de localização subcelular, foi decidido obter a fenazina desse composto, pois essa é uma classe de heterocíclicos que, em geral, apresentam fluorescência.⁶⁸ Vários derivados fenazínicos obtidos a partir de quinonas derivadas da família das lapachonas (foco deste trabalho) tiveram suas propriedades fotofísicas estudadas e foram consideradas como importantes corantes com aplicações diversas (Figura 27 e Esquema 32).⁶⁹

68. Mavrodi, D. V.; Blankenfeldt, W.; Thomashow, L. S.; Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* Spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2006**, *44*, 417-445.

69. (a) Pinto, A. V.; Pinto, C. N.; Pinto, M. C. F. R.; Emery, F. S.; de Moura, K. C. G.; Carvalho, C. E. M.; Brinn, I. M.; Fluorescent symmetric phenazines from the reactions of β -lapachone and nor- β -lapachone with ammoniating agents. *J. Chem. Research (S)*, **1999**, 650-651. (b) Carvalho, C. E. M.; Brinn, I. M.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Fluorescent symmetric phenazines from naphthoquinones 3. Steady-state spectroscopy and solvent effect of seven phenazine derivatives: structure–photophysics correlations. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2000**, *136*, 25–33. (c) Carvalho, C. E. M.; de Lucas, N. C.; Herrera, J. O. M.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Brinn, I. M.; Fluorescent symmetric phenazines from naphthoquinones 4. Solvent effect on time-resolved fluorescence. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2004**, *167*, 1–9.



Esquema 34. Mecanismo de formação da fenazina **55**.

A estrutura **55** também foi confirmada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D, por espectroscopia no infravermelho e por espectrometria de massas. No espectro de RMN de ^1H (Figura 28), destacam-se um duplo duplete duplo em δ 9,48, referente ao hidrogênio ligado ao carbono marcado como A1 na Figura 28, muito desblindado devido à compressão estérica exercida pelo par de elétrons do nitrogênio do grupo fenazina, simpleto em δ 6,77, referente ao hidrogênio E2. Um simpleto em δ 8,22, referente ao hidrogênio F1, pertencente ao anel triazólico. Um duplete em δ 8,52 e um duplete em δ 8,36, referentes aos hidrogênios G2 e G3, pertencentes ao núcleo benzotiadiazola. Um simpleto em δ 1,85 e um simpleto em δ 1,41, ambos referentes aos hidrogênios metílicos E3 e E4.

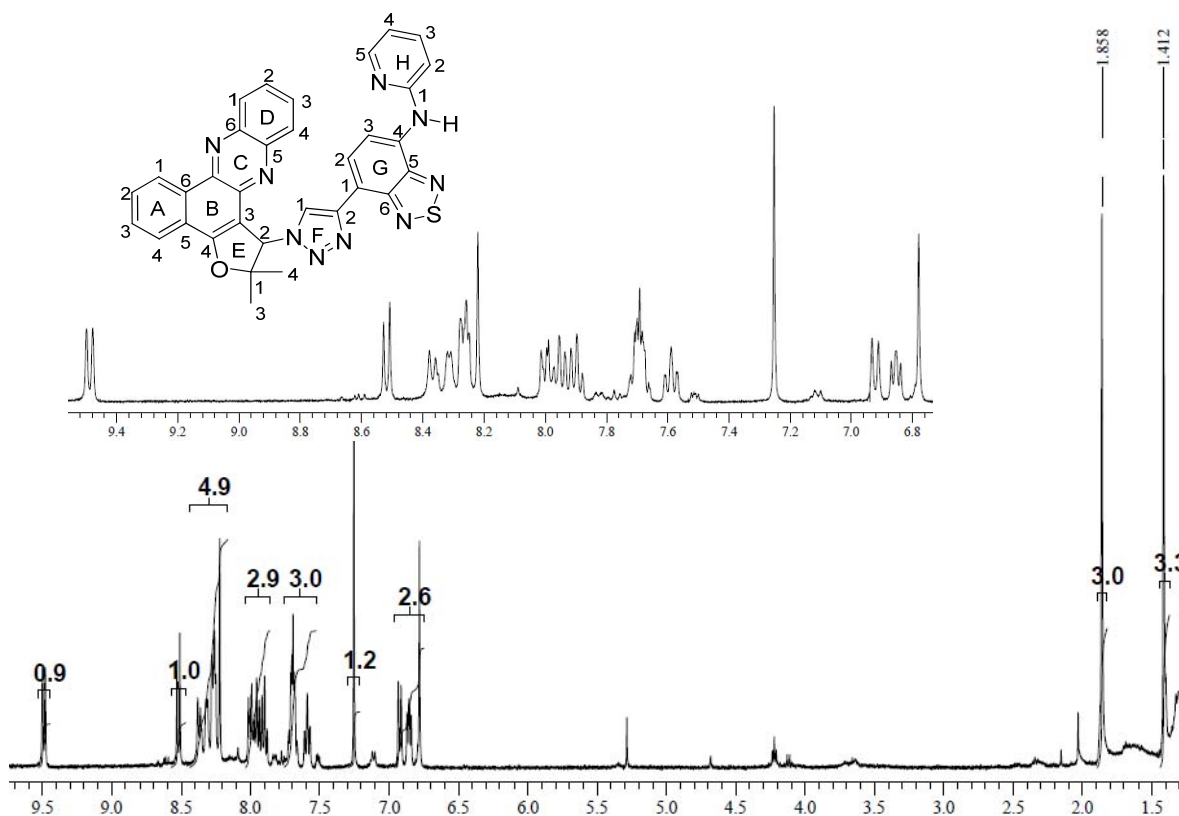


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da Fenazina-BTD (**55**) (400 MHz, CDCl_3).

Para a caracterização inequívoca do composto, fez-se necessário o uso de técnicas de RMN de 2D. As Figuras 29-36 mostram espectros de HSQC e HMBC obtidos em CDCl_3 . HSQC é uma técnica de RMN que permite correlacionar núcleos de diferentes tipos de átomos, que estejam ligados diretamente entre si, no caso o ^1H e o ^{13}C . Na Figura 29, podem ser identificados os sinais dos carbonos E3 e E4 através de suas correlações com os respectivos hidrogênios. A técnica de HMBC permite correlacionar núcleos de diferentes tipos de átomos que estão separados por duas ou mais ligações químicas. No espectro obtido é possível ver, através das manchas de correlações com os hidrogênios E3 e E4, os sinais dos carbonos E1, separado por duas ligações químicas e E2, separado por 3 ligações químicas.

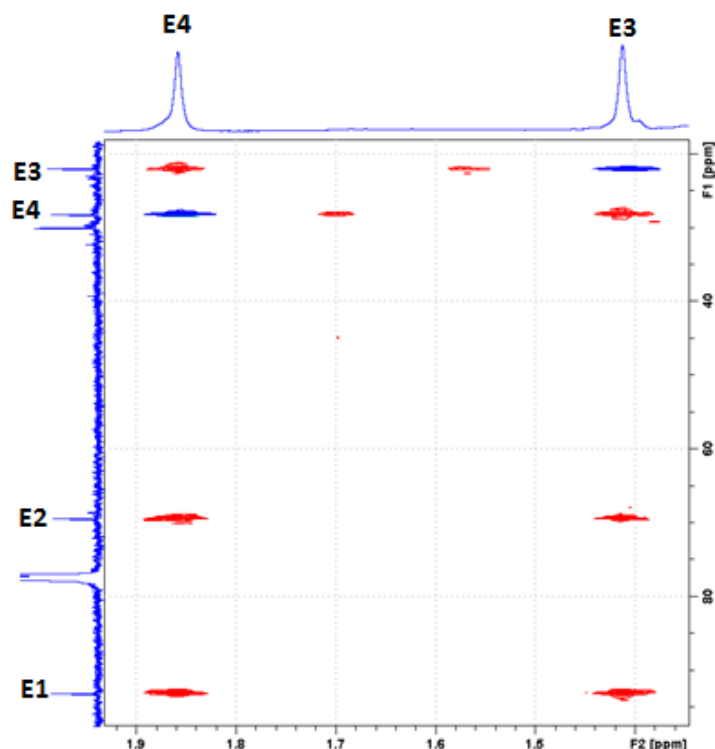


Figura 29. Expansão do espectro HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da substância (55) na região de δ 1,9 a 1,4 e 95 a 20 ppm (400 MHz, CDCl₃).

As Figuras 30-34 também mostram espectros de HSQC e HMBC superpostos na mesma imagem. Nota-se uma correlação no HMBC entre o hidrogênio E2 e o carbono F1, indicando o sucesso da reação “click” (Figura 30). Os carbonos H3 e H5 não foram bem registrados no experimento de RMN de ¹³C, porém são de fácil identificação nos espectros de HSQC e HMBC. O carbono H3 pode ser visto através de um sinal de HSQC mostrando sua correlação com o hidrogênio correspondente (Figura 34). De forma análoga é possível ver na Figura 32 o sinal de HSQC correlacionando o carbono H5 ao hidrogênio correspondente (Figura 32). Os sinais de G2 e G3 podem ser identificados através da correlação pelo HMBC existente entre o carbono G1 e o hidrogênio G2 (detalhe da Figura 31). O carbono G3, que não aparece no espectro de RMN de ¹³C devido ao tempo de relaxação, é notado por sua correlação no HSQC com o hidrogênio correspondente (Figura 34). Os carbonos G5 e G6 apresentam deslocamentos químicos bem similares e isso se torna claro ao analisar o espectro de HSQC (Figura 33). Todos os deslocamentos químicos relacionados aos átomos de carbono foram assinalados a partir dos espectros obtidos por detecção inversa.

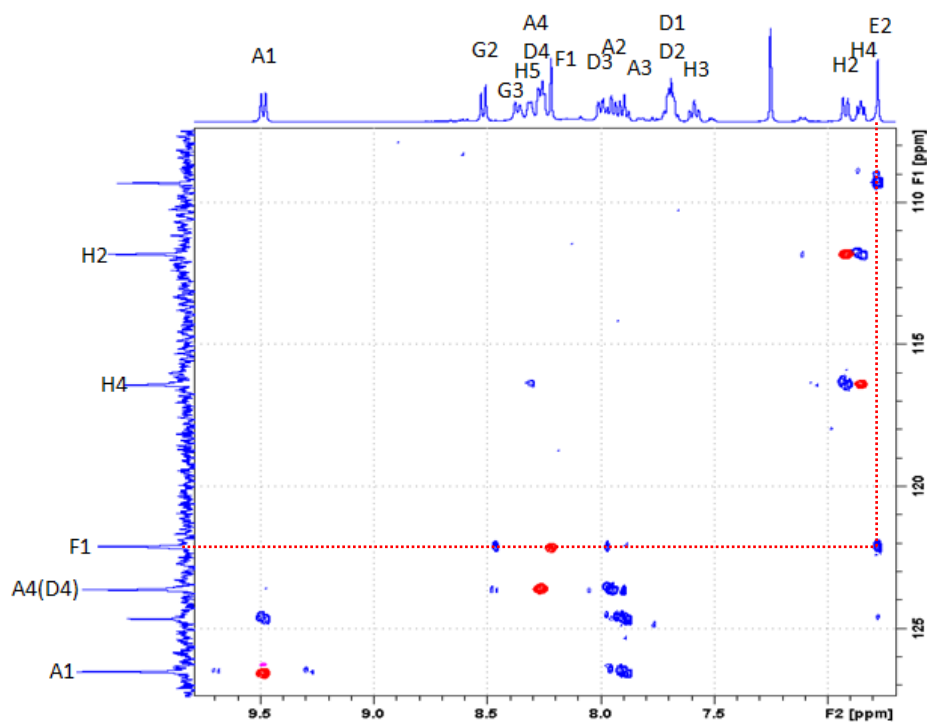


Figura 30. Expansão do espectro HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da substância (55) na região de δ 9,7 a 6,8 e 127 a 112 ppm (400 MHz, CDCl_3).

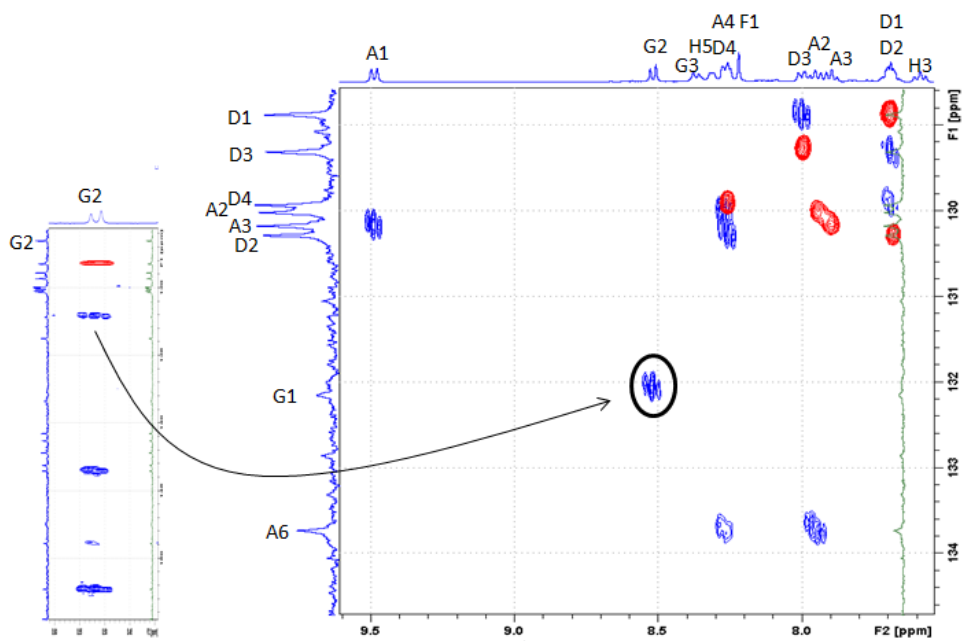


Figura 31. Expansão do espectro HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da substância (55) na região de δ 9,6 a 7,6 e 134 a 129 ppm (400 MHz, CDCl_3).

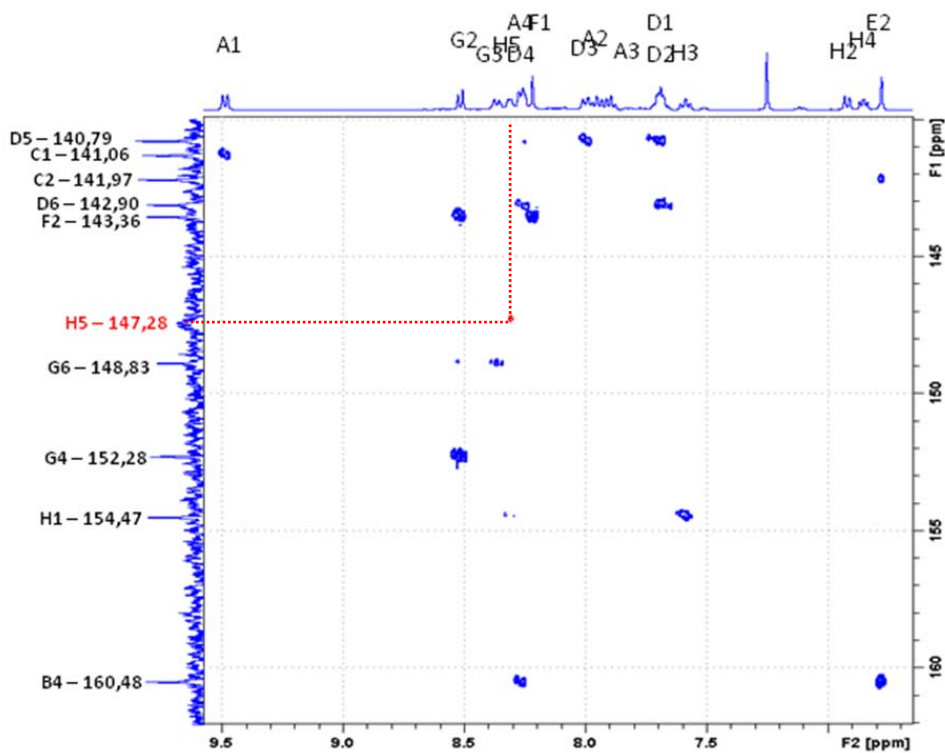


Figura 32. Expansão do espectro HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da substância (55) na região de δ 9,5 a 6,7 e 162 a 140 ppm (400MHz, CDCl_3).

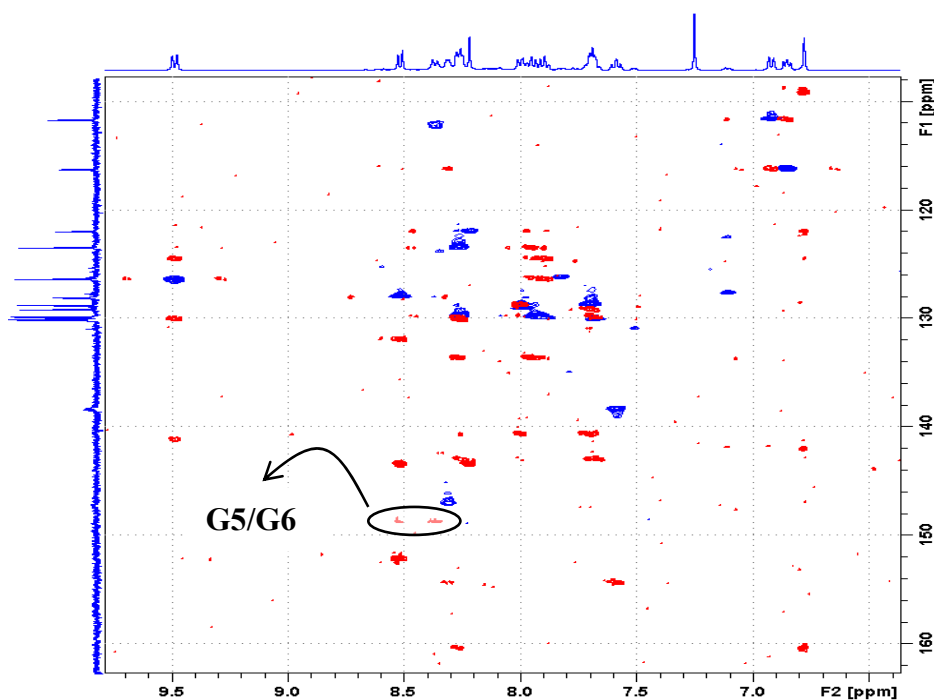


Figura 33. Expansão do espectro HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da substância (55) na região de δ 9,7 a 6,4 e 162 a 108 ppm (400 MHz, CDCl_3).

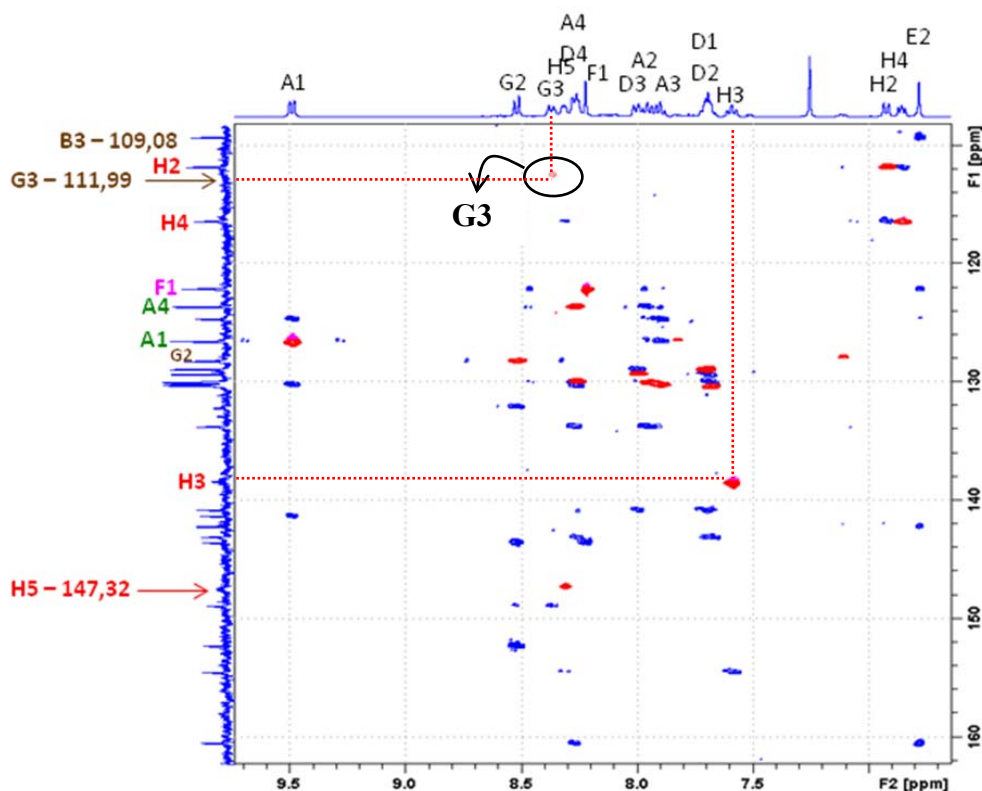


Figura 34. Expansão do espectro HSQC (vermelho) e HMBC (azul) da substância (**55**) na região de δ 9,7 a 6,7 e 162 a 110 ppm (400 MHz, CDCl_3).

Finalmente, por espectrometria de massas de alta resolução foi verificada a massa relacionada à BTD-Fenazina (**55**), como mostrado na Figura 35. A massa encontrada foi de 594.1780 $[\text{M}+\text{H}]^+$, compatível com o valor calculado para, $\text{C}_{33}\text{H}_{23}\text{N}_9\text{OSH}^+ = 594.1824$.

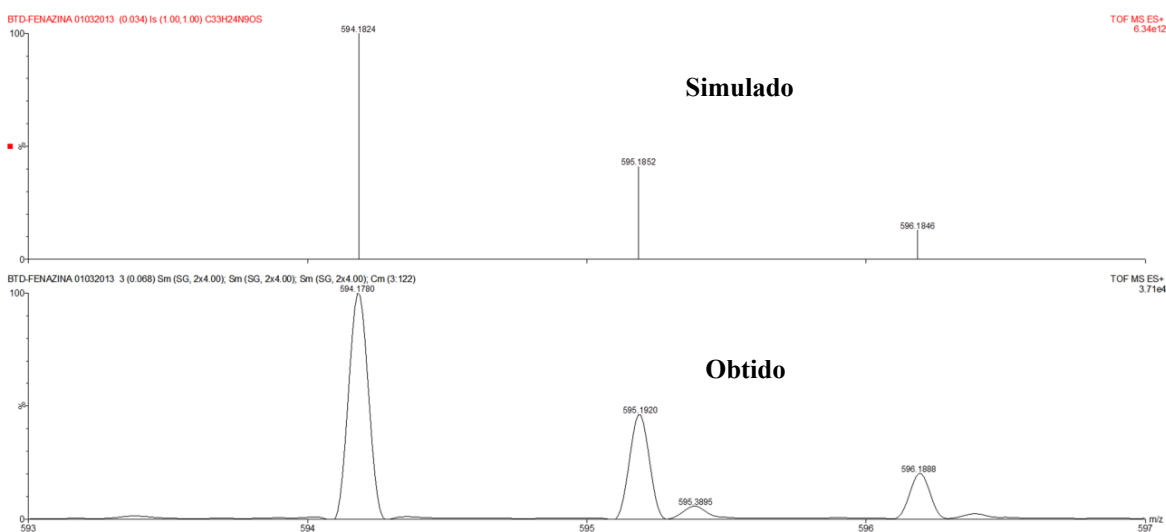


Figura 35. Espectro de massas de alta resolução da BTD-Fenazina (**55**).

A fim de verificar a atividade antitumoral da fenazina-BTD (**55**), esta foi submetida a teste de citotoxicidade frente às mesmas 20 linhagens de células tumorais e 3 linhagens de células normais assim como realizado com a quinona-BTD (**54**). Infelizmente, os resultados de citotoxicidade não foram animadores, e para todas as linhagens avaliadas, tanto de câncer como células normais, o valor de IC_{50} foi $> 42 \mu M$. Nesse aspecto como substância antitumoral a fenazina-BTD não se mostrou uma molécula ideal, mas a fim de avaliar suas características como luminescente, suas propriedades fotofísicas foram estudadas, assim como seu potencial uso como marcador celular, tendo em vista que, sua baixa citotoxicidade a torna um excelente candidato para este fim.

A fenazina-BTD (**55**) mostrou interessantes propriedades fotofísicas, rendimento quântico de fluorescência calculado em acetonitrila de 0,11 e, sendo praticamente não tóxico, permitiu ser testado como sonda fluorescente no ambiente celular. As propriedades fotofísicas da fenazina-BTD (**55**) foram avaliadas e sumarizadas na Tabela 5. Nas Figuras 36 e 37 são apresentados os espectros de UV-vis (absorção) fluorescência (emissão) desse composto, em diversos solventes.

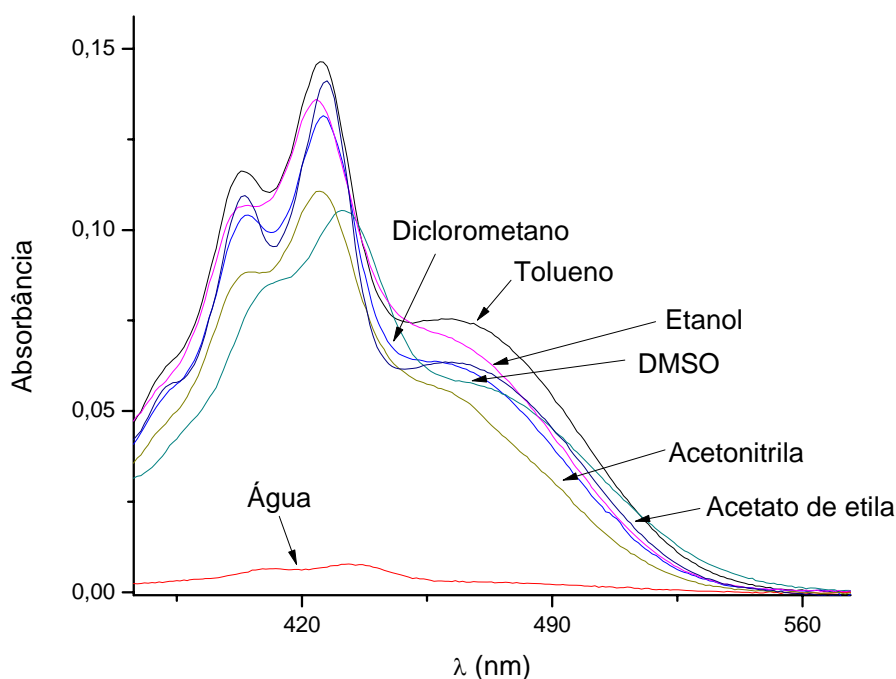


Figura 36. Espectros de absorção em diversos solventes para a fenazina-BTD (**55**).

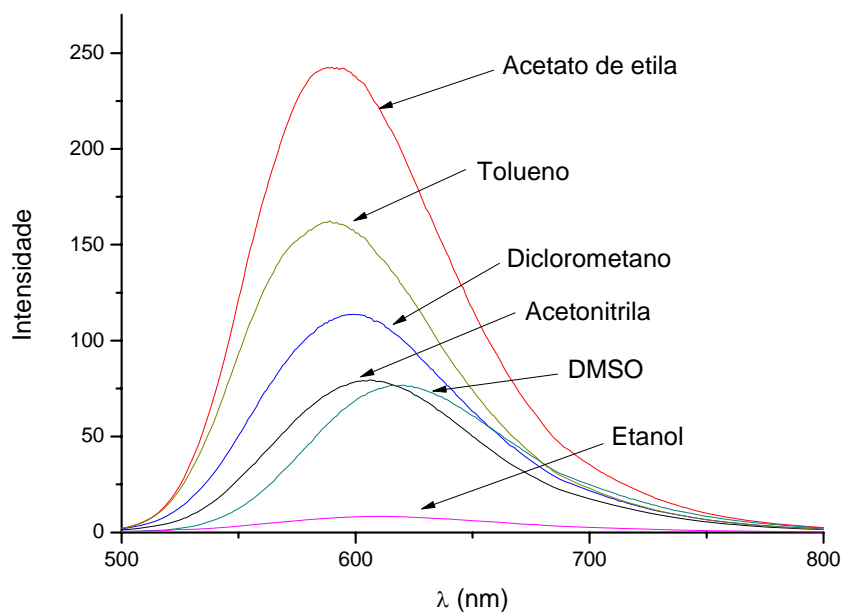


Figura 37. Espectros de emissão em diversos solventes para a fenazina-BTD (**55**).

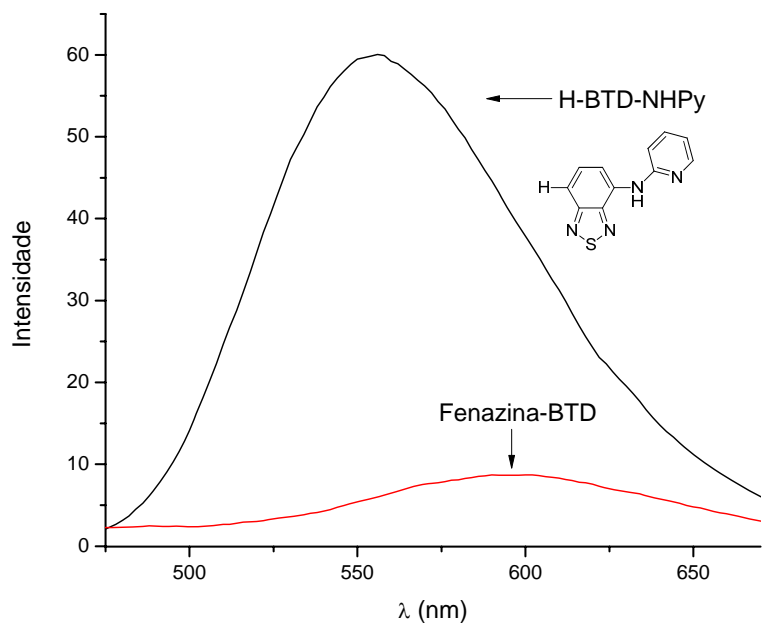


Figura 38. Espectros de emissão a fenazina-BTD (**55**) e o derivado benzotiadiazólico (**38**).

Tabela 5. Dados de fotofísica da fenazina-BTD (**55**).

Molécula	Solvente	λ_{\max} (abs)(nm)	Log ϵ	(ϵ)	λ_{\max} (em)(nm)	Deslocamento de Stokes (nm)
Fenazina-BTD (55)	Acetonitrila	445	3.80	6387	606	161
	Acetato de etila	462	3.80	6350	590	128
	Tolueno	459	3.88	7529	589	130
	Diclorometano	452	3.80	6410	599	147
	Etanol	454	3.86	7231	610	156
	Hexano	-	-	-	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-

O composto **54** (quinoidal) não apresentou bons resultados nos experimentos de bioimagem, devido a sua baixa intensidade de fluorescência. No entanto, resultados promissores foram obtidos quando **55** foi testado (Figura 39).

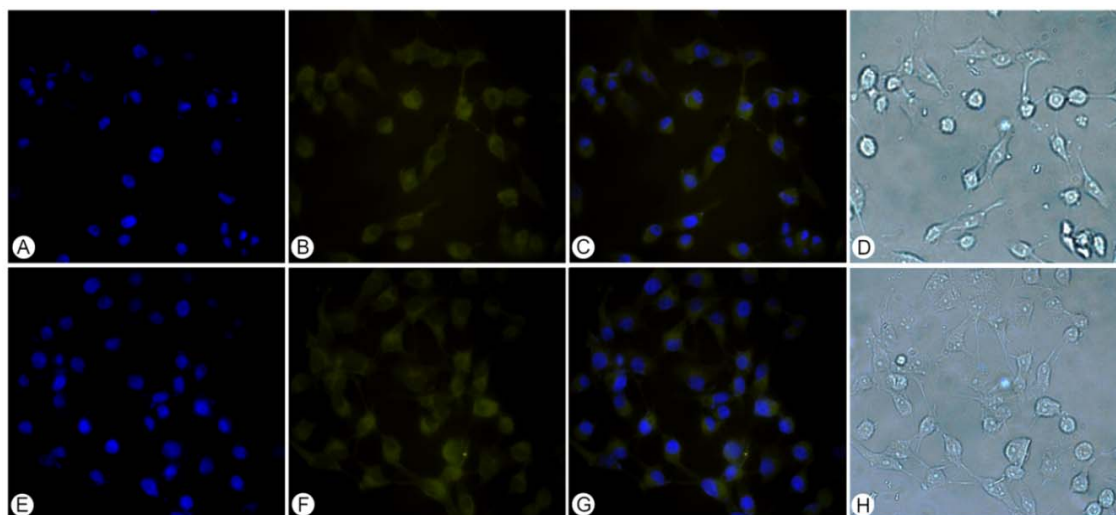


Figura 39. MDA-MB-231 marcado com **55** em adição ao corante comercial DAPI e imagens de contraste de fase. (A) e (E): núcleo marcado com DAPI (azul). (B) e (F): padrão de fluorescência associado com a região perinuclear junto a uma sensível marcação homogênea através do citoplasma (verde) obtido com **55**. É importante ressaltar que nenhuma marcação verde sobre o núcleo é notada. (C) e (G): sobreposição de DAPI e **55**, enquanto (D) e (H) mostram imagens de contraste de fase de MDA-MB-231 morfologia de células normais.

A linhagem MDA-MB-231 marcada com **55** mostrou um padrão de fluorescência associado com a região perinuclear junto a uma sensível marcação homogênea através do citoplasma. Ressalta-se que nenhum sinal pôde ser observado no núcleo celular. Essa característica demonstra uma alta afinidade de **55** com as moléculas do citoplasma. É bem conhecido que o núcleo celular possui várias matrizes de poros e é aceito que molécula com massa molecular abaixo de 40kDa possuem trânsito livre entre o citoplasma e o núcleo.⁷⁰ No entanto, a despeito da baixa massa molecular de **55**, o composto não foi encontrado no núcleo, como poderia ser esperado. O sinal fluorescente adquirido nas imagens foi muito forte, mostrando uma ampliada capacidade de emissão de fótons por parte dessas moléculas após sua associação com moléculas orgânicas, efeito conhecido como “*light up*”.⁷¹ O sinal de fluorescência apresentou um efeito de fotobranqueamento muito lento nas condições padrões de operação da microscopia confocal, o que é uma característica muito relevante para pequenas sondas fluorescentes. Finalmente, estes resultados indicam que o sítio de ação preferencial do composto planejado deve ser a região perinuclear. Apesar de experimentos adicionais serem necessários para confirmar isso, os dados obtidos dão suporte a essa hipótese.

70. Marfori, M.; Mynott, A.; Ellis, J. J.; Mehdi, A. M.; Saunders, N. F. W.; Curmi, P. M.; Forwood, J. K.; Boden, M.; Kobe, B.; Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1562-1577.

71. Nadler, A.; Schultz, C.; The power of fluorogenic probes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 2408-2410.



4. CONCLUSÃO

Todos os compostos inéditos planejados foram obtidos e caracterizados por experimentos de ressonância magnética nuclear, infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução. A quinona-BTD **54** apresentou potente atividade citotóxica frente às vinte linhagens de células tumorais avaliadas, se mostrando inclusive mais ativa que a doxorrubicina, que foi utilizada como controle positivo. Frente às três linhagens de células normais avaliadas o composto apresentou menor citotoxicidade do que a doxorrubicina. Infelizmente, devido a sua baixa fluorescência o derivado **54** não foi considerado um candidato ideal para estudos de localização subcelular. No entanto, a fenazina-BTD **55** apresentou excelentes características fotofísicas para a aplicação em sistemas luminescentes. O composto **55** não é citotóxico frente a todas as linhagens celulares testadas, tornando-se excelente para estudos de imageamento celular, avaliando assim seu potencial como sonda fluorescente. O estudo foi realizado com êxito e evidenciou que a localização preferencial da substância é a região perinuclear da célula.



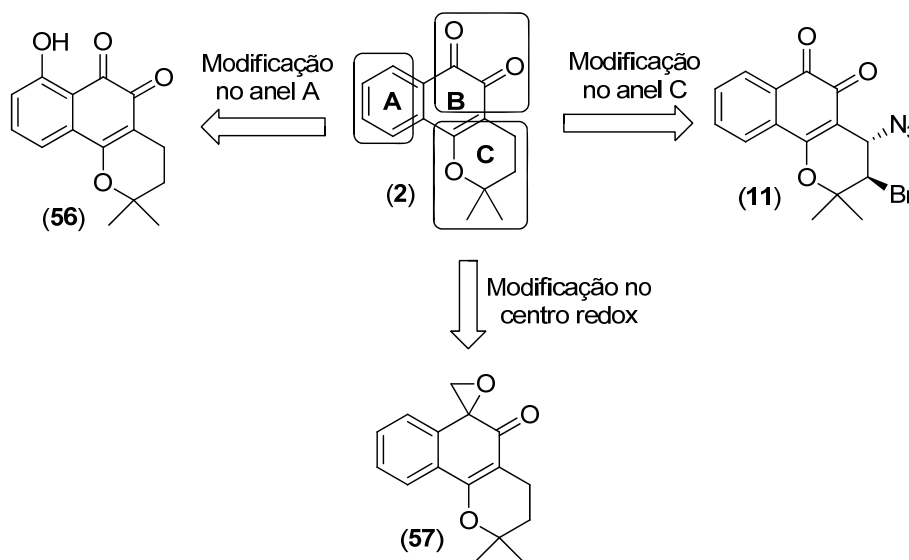
CAPÍTULO II

**“ α -LAPACHONAS ARILAMINO SUBSTITUÍDAS: SÍNTESE
E ATIVIDADE ANTITUMORAL”**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estratégias para a obtenção de lapachonas bioativas

Diferentes estratégias são empregadas para a obtenção de naftoquinonas com atividade biológica.⁷² Dentre as estratégias recentemente descritas para obtenção de substâncias bioativas a partir de protótipos como a β -lapachona (**2**), podem-se exemplificar, a modificação dos anéis A e C e a modificação do centro redox como mostrado no Esquema 35.^{23,73}



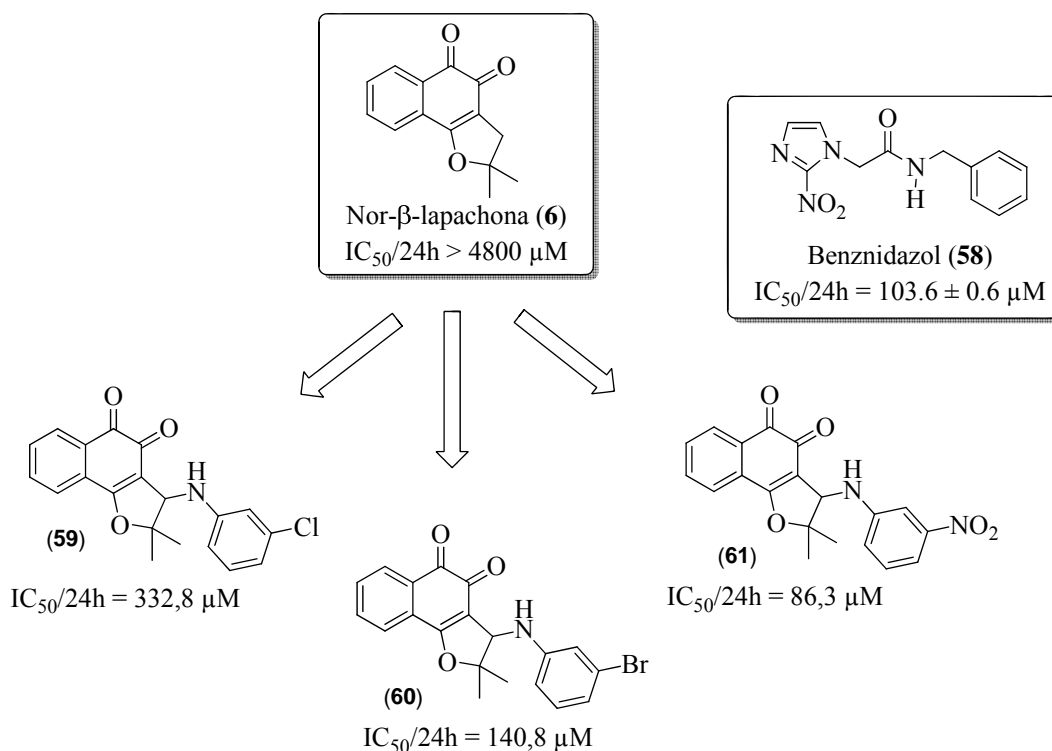
Esquema 35. Estratégias de modificação da β -lapachona (**2**).

Recentemente, resultados promissores foram obtidos com a inserção de substituintes no anel C da nor- α -lapachona (**5**) e nor- β -lapachona (**6**).^{22,23,29} Na introdução do Capítulo 1 foram previamente discutidas rotas sintéticas para obtenção de derivados obtidos por substituição no anel C de lapachonas.

72. Ferreira, V. F.; Ferreira, S. B.; da Silva, F. C.; Strategies for the synthesis of bioactive pyran naphthoquinones. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4793-802.

73. (a) Rocha, D. R.; Souza, A. C. G.; Resende, J. A. L. C.; Santos, W. C.; Santos, E. A.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Ferreira, V. F.; Synthesis of new 9-hydroxy-a- and 7-hydroxy-b pyran naphthoquinones and cytotoxicity against cancer cell lines. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4315-4322. (b) Pinto, A. V.; Pinto, M. D. F. R.; Gilbert, B.; Pellegrino, J.; Mello, R. T.; Schistosomiasis mansoni: blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. naphthoquinones and derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1977**, *71*, 133-135.

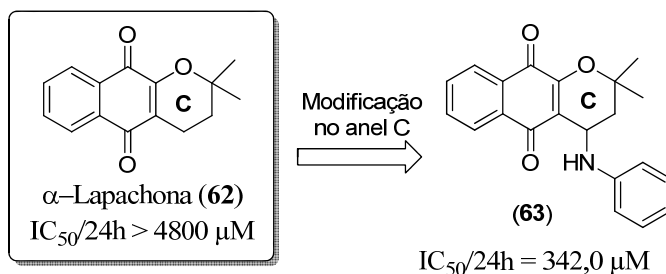
Da Silva Júnior e colaboradores descreveram derivados mais ativos do que o benznidazol (**58**), fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas, através da inserção de substituintes arilamino no anel C da nor- β -lapachona (**6**).²⁷ No Esquema 36 são apresentados exemplos de nor- β -lapachonas substituídas **59-61** com atividade tripanocida. É importante salientar que a inserção desses grupos no anel C da nor- β -lapachona (**6**), substância inativa contra o *T. cruzi*, gera derivados ativos e potenciais candidatos a fármacos tripanocidas. A substância **63** é mais ativa do que nor- β -lapachona (**6**) e benznidazol (**60**) com valor de $IC_{50}/24h = 86,3 \mu M$. Os valores de $IC_{50}/24h$ são descritos para a forma tripomastigota do *T. cruzi*.



Esquema 36. Nor- β -lapachonas arilamino substituídas com atividade tripanocida.

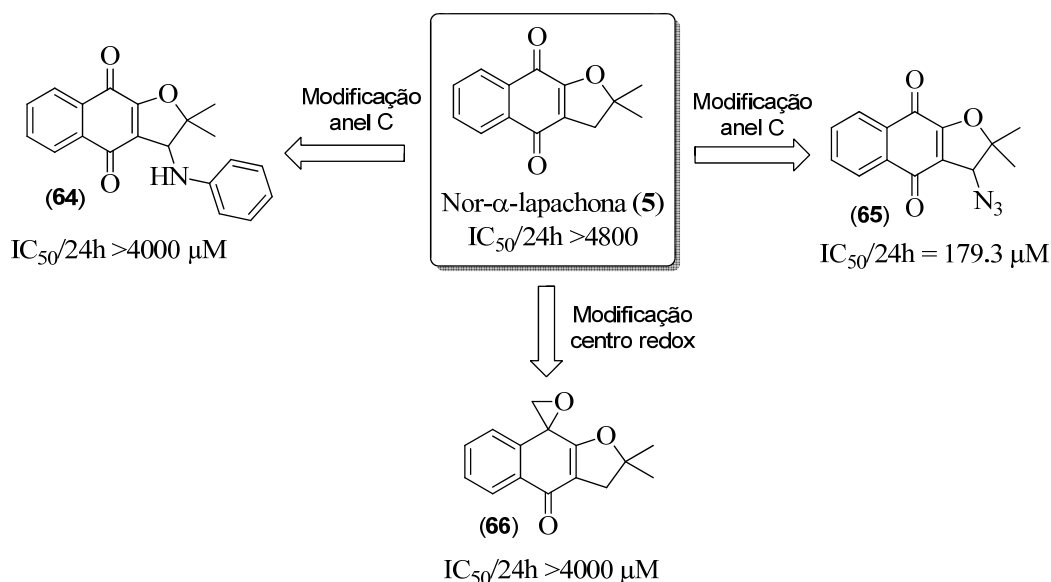
Também avaliando o desempenho de naftoquinonas frente ao *T. cruzi*, foram realizadas modificações na estrutura da nor- α -lapachona (**5**) e α -lapachona (**62**) (Esquemas 35 e 36). A α -lapachona (**62**) é inativa contra o *T. cruzi* em sua forma tripomastigota

etornou-se ativa quando realizada a inserção do grupo arilamino no anel C, análogo (**63**) (Esquema 37).⁷⁴



Esquema 37. Modificação no anel C para obtenção de **63**, derivado com atividade tripanocida.

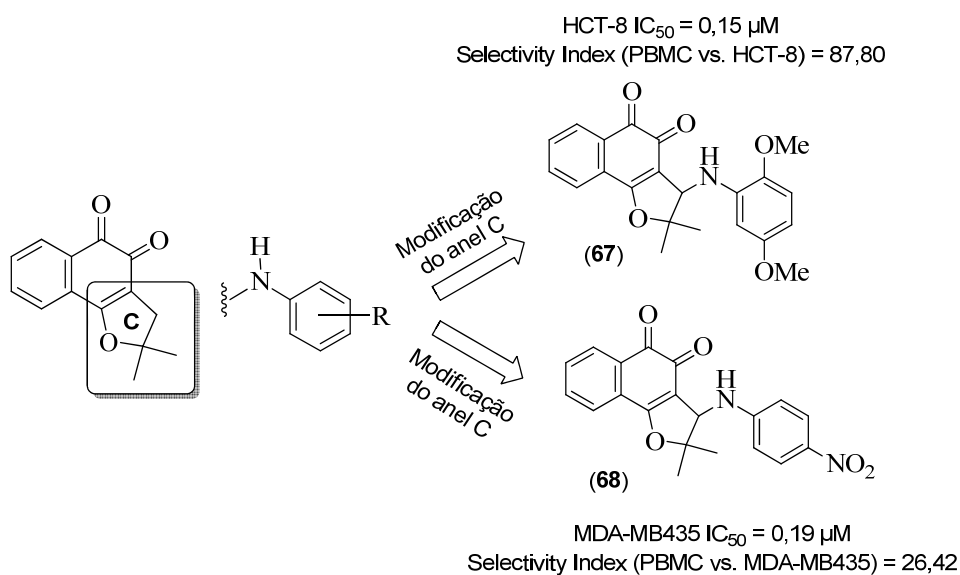
Modificações na nor- α -lapachona (**5**) também foram descritas recentemente.⁷⁴ A modificação no centro redox através da inserção de um grupo oxirânico se mostrou infrutífera. Resultado positivo foi obtido quando foi realizada a inserção do grupo azida no anel C. Pode-se observar que, diferentemente do que ocorreu com a α -lapachona (**62**), a inserção do grupo arilamino não melhorou a atividade tripanocida (Esquema 38).



Esquema 38. Modificações visando à obtenção de substâncias tripanocidas.

74. da Silva Júnior, E. N.; de Souza, M. C. B. C.; Fernandes, M. C.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Lopes, F. A.; de Simone, C. A.; Andrade, C. K. Z.; Pinto, A. V.; Ferreira, V. F.; de Castro, S. L.; Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5030–5038.

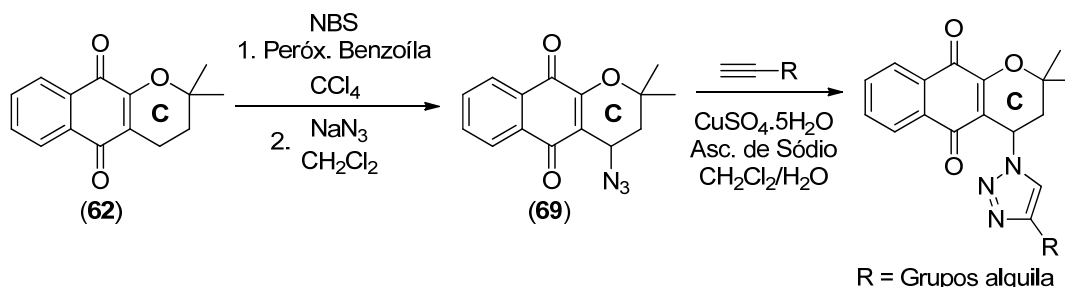
As nor- β -lapachonas arilamino substituídas também foram descritas com forte atividade antitumoral ($IC_{50} < 1 \mu M$) frente a 6 linhagens de células cancerígenas, SF-295 (sistema nervoso central), HCT-8 (côlon), MDAMB-435 (melanoma), HL-60 (leucemia), PC-3 (próstata) e B-16 (melanoma murino).³⁰ Dentre as substâncias obtidas, destacam-se os derivados **67** e **68** (Esquema 39), os quais apresentaram melhores resultados citotóxicos e também seletividade frente à células normais PBMC (células mononucleares de sangue periférico). A descoberta desses compostos evidenciou a importância de um estudo de estrutura versus atividade, no qual os autores descreveram uma gama de substâncias com a presença de grupos doadores e retiradores de elétrons no anel arilamino, favorecendo a obtenção de duas substâncias com características eletrônicas diferentes nesse anel, mas com potente atividade contra diferentes linhagens tumorais.



Esquema 39. Síntese de nor- β -lapachonas arilamino substituídas com potente atividade antitumoral.

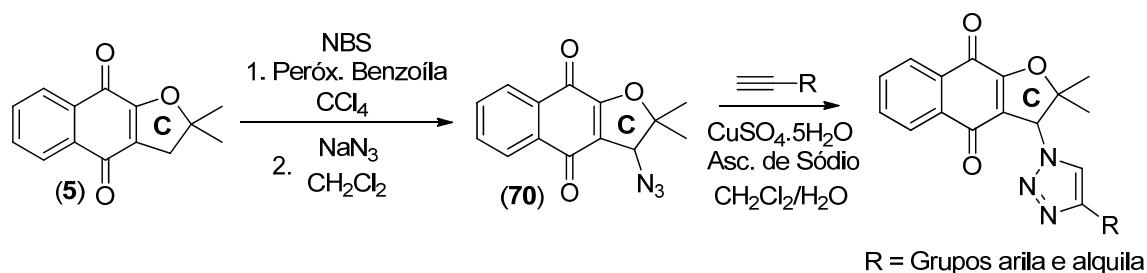
Uma estratégia para a síntese de derivados substituídos no anel C a partir da α -lapachona (**62**) é a inserção do bromo na posição 4, através da reação com *N*-bromo succinimida e posterior substituição. Através do intermediário bromado, Guimarães e colaboradores²⁹ obtiveram compostos 1,2,3-triazólicos com potente atividade contra *leishmania* (Esquema 40). Em geral, todas as substâncias descritas foram mais ativas do

que o sal de Sb(III), usado como fármaco padrão, e as substâncias descritas se mostraram como boas estruturas para estudos mais abrangentes de mecanismos de ação.



Esquema 40. Síntese de α -lapachonas 1,2,3-triazólicas.

Nor- α -lapachonas modificadas no anel C pela inserção do anel 1,2,3-triazólico também apresentaram atividade leishmanicida, mostrando que a estratégia de inserir diferentes grupos no anel C pode ser eficaz (Esquema 41).



Esquema 41. Síntese de nor- α -lapachonas 1,2,3-triazólicas.

Apesar do número crescente de trabalhos publicados com substâncias cujos esqueletos relacionados ao lapachol, derivados de α -lapachonas sintetizados e avaliados contra linhagens de células tumorais ou parasitos como o *T. cruzi* ou *Leishmania* são minoria. Neste contexto, preparar novos derivados de α -lapachonas é um importante desafio para a obtenção de novas quinonas bioativas.

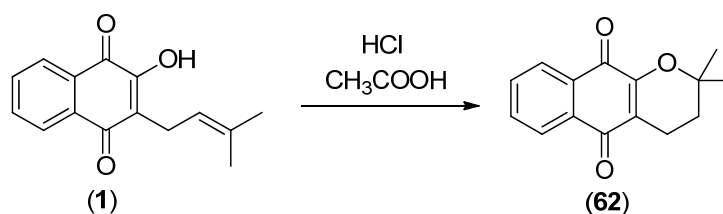
2. PROPOSTA DE TRABALHO

Naftoquinonas são consideradas estruturas privilegiadas em química medicinal por apresentarem diversificada atividade farmacológica.⁷⁵ As naftoquinonas da família do lapachol são atraentes precursores para a síntese de substâncias bioativas, devido a suas pronunciadas atividades frente a diferentes agentes causadores de doenças e à versatilidade com que podem ser modificadas estruturalmente, de forma a intensificar em suas bioatividades.

Com vistas à obtenção de novos derivados ativos contra o câncer, a proposta deste trabalho é a modificação no anel C da α -lapachona através da inserção de um anel arilamino substituído por grupos doadores e retiradores de elétrons. Como discutido na introdução deste capítulo, uma forte intensificação da atividade tripanocida da α -lapachona foi conseguida através da inserção de um grupo arilamino no anel C, mostrando ser este um estratagema válido para a obtenção de compostos com atividade farmacológica intensificada. Também foi observado que nor- β -lapachonas arilamino substituídas apresentam acentuada atividade antitumoral.

Neste contexto α -lapachonas arilamino substituídas serão objeto de estudo deste capítulo, assim como a avaliação das suas atividades antitumorais. Visando avaliar a relação estrutura versus atividade dos derivados a serem preparados. Grupos doadores de elétrons, como, por exemplo, metóxi e metil e retiradores de elétrons, como halogênios, grupo nitro, dentre outros, estarão presentes no anel arilamino.

A rota proposta parte do lapachol (**1**), que será ciclizado na presença de ácido clorídrico e ácido acético, como descrito por Hooker,⁷⁶ fornecendo a α -lapachona (**62**) (Esquema 42).

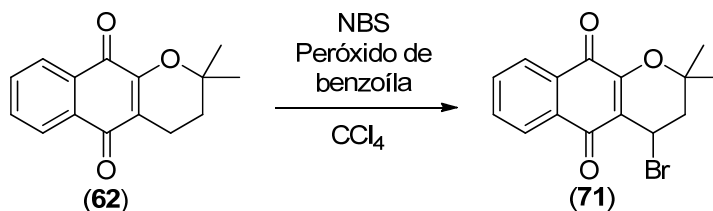


Esquema 42. Síntese da α -lapachona (**62**).

75. Pinto, A. V.; Castro, S. L.; The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. *Molecules*. **2009**, *14*, 4570-4590.

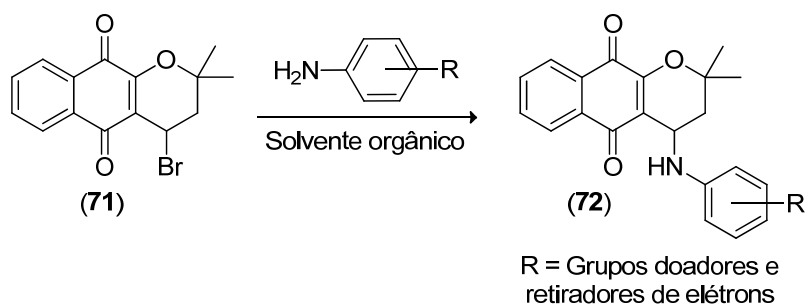
76. Hooker, S. C.; The constitution of "lapachic acid" (Lapachol) and its derivatives. *J. Chem. Soc., Trans.* **1892**, *61*, 611-650.

A próxima etapa consistirá na bromação da α -lapachona (**62**), realizada com NBS em tetracloreto de carbono, na presença de peróxido de benzoíla, para a obtenção do derivado **71** (Esquema 43).



Esquema 43. Bromação da α -lapachona (**62**).

Por fim será realizada a substituição do bromo pelo anel arilamino substituído, contendo grupos doadores e retiradores de elétrons e/ou as substâncias obtidas serão avaliadas contra linhagens de células tumorais (Esquema 44).

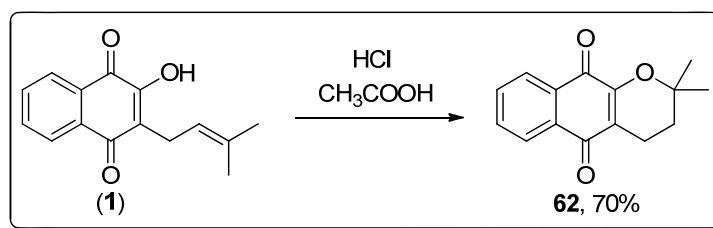


Esquema 44. Inserção do grupo arilamino.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

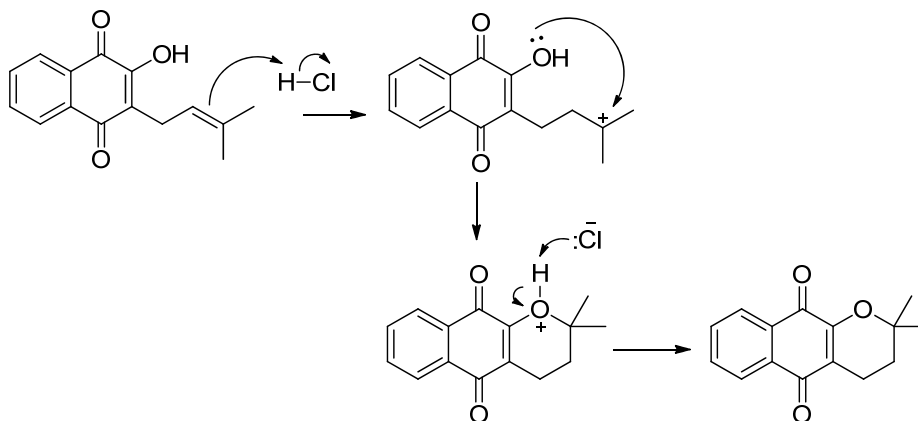
3.1. Síntese de derivados da α -lapachona arilamino substituídos

Com vistas à obtenção de compostos com atividade antitumoral, foram realizadas as sínteses de oito moléculas derivadas da α -lapachona (**62**). É conhecido o potencial farmacológico das *para*-naftoquinonas, embora as atividades das *orto*-naftoquinonas sejam mais explorada.³⁰ Devido ao efeito de intensificação da atividade biológica obtida pela inserção de um grupo arilamino no anel C relatado em diversos estudos,^{26,27,29} este trabalho buscou a síntese de derivados *para*-naftoquinônicos com essa modificação estrutural. A síntese teve início com o lapachol (**1**), o qual foi ciclizado conforme descrito por Hooker, na presença de ácido clorídrico e ácido acético (Esquema 45).



Esquema 45. Formação da α -lapachona.

A reação tem início com a protonação da dupla ligação da cadeia lateral do lapachol, formando um carbocátion terciário, o qual é atacado pelo par de elétrons da hidroxila formando um anel de seis membros. Por fim, ocorre a desprotonação do íon oxônio, formando-se a α -lapachona (**62**) (Esquema 46).



Esquema 46. Mecanismo para a formação da α -lapachona (**62**).

O produto foi obtido em 70% de rendimento como um sólido amarelo de ponto de fusão = 117-118 °C. No espectro de RMN de ^1H foi possível-se observar em todos os sinais relacionados à substância proposta, um simpleto δ 1,44, referente aos hidrogênios metílicos, dois tripletos em δ 2,62 ($J = 6,5$ Hz, 2H) e δ 1,82 ($J = 6,5$ Hz, 2H) referentes aos hidrogênios metilênicos do anel C, e dois sinais multipletos em δ 8,18-8,01 e δ 7,79-7,59 referentes aos hidrogênios aromáticos do anel A.

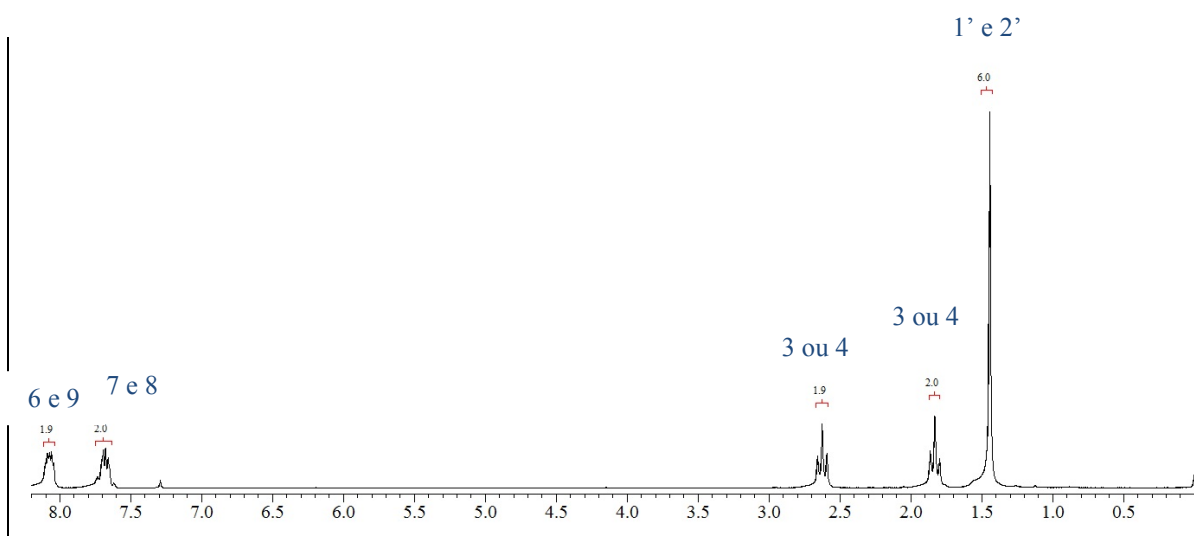
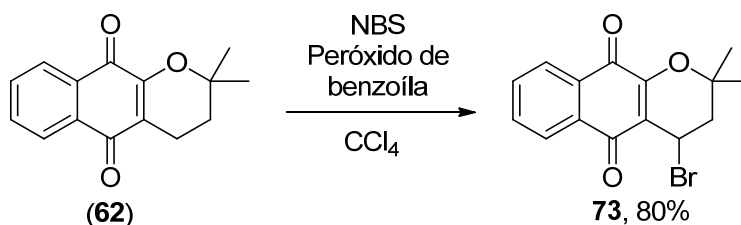


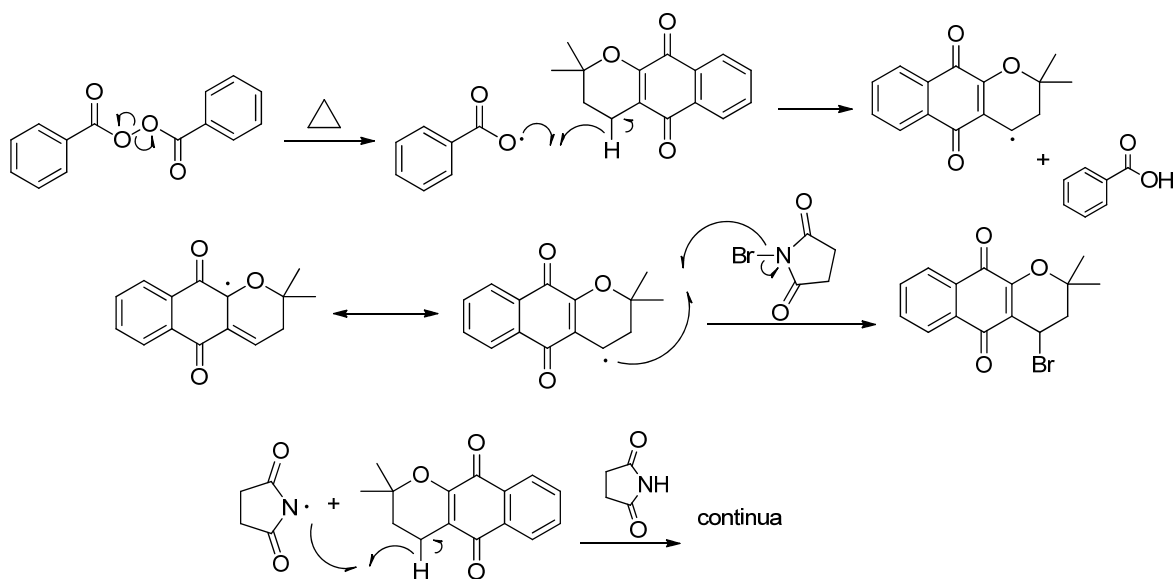
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (**62**) (200 MHz, CDCl_3).

A etapa seguinte foi a bromação da α -lapachona (**62**), realizada com NBS em tetracloreto de carbono a 80 °C, na presença de peróxido de benzoíla, que serve como iniciador (Esquema 47). A NBS é um reagente de escolha para a bromação com formação de radicais alílicos. O produto **73** foi obtido com rendimento de 80%.



Esquema 47. Formação da 4-bromo- α -lapachona (**73**).

A reação segue um mecanismo radicalar, como mostrado no Esquema 48. O início se dá com a quebra homolítica da ligação oxigênio-oxigênio do peróxido de benzoíla, formando dois radicais. O radical formado abstrai, também de forma homolítica, um hidrogênio do anel C da α -lapachona (**62**), levando à formação de um radical alílico, que por sua vez abstrai um bromo da molécula de *N*-bromosuccinimida, formando o produto esperado e gerando um radical succinimida que continua a reação.



Esquema 48. Mecanismo proposto para a bromação da α -lapachona (**62**).

Essa reação teve duração de 4 horas e a mistura de reação mostrou alteração em sua coloração de amarelo claro para um amarelo escuro e, por cromatografia em camada delgada, foi possível observar que, após este período, todo o material de partida havia sido consumido. Foi realizada uma série de filtrações para retirar a succinimida que se formou e o solvente foi retirado, utilizando-se evaporador rotativo. O produto **73** apresenta baixa estabilidade, devido à facilidade com que o átomo de bromo pode ser substituído e, dessa forma, a substância é utilizada em subseqüentes reações de substituição nucleofílica logo após o seu preparo. Uma pequena quantidade do composto **73** foi utilizado para a aquisição de um espectro de RMN de ^1H (Figura 41), o qual foi obtido imediatamente após a síntese da substância.

Esse espectro mostrou dois dupletos duplos, em δ 2,56 e δ 2,46, referentes aos dois hidrogênios metilênicos do anel C que, devido à inserção do bromo, tornam-se diastereotópicos. Nota-se também o dupletos duplo em δ 5,38 referente ao hidrogênio do carbono ligado ao bromo.

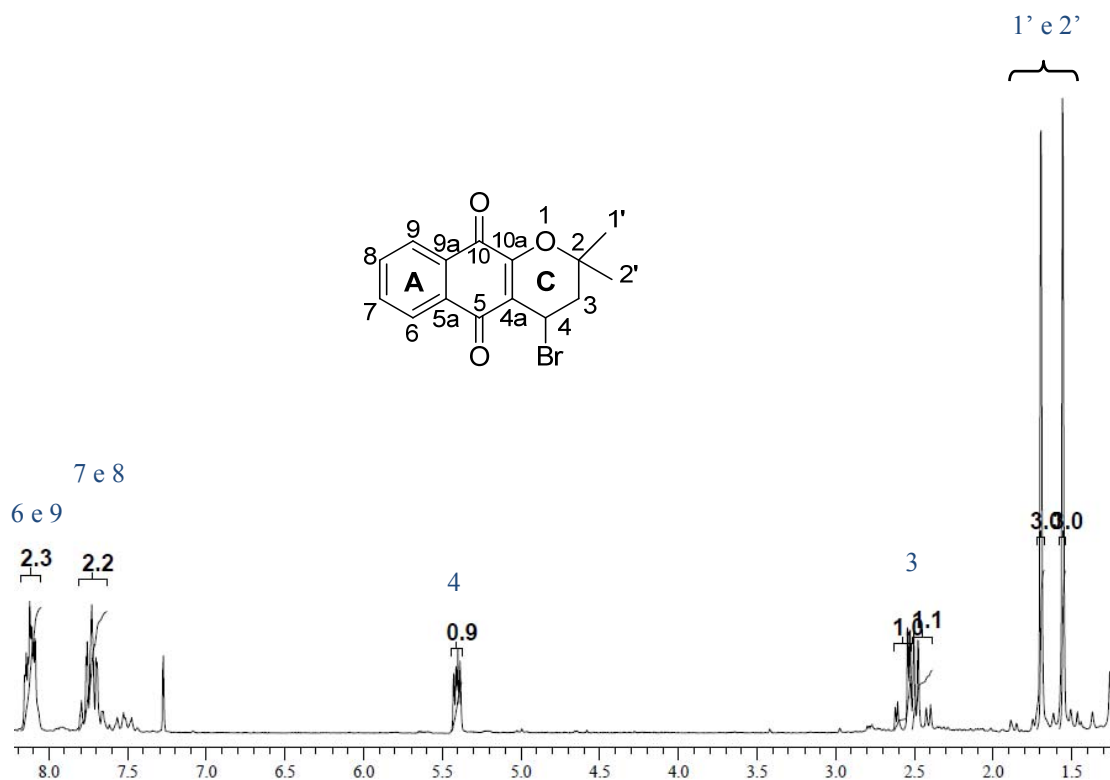
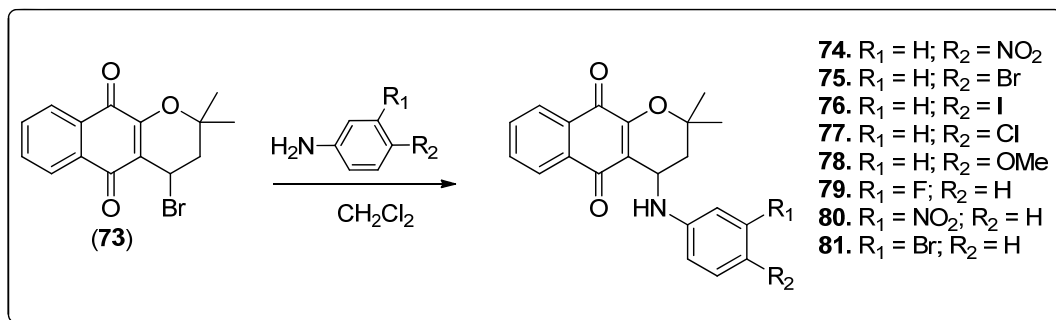


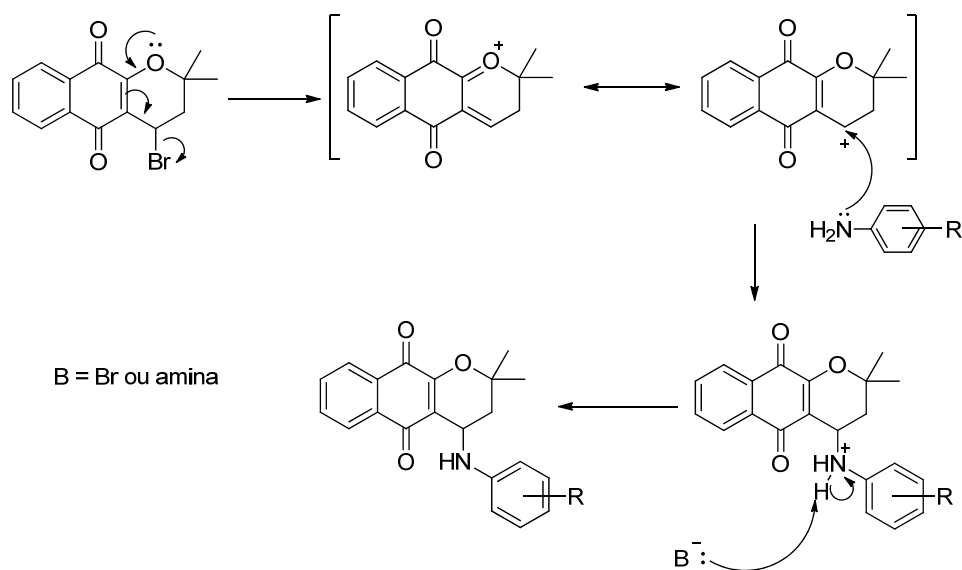
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da 4-bromo- α -lapachona (73) (200 MHz, CDCl_3).

A etapa seguinte foi a substituição do bromo por anilinas substituídas por grupos doadores e retiradores de elétrons. As reações foram realizadas em diclorometano a temperatura ambiente (Esquema 49).



Esquema 49. Derivados arilamino substituídos **74-81**, obtidos a partir de **73**.

Essa reação segue um mecanismo de substituição com auxílio anquimérico do par de elétrons do oxigênio do anel pirano. Forma-se assim um carbocátion que é atacado pelo par de elétrons do grupo arilamino (Esquema 50).



Esquema 50. Mecanismo proposto para a inserção do grupo arilamino no derivado **73**.

As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e foram finalizadas quando o material de partida, α -lapachona (**73**), foi totalmente consumido. As substâncias foram isoladas e purificadas em coluna cromatográfica de sílica gel com eluente em gradiente crescente de polaridade e se apresentaram como sólidos cristalinos coloridos. As faixas de fusão e colorações observadas para as substâncias estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Coloração e ponto de fusão das substâncias **74-81**.

Substância	Coloração	Ponto de Fusão/°C
74	Vermelho	223-225
75	Vermelho	174-176
76	Vermelho	154-156
77	Vermelho	159-161
78	Marrom	149
79	Vermelho	152-154
80	Laranja	152-154
81	Vermelho	182-185

Os produtos foram caracterizados por experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , além de espectrometria no infravermelho e de massas de alta resolução. Na Tabela 7, estão sumariados os dados de RMN de ^1H para todas as substâncias sintetizadas. Nas Figura 41 e 42 estão exemplificados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o derivado **75**.

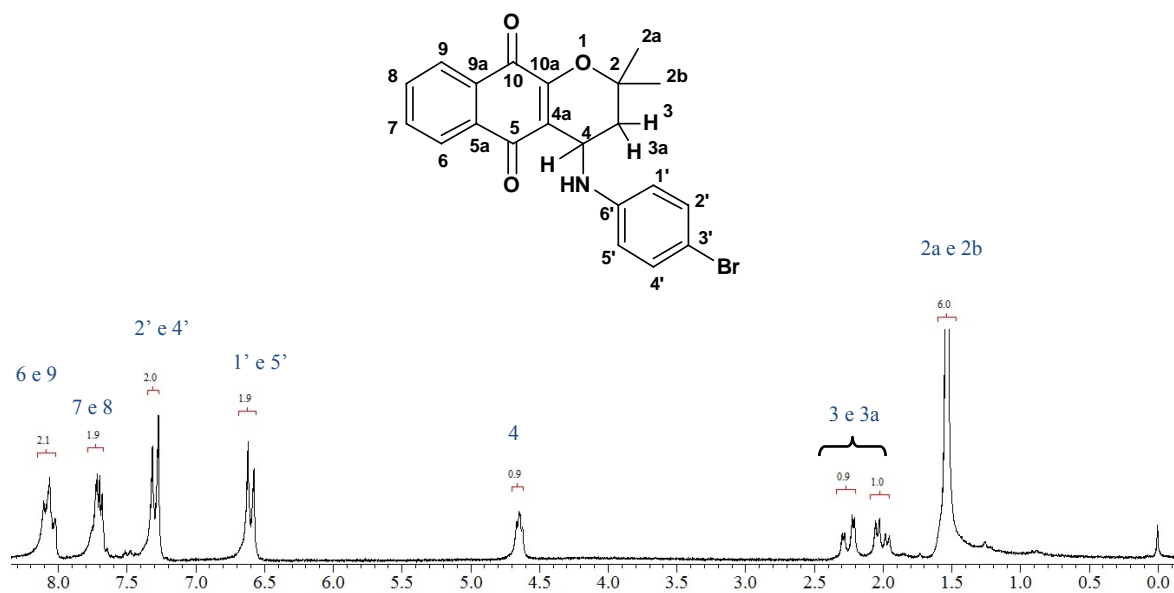


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H do derivado **75** (200 MHz, CDCl_3).

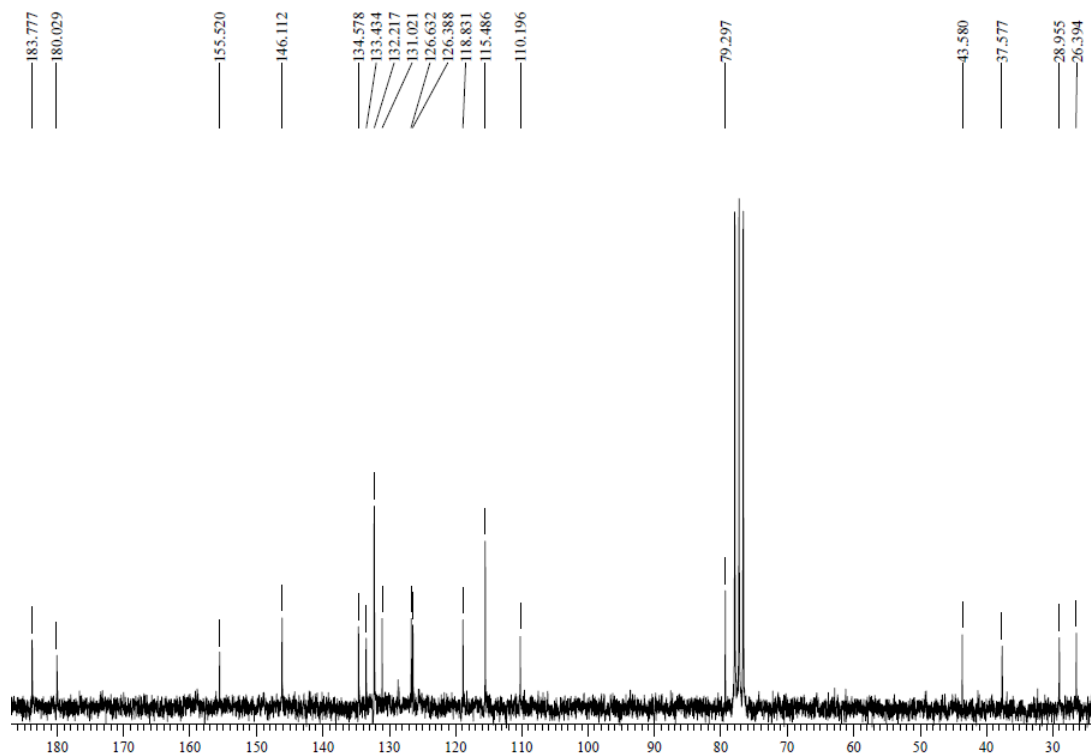


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **75**, (50 MHz, CDCl_3).

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (200,0 MHz, CDCl_3), para os derivados **74-81**.

	74	75	76	77
H	$\delta^1\text{H}$ (m; J em Hz)			
3 ou 3a	1,99 (dd, $J = 5,5$ e 14,6, 1H)	2,00 (dd, $J = 5,5$, e 14,1, 1H)	1,98 (dd, $J = 5,3$ e 14,4, 1H)	1,99 (dd, $J = 5,5$ e 14,4, 1H)
3a ou 3	2,27 dd, $J = 3,2$ e 14,6, 1H)	2,25 (dd, $J = 3,5$ e 14,4, 1H)	2,25 (dd, $J = 3,2$ e 14,4, 1H)	2,25 (dd, $J = 3,5$ e 14,4, 1H)
4	4,65 (dd, $J = 3,2$ e 5,5, 1H)	4,64 (dd, $J = 3,5$ e 5,5, 1H)	4,71-4,58 (m, 1H)	4,63 (dd, $J = 3,5$ e 5,5, 1H)
6 e 9	8,10-7,90 (m, 2H)	8,17-7,99 (m, 2H)	8,14-7,93 (m, 2H)	8,11-7,95 (m, 2H)
7 e 8	7,72-7,59 (m, 2H)	7,78-7,64 (m, 2H)	7,74-7,61 (m, 2H)	7,75-7,59 (m, 2H)
2a ou 2b	1,52 (s, 3H)	1,52 (s, 3H)	1,52 (s, 3H)	1,52 (s, 3H)
2b ou 2a	1,54 (s, 3H)	1,54 (s, 3H)	1,54 (s, 3H)	1,54 (s, 3H)

1'-4'	7,21-6,33 (m, 4H)	-	-	
4' e 5'	-	7,38-7,23 (m, 2H)	7,52-7,37 (m, 2H)	7,21-7,07 (m, 2H)
1' e 2'	-	6,71-6,50 (m, 2H)	6,57-6,41 (m, 2H)	6,69-6,57 (m, 2H)
	78	79	80	81
H	$\delta^1\text{H}$ (m; <i>J</i> em Hz)			
3 ou 3a	2,00 (dd; <i>J</i> = 5,57 e 14,14 Hz; 1H)	2,02 (dd, <i>J</i> = 5,0, e 13,8, 1H)	2,14-1,98 (m, 1H)	1,99 (dd, <i>J</i> = 5,3 e 14,1, 1H)
3a ou 3	2,24 (dd; <i>J</i> = 4,05 e 14,17 Hz; 1H)	2,27 (dd, <i>J</i> = 2,2 e 13,8, 1H)	2,35-2,17 (m, 1H)	2,26 (dd, <i>J</i> = 2,2 e 14,4, 1H)
4	4,62-4,55 (m, 1H)	4,67 (dd, <i>J</i> = 3,5 e 5,5, 1H)	4,87-4,61 (m, 1H)	4,17-4,59 (m, 1H)
6 e 9	8,13-8,04 (m, 2H)	8,15-7,99 (m, 2H)	7,75-7,60 (m, 2H)	8,10-7,95 (m, 2H)
7 e 8	7,77-7,67 (m, 2H)	7,77-7,64 (m, 2H)	8,02-7,88 (m, 2H)	7,75-7,58 (m, 2H)
2a ou 2b	1,49 (s, 3H)	1,53 (s, 3H)	1,56 (s, 3H)	1,52 (s, 3H)
2b ou 2a	1,56 (s, 3H)	1,54 (s, 3H)	1,58 (s, 3H)	1,54 (s, 3H)
1'-5'	6,87-6,74 (m, 4H)	-	7,40-6,66 (m, 4H)	7,09-6,55 (m, 4H)
4' e 5'	-	7,19-7,06 (m, 2H)	-	-
1' e 2'	-	6,55-6,40 (m, 2H)	-	-

3.2. Avaliação farmacológica

As moléculas obtidas foram submetidas a estudos realizados em colaboração com o grupo da Prof. Dr.(a) Cláudia Pessoa e do Dr. Bruno Coelho, da Universidade Federal do

Ceará. Esses estudos visaram avaliar a atividade citotóxica desses compostos contra cinco linhagens de células tumorais, a saber, DU-145 (próstata), PC3 (próstata), MCF-7 (mama), MX1 (mama), HS578t (mama) e duas linhagens de células normais, V79 (fibroblastos murinos) e L929 (fibroblastos murinos) Outros estudos de avaliação citotóxica foram realizados com três linhagens de células tumorais, HL-60 (leucemia), SF295 (sistema nervoso central) e HCT-116 (cólon), comparando as amostras com o material de partida, α -lapachona (62). Os compostos foram avaliados *in vitro*, baseando-se no ensaio MTT e o composto Doxorubicina foi utilizado como controle positivo. A Tabela 8 e a Figura 22 mostram os resultados obtidos.

Tabela 8. Atividade citotóxica dos derivados arilamino substituídos e controle positivo, Doxorubicina.

72 h Amostras	Linhagens celulares – CI ₅₀ µg/mL (IC95%)						
	Células tumorais					Células normais	
	DU-145	PC3	MCF-7	MX1	HS578t	L929	V79
74	2,32 (1,88-2,85)	2,19 (1,87-2,64)	2,71 (2,34-3,29)	2,09 (1,76-2,45)	2,25 (1,53-2,61)	0,52 (0,38-0,61)	0,61 (0,47-0,73)
75	2,77 (1,97-3,88)	2,23 (1,74-3,15)	2,05 (1,63-2,64)	2,61 (2,17-3,06)	2,64 (2,03-3,12)	-	-
76	4,96 (3,82-6,44)	4,16 (3,81-5,08)	3,46 (3,15-4,10)	4,91 (4,16-5,34)	4,21 (3,59-5,37)	1,06 (0,73-1,20)	1,17 (0,84-1,31)
79	3,08 (2,75-3,45)	2,73 (2,22-3,16)	2,43 (2,11-2,94)	2,50 (1,89-2,75)	2,70 (2,46-3,07)	1,14 (0,91-1,25)	0,94 (0,75-1,17)
81	4,34 (3,53-5,33)	4,07 (3,51-4,92)	4,12 (3,44-5,18)	3,57 (3,10-4,02)	4,72 (4,10-5,61)	1,57 (1,39-1,76)	1,32 (1,04-1,56)
Doxorubicina	0,37 (0,26-0,50)	0,45 (0,38-0,53)	0,61 (0,55-0,83)	0,14 (0,03-0,19)	0,75 (0,58-0,92)	0,51 (0,47-0,58)	0,37 (0,18-0,56)

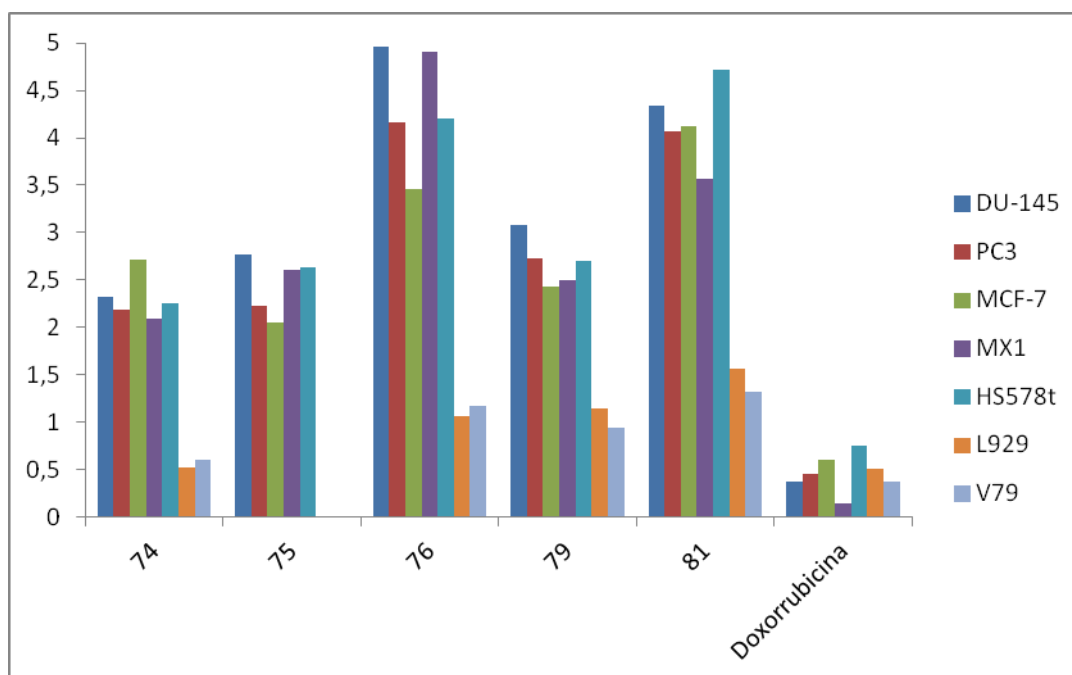


Figura 44. Atividade citotóxica de α -lapachonas arilamino substituídas e doxorubicina contra cinco linhagens de células tumorais e duas linhagens de células normais.

Tabela 9. Atividade citotóxica dos derivados arilamino substituídos e α -lapachona (62).

72 h			
Linhagens celulares – CI50 μ g/mL (IC95%)			
Amostras	HL-60	SF-295	HCT-116
74	1,61 (1,34-1,82)	2,25 (2,01-2,48)	2,14 (1,84-2,32)
75	1,95 (1,77-2,16)	2,63 (2,49-2,84)	2,41 (2,27-2,61)
76	3,16 (2,98-3,34)	4,22 (3,82-4,51)	>5
77	0,36 (0,23-0,45)	0,26 (0,21-0,32)	0,20 (0,13-0,28)
78	0,07 (0,03-0,15)	0,27 (0,22-0,34)	0,12 (0,10-0,13)

80	0,57 (0,43-0,75)	0,57 (0,45-0,71)	3,21 (2,34-4,64)
81	3,16 (2,87-3,41)	3,61 (3,43-3,88)	>5
α-lapachona	0,61 (0,48-0,77)	0,29 (0,22-0,37)	0,33 (0,23-0,47)

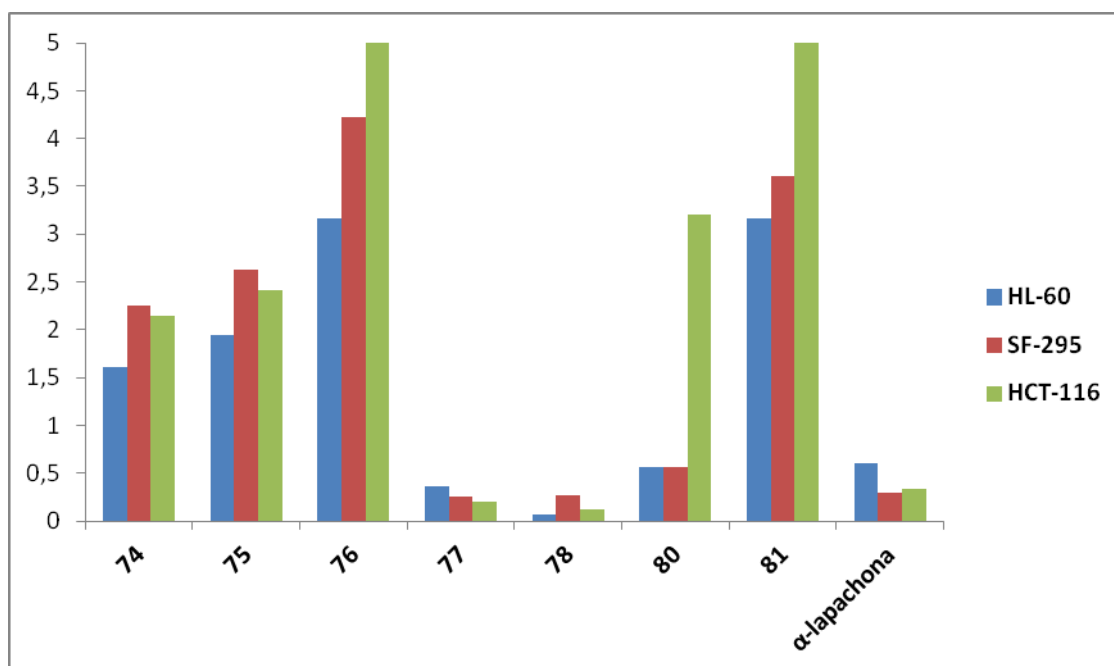


Figura 45. Atividade citotóxica de α -lapachonas arilamino substituídas e α -lapachona contra três linhagens de células tumorais.

Todos os derivados mostraram atividade citotóxica moderada ($2 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) para as linhagens avaliadas, portanto menos ativas que o controle positivo. A atividade contra células normais foram inferiores à do controle positivo, exceto para a molécula **74** que teve valores muito semelhantes. Não há nítida informação a cerca da influência da posição do substituinte (*meta* ou *para*) na citotoxicidade apresentada. Não foi possível observar especificidade para determinada linhagem tumoral testada. Nos testes em comparação com a α -lapachona (**62**) foram encontradas elevadas atividades citotóxicas dos compostos **77** e **78**, sendo este último mais ativo que a α -lapachona (**62**). O composto **78**



possui um substituinte doador de densidade eletrônica no anel da amina aromática, indicando um caminho para a síntese de um novo grupo de derivados com potencial atividade citotóxica antitumoral.

No momento estão sendo realizados estudos das atividades antitumorais das demais substâncias descritas neste trabalho além da atividade da α -lapachona (**62**), a fim de se avaliar a potencialidade da estratégia de inserção dos grupos arilaminos no anel C desta substância.



4. CONCLUSÃO

Os compostos planejados foram sintetizados com êxito e caracterizados por técnicas como ressonância magnética nuclear, infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução. Foram realizados testes de citotoxicidade de algumas dessas substâncias frente a cinco linhagens de células tumorais e duas linhagens de células normais, revelando uma atividade citotóxica moderada. É importante ressaltar a validade da proposta desses testes, haja visto que a atividade de *para*-naftoquinonas obtidas a partir do lapachol (**1**) não é amplamente estudada quanto a das *orto*-naftoquinonas.

5. EXPERIMENTAL

5.1. Materiais e Equipamentos

A determinação estrutural das substâncias sintetizadas foi realizada por métodos instrumentais de espectroscopia de RMN de Hidrogênio e Carbono-13, e espectroscopia na região do infravermelho (IV) e por espectrometria de massas. Os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury Plus 7,04 T, Bruker AVANCE DRX200 e Bruker AVANCE DPX400, utilizando-se TMS como referência interna. Os valores de deslocamentos químicos foram referidos em partes por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades foram descritas da seguinte forma: s-simpleto; d-dupletto; q-quarteto; m-multipletto; dd-duplo dupletto, ddd-duplo duplo dupletto, dl-dupletto largo e td-triplo dupletto.

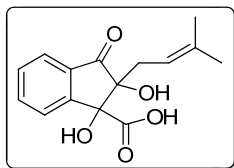
Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR, de feixe duplo e IR Prestige-21 Shimadzu em pastilhas de KBr anidro. Os valores para as absorções estão expressos em número de onda, utilizando-se como unidade o centímetro recíproco (cm^{-1}). Os espectros de massas de alta resolução foram realizados em aparelho do tipo MicroTOF Ic – Bruker Daltonics., utilizando a técnica de “ionização por electrospray”.

As determinações de ponto de fusão foram realizadas pelo método de capilar aberto no aparelho de Thomas Hoover. Os solventes e reagentes, para fins sintéticos foram tratados, destilados e secos conforme necessidades requeridas nas metodologias adotadas. O monitoramento das reações foi realizado através da Cromatografia em Camada Fina (C.C.F.), em cromatofolhas de gel de sílica 60F-254, com 0,2 mm de espessura de camada (MERCK). Os eluentes foram preparados volume a volume (V/V) e a visualização das substâncias foi efetuada em lâmpada de Ultravioleta. Para a purificação das substâncias por cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel (Acros Organics 0,035-0,070 mm, diâmetro de poro ca 6 nm).

As substâncias foram nomeadas segundo regras da IUPAC com o auxílio do programa CS ChemDraw Ultra.

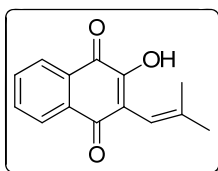
5.2. Síntese das substâncias descritas na literatura.

Ácido-1,2-diidroxi-2-(3-metil-but-2-enil)-3-oxo-indan-1-óico (52)



Em um balão de 500 mL foram adicionados 4,84 g de lapachol (**1**) e, a seguir, 40 mL de THF. Separadamente foi preparada uma solução de 2,4 g de Na_2CO_3 anidro em 50 mL de H_2O , que foi adicionada ao balão, formando-se uma solução vermelha escura. Sob aquecimento, 60°C , foram lentamente adicionados cerca de 6,0 mL de H_2O_2 30% em aproximadamente 1 hora, de 10 em 10 gotas, até total descoloração da solução, sendo formada uma solução de coloração rósea. A solução foi vertida em um becker sob refrigeração interna de gelo à temperatura entre 0°C a -2°C . A seguir foi adicionado HCl concentrado, gota a gota sob agitação, até o aparecimento de um precipitado branco. A mistura foi deixada na geladeira por 2 horas e, em seguida, filtrada a vácuo, fornecendo um sólido branco, obtido em 70% de rendimento.

2-Hidroxi-3-(2-metil-propenil)-[1,4]naftoquinona (12)



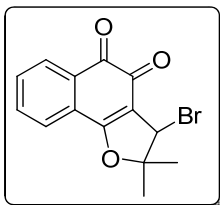
A substância **52** (3,3 g) foi dissolvida em 32 mL de THF. Em seguida foi adicionada uma solução de 1,43 g de Na_2CO_3 em 59,25 mL de H_2O . A solução foi deixada sob agitação mecânica para que o precipitado formado fosse dissolvido. À solução resultante foram adicionados 19,75 mL de NaOH 25%, seguidos rapidamente de outra solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 11,85 g em 59,25 mL de H_2O , sob constante agitação. A solução foi deixada em banho maria durante 1 hora e 45 minutos, em seguida, tendo sido filtrada sobre Celite[®] (terra de infusórios), obtendo-se um filtrado de coloração vinho. A solução foi acidificada com HCl concentrado, formando-se um precipitado laranja, o qual foi



UFMG

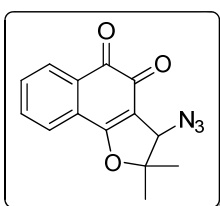
filtrado e lavado sucessivas vezes com H₂O destilada, até total neutralização. Obteve-se um sólido laranja em 68% de rendimento.

3-Bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furano-4,5-diona (13)



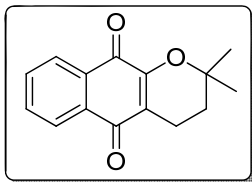
Em um balão foi adicionado (228 mg, 1 mmol), de 2-hidroxi-3-(2-metil-propenil)-[1,4]naftoquinona (**12**) em 25mL de CHCl₃, seguida pela adição de 2 mL de Bromo (6 g, 38 mmol). Após 10 s formou-se um precipitado laranja. A 2-hidroxi-3-(2-metil-propenil)-[1,4]naftoquinona (**12**) é totalmente convertida na substância (**13**).

3-Azido-2,2-dimetil-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona (10)



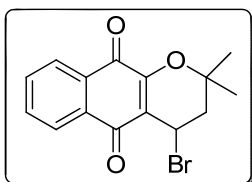
Em um balão foi adicionado (228 mg, 1 mmol) de 2-hidroxi-3-(2-metil-propenil)-[1,4]naftoquinona (**12**) em 25 mL de CHCl₃, seguida pela adição de 2 mL de Bromo (6 g, 38 mmol). Em 10 s formou-se um precipitado laranja e após a retirada do bromo, foi adicionada azida de sódio (1,5 equivalente) em excesso e a solução foi deixada sob agitação durante 12 horas. A formação do azido derivado **10** foi acompanhada por C.C.F. O produto foi obtido em rendimento quantitativo.

2,2-Dimetil-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10--diona (62)



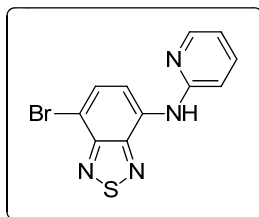
Em um becher de 250 mL foi adicionado lapachol (3) (1,93 g, 8,1 mmol) e, a seguir, adicionados ácido clorídrico concentrado (75 mL) e ácido acético glacial (25 mL) à temperatura ambiente. A mistura reacional foi então colocada durante uma hora em “banho-maria”, até a completa dissolução do reagente. Após resfriamento até a temperatura ambiente, a solução foi vertida sobre água gelada (500 mL). O produto foi separado e filtrado a vácuo. A recristalização do sólido em etanol forneceu a α -lapachona em 70% de rendimento.

4-Bromo-2,2-dimetil-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (73)



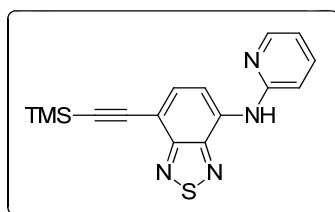
Em uma solução de α -lapachona (7) (0,242 g, 1,0 mmol) em tetracloreto de carbono (30 mL) sob refluxo, em atmosfera de nitrogênio, foi adicionada *N*-bromosuccinimida (0,179 g, 1 mmol) e peróxido de benzoíla em quantidade catalítica. Após uma hora de reação, foi observado, através de C.C.F, a total formação do produto. A mistura reacional foi então filtrada sucessivamente até não apresentar mais succinimida e o filtrado foi concentrado fornecendo a bromo- α -lapachona como um sólido amarelo em 83% de rendimento

7-Bromo-*N*-(piridin-2-il)benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-amina (37)



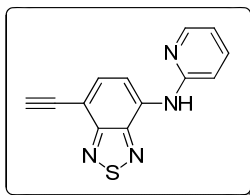
Em um tubo de Schlenk selado foram adicionados (294 mg, 1,0 mmol) de 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola, seguido de Pd(OAc)₂ (23 mg, 0,1 mmol), DPEPhos (54 mg, 0,1 mmol), trietilamina anidra (3 mL) em tolueno anidro (5 mL) e terc-butóxido de sódio (0,37 mL). Foi adicionado à mistura (94,1 mg, 1,0 mmol) de 2-aminopiridina. Essa foi então agitada por 72 horas à temperatura de 100° C. A mistura foi arrefecida e filtrada em Celite[®], a qual foi lavada com acetato de etila. A solução foi concentrada e foi realizada uma purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se uma mistura de acetato de etila e hexano como fase móvel, variando-se a proporção de forma a aumentar gradativamente a polaridade. O produto desejado foi obtido com um rendimento de 47%.

N-(Piridin-2-il)-7-((trimetilsilil)etil)benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-amina (53)



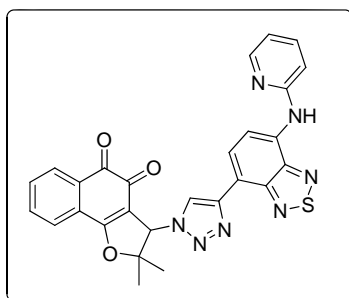
Em um tubo de Schlenk selado foram adicionados (144,4 mg, 0,47 mmol) de 7-bromo-*N*-(piridin-2-il)benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-amina, (5 mg, 0,007 mmol) de Pd(PPh₃)₂Cl₂ e (10 mg, 0,05 mmol) de CuI, dissolvidos em THF (20 mL) e trietilamina (5 mL). Foi adicionado à mistura trimetilsililacetileno (68,8 mg, 0,7 mol) através de uma seringa. A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 48 horas. Os sólidos foram filtrados e o solvente evaporado. O produto foi purificado por cromatografia em gel de sílica, utilizando uma mistura de acetato de etila e hexano como fase móvel. O produto desejado foi obtido em 81% de rendimento. Devido a instabilidade do produto o mesmo não pôde ser caracterizado.

7-Etínil-*N*-(piridin-2-il)benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-amina (51)



Em um balão foi adicionado (123 mg, 0,38 mmol) de *N*-(piridin-2-il)-7-((trimetilsilil)etínil)benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-amina (**53**), que foi dissolvido em metanol e foi adicionado a uma solução (44 mg, 0,76 mmol) de fluoreto de potássio. A mistura reacional foi deixada sob agitação a 50 °C durante a noite (16 h). Foi realizada uma filtração em Celite[®]. O solvente foi evaporado em rotavapor. O produto obtido não pôde ser isolado devido a sua instabilidade.

2,2-Dimetil-3-(4-(7-(piridin-2-ilamino)benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2,3-dihidronafto[1,2-*b*]furan-4,5-diona (54)



Em um balão foram adicionados (134 mg, 0,5 mmol) de 3-azido-nor-β-lapachona, (126 mg, 0,5 mmol) do composto 7-Etínil-*N*-(piridin-2-il)benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-amina, CH₂Cl₂/H₂O na proporção 1:1 (6 mL), CuSO₄·5H₂O (9,3 mg, 0,04 mmol) e ascorbato de sódio (22 mg, 0,11 mmol). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente até a total formação do produto, que foi monitorada por cromatografia em camada delgada. A fase orgânica foi extraída com diclorometano, seca com NaSO₄ e então concentrada em rotavapor. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna, usando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano com acetato de etila como fase móvel, variando-se a proporção de forma a aumentar gradativamente a polaridade. O produto foi obtido como um sólido cristalino alaranjado com 70% de rendimento.

Ponto de fusão: 198,6 – 199,3 °C.

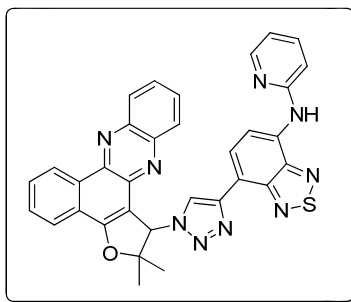
I.V.: (KBr) 1657 (C=O), 1625 (C=O) cm^{-1} .

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 8,60-8,15 (m, 4H); 8,00-7,53 (m, 5H); 7,05-6,80 (m, 2H); 6,10 (s, 1H); 5,30 (s, 1H); 1,81 (s, 3H); 1,30 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz; CDCl_3) δ : 180,2; 174,6; 171,2; 154,2; 151,8; 148,3; 148,0; 143,5; 137,6; 134,8; 133,3; 132,5; 131,5; 129,9; 128,3; 126,8; 125,6; 121,7; 116,4; 114,3; 111,6; 111,5; 110,7; 95,9; 66,9; 27,8; 21,2.

EI/HRMS: (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 522,1340. Calculado para $[\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_3\text{SH}]^+$ 522,1348.

7-(1-(2,2-Dimetil-1,2-dihidrobenzo[a]furo[2,3-c]fenazin-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-N-(piridin-2-il)benzo[c][1,2,5]tiadiazol-4-amina (55)



Em um balão foram adicionados (260 mg, 0,5 mmol) do composto 7-Etilnil-N-(piridin-2-il)benzo[c][1,2,5]tiadiazol-4-amina, acetato de sódio (53,3 mg, 0,65 mmol), 1,2-fenilenodiamina (59,4 mg, 0,55 mmol) e ácido acético glacial (5 mL). A mistura foi deixada sob agitação com refluxo por 12 horas. O produto foi obtido como um sólido laranja com 75% de rendimento.

Ponto de fusão: 262,6 – 264,8 °C.

I.V.: (KBr) 1121 (C-N), 1340 (C-N), 1542 (C=N) cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9,48 (ddd; $J = 0,64$; 1,47 and 7,94 Hz; 1H); 8,52 (d; $J = 8,05$ Hz; 1H); 8,36 (dl; $J = 8,05$ Hz; 1H); 8,31 (dl; $J = 5,15$ Hz; 1H); 8,24-8,28 (m, 2H); 8,22 (s, 1H); 7,96-8,02 (m, 1H); 7,95 (ddd; $J = 1,52$; 7,24 and 7,94 Hz; 1H); 7,89 (ddd; $J = 1,43$; 7,24 and 7,78 Hz; 1H); 7,79-7,69 (m, 2H); 7,59 (ddd; $J = 1,90$; 7,24 and 8,44 Hz; 1H); 6,92 (dl; $J = 8,44$ Hz; 1H); 6,85 (ddd; $J = 0,87$; 5,15 and 7,23 Hz; 1H); 6,77 (s, 1H); 1,85 (s, 3H); 1,41 (s, 3H).

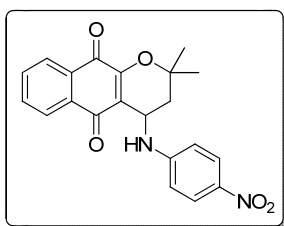


UFMG

^{13}C NMR (100 MHz; CDCl_3) δ : 160,46; 154,47; 152,25; 148,85; 147,32; 143,51; 143,08; 142,16; 141,27; 140,74; 138,35; 133,72; 132,14; 130,27; 130,16; 130,00; 129,92; 128,19; 126,49; 129,30; 128,87; 124,62; 123,59; 122,07; 116,38; 111,99; 111,78; 109,28; 93,01; 69,31; 28,08; 21,90.

EI/HRMS: (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 594,1780. Calculado para $[\text{C}_{33}\text{H}_{23}\text{N}_9\text{OSH}]^+$ 594,1824.

2,2-Dimetil-4-((4-nitrofenil)amino)-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (74)



O derivado **73** (321 mg, 1 mmol) foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, seguido pela adição de 4-nitroanilina (138 mg, 1 mmol). A mistura foi agitada sem aquecimento por cerca de 19 horas. O composto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente hexano:acetato de etila em polaridade crescente, obtendo-se a 2,2-Dimetil-4-((4-nitrofenil)amino)-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (227 mg, 0,6 mmol, 60% de rendimento) como um sólido vermelho.

Ponto de fusão: 223,0 – 225,0 °C.

I.V.: (KBr) 1337 (N=O), 1517 (N=O), 1609 (arom. C=C), 1686 (C=O), 3387 (R_2NH).

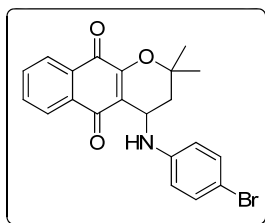
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 8,13-7,92 (m, 2H); 7,78-7,59 (m, 2H); 7,23-7,02 (m, 1H); 6,60-6,32 (m, 3H); 4,64 (dd; $J = 3,25$ e $5,31$ Hz; 1H); 2,28 (dd; $J = 3,29$ e $14,43$ Hz; 1H); 1,99 (dd; $J = 5,25$ e $14,32$ Hz; 1H); 1,55 (s, 3H); 1,53 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz; CDCl_3) δ : 183,68; 179,97; 155,56; 148,90; 134,54; 133,39; 132,17; 131,00; 130,68; 130,47; 126,58; 126,34; 118,65; 109,67; 109,63; 100,73; 79,29; 43,45; 37,55; 29,00; 26,34.



UFMG

4-((4-Bromophenyl)amino)-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione (75)



O derivado **73** (321 mg, 1 mmol) foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, seguido pela adição de 4-bromoanilina (172 mg, 1 mmol). A mistura foi agitada sem aquecimento por cerca de 19 horas. O composto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente hexano:acetato de etila em polaridade crescente, obtendo-se a 4-((4-bromofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (247 mg, 0,6 mmol, 60% de rendimento) como um sólido vermelho.

Ponto de fusão: 174,0 – 176,0 °C.

I.V.: (KBr) 1609 (arom. C=C), 1686 (C=O), 3386 (R₂NH).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8,22-7,99 (m, 2H); 7,82-7,65 (m, 2H); 7,29 (d; $J = 8,61$ Hz; 2H); 6,60 (d; $J = 8,51$ Hz; 2H); 4,64 (dd; $J = 3,37$ e 4,87 Hz; 1H); 2,25 (dd; $J = 3,60$ e 14,37 Hz; 1H); 2,00 (dd; $J = 5,52$ e 14,70 Hz; 1H); 1,54 (s, 3H); 1,53 (s, 3H).

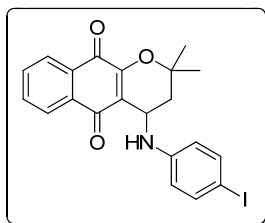
¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ : 183,78; 183,03; 155,53; 146,11; 134,58; 133,44; 132,22; 131,02; 126,63; 126,39; 118,83; 115,49; 110,20; 96,61; 79,30; 43,58; 37,58; 28,95; 26,39.

EI/HRMS: (m/z) [M+H]⁺ 413,9983. Calculado para [C₂₁H₁₈BrNO₃]⁺ 413,2765.



UFMG

4-((4-Iodofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (76)



O derivado **73** (321 mg, 1 mmol) foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, seguido pela adição de 4-iodoanilina (219 mg, 1 mmol). A mistura foi agitada sem aquecimento por cerca de 19 horas. O composto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente hexano:acetato de etila em polaridade crescente, obtendo-se a 4-((4-iodofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (229 mg, 0,5 mmol, 50% de rendimento) como um sólido vermelho.

Ponto de fusão: 154,0 – 156,0 °C.

I.V.: (KBr) 1608 (arom. C=C), 1686 (arom. C=O), 3376 (R₂NH).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8,14-7,99 (m, 2H); 7,77-7,65 (m, 2H); 7,46 (d; $J = 8,80$ Hz; 2H); 6,50 (d; $J = 8,62$ Hz; 2H); 4,64 (dd; $J = 3,57$ e $5,34$ Hz; 1H); 2,24 (dd; $J = 3,23$ e $14,34$ Hz; 1H); 1,99 (dd; $J = 5,40$ e $14,48$ Hz; 1H); 1,53 (s, 3H); 1,52 (s, 3H).

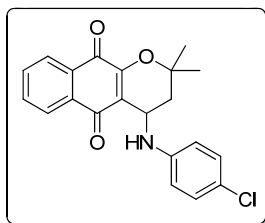
¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ : 183,77; 179,98; 155,56; 146,51; 138,11; 134,57; 133,45; 132,19; 131,04; 126,64; 126,40; 118,69; 118,69; 116,20; 79,58; 79,30; 76,60; 76,34; 43,56; 37,51; 28,88; 26,44.

EI/HRMS: (m/z) [M+H]⁺ 460,0164. Calculado para [C₂₁H₁₈INO₃]⁺ 460,2770.



UFMG

4-((4-Clorofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (77)



O derivado **73** (321 mg, 1 mmol) foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, seguido pela adição de 4-cloroanilina (128 mg, 1 mmol). A mistura foi agitada sem aquecimento por cerca de 19 horas. O composto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente hexano:acetato de etila em polaridade crescente, obtendo-se a 4-((4-clorofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (184 mg, 0,5 mmol, 50% de rendimento) como um sólido vermelho.

Ponto de fusão: 159,0 – 161,0 °C.

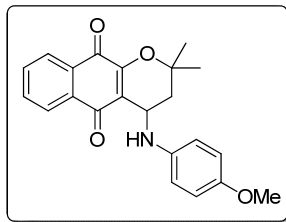
I.V.: (KBr) 1612 (arom. C=C), 1690 (C=O), 3384 (R₂NH).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8,11-7,98 (m, 2H); 7,76-7,64 (m, 2H); 7,15 (d; $J = 8,58$ Hz; 2H); 6,64 (d; $J = 8,57$ Hz; 2H); 4,63 (dd; $J = 2,78$ e 5,12 Hz; 1H); 2,25 (dd; $J = 3,49$ e 14,46 Hz; 1H); 1,99 (dd; $J = 5,68$ e 14,26 Hz; 1H); 1,56 (s, 3H); 1,52 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ : 183,82; 180,00; 155,56; 145,60; 134,55; 133,44; 132,23; 131,08; 129,37; 126,63; 126,40; 123,33; 118,85; 115,22; 79,31; 78,11; 78,06; 43,86; 28,88; 26,46.

EI/HRMS: (m/z) [M+H]⁺ 368,0853. Calculado para [C₂₁H₁₈ClNO₃]⁺ 368, 8255.

4-((4-Metóxi)fenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona
(78)



O derivado **73** (321 mg, 1 mmol) foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, seguido pela adição de 4-anisidina (123 mg, 1 mmol). A mistura foi agitada sem aquecimento por cerca de 19 horas. O composto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente hexano:acetato de etila em polaridade crescente, obtendo-se a 4-((4-metóxi)fenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (137 mg, 0,37 mmol, 37% de rendimento) como um sólido marrom.

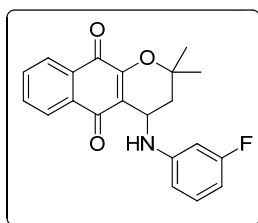
Ponto de fusão: 149,0 – 150,0 °C.

I.V.: (KBr) 1514 (arom. C=C), 1606 (arom. C=C), 1686 (C=O), 3372 (R₂NH).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8,13-8,04 (m, 2H); 7,77-7,67 (m, 2H); 6,87-6,74 (m, 4H); 4,62-4,55 (m, 1H); 3,77 (s, 3H); 2,24 (dd; $J = 4,05$ e $14,17$ Hz; 1H); 2,00 (dd; $J = 5,57$ e $14,14$ Hz; 1H); 1,56 (s, 3H); 1,49 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ : 183,78; 179,88; 155,10; 153,10; 140,99; 134,23; 133,12; 132,05; 130,80; 126,26; 119,42; 116,56; 114,83; 79,15; 55,68; 44,67; 37,50; 28,62; 26,43.

4-((3-Fluorofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona
(79)



O derivado **73** (321 mg, 1 mmol) foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, seguido pela adição de 3-fluoroanilina (111 mg, 1 mmol). A mistura foi agitada sem aquecimento por cerca de 19 horas. O composto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente hexano:acetato de etila em polaridade crescente, obtendo-se a 4-((3-fluorofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (176 mg, 0,5 mmol, 50% de rendimento) como um sólido vermelho.

Ponto de fusão: 152,0 – 154,0 °C.

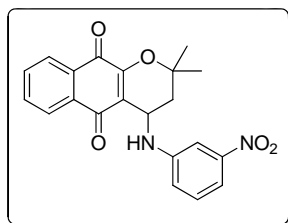
I.V.: (KBr) 1608 (C=C), 1686 (arom. C=O), 3382 (R₂NH).

¹H NMR (200 MHz; CDCl₃) δ : 8,15-7,99 (m, 2H); 7,77-7,64 (m, 2H); 7,19-7,06 (m, 2H); 6,55-6,40 (m, 2H); 4,67 (dd, *J* = 3,5 e 5,5, 1H); 2,27 (dd, *J* = 2,2 e 13,8, 1H); 2,02 (dd, *J* = 5,0, e 13,8, 1H); 1,54 (s, 3H); 1,53 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ : 183,76; 180,02; 155,62; 148,63; 134,57; 133,43; 132,25; 131,09; 126,64; 126,43; 118,65; 109,79; 109,79; 109,77; 104,80; 79,31; 77,86; 76,39; 43,63; 37,66; 28,95; 26,42.

EI/HRMS: (*m/z*) [M+H]⁺ 352,1200. Calculado para [C₂₁H₁₈FNO₃]⁺ 352,3709.

4-((3-Nitrofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (80)



O derivado **73** (321 mg, 1 mmol) foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, seguido pela adição de 3-nitroanilina (138 mg, 1 mmol). A mistura foi agitada sem aquecimento por cerca de 19 horas. O composto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente hexano:acetato de etila em polaridade crescente, obtendo-se a 4-((3-nitrofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (170 mg, 0,45 mmol, 45% de rendimento) como um sólido laranja.

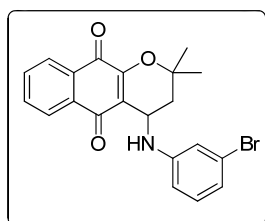
Ponto de fusão: 152,0 – 154,0 °C.

I.V.: (KBr) 1336 (N=O), 1528 (N=O), 1614 (C=C), 1672 (arom. C=O), 3386 (R₂NH).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8,02-7,88 (m, 2H); 7,75-7,60 (m, 2H); 7,40-6,66 (m, 4H); 4,87-4,61 (m, 1H); 2,35-2,17 (m, 1H); 2,14-1,98 (m, 1H); 1,58 (s, 3H); 1,56 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ : 183,55; 179,44; 155,52; 149,18; 147,61; 134,34; 133,30; 131,75; 130,64; 129,67; 126,46; 125,90; 118,97; 117,83; 112,48; 107,02; 79,08; 76,32; 42,98; 26,05.

4-((3-Bromofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona
(81)



O derivado **73** (321 mg, 1 mmol) foi dissolvido em 15 mL de diclorometano, seguido pela adição de 3-nitroanilina (172 mg, 1 mmol). A mistura foi agitada sem aquecimento por cerca de 19 horas. O composto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente hexano:acetato de etila em polaridade crescente, obtendo-se a 4-((3-bromofenil)amino)-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona (124 mg, 0,3 mmol, 30% de rendimento) como um sólido vermelho.

Ponto de fusão: 182,0 – 185,0 °C.

I.V.: (KBr) 1598 (C=C), 1676 (arom. C=O), 3410 (R₂NH).

¹H NMR (200 MHz; CDCl₃) δ : 8,10-7,95 (m, 2H); 7,75-7,58 (m, 2H); 7,09-6,55 (m, 4H); 4,17-4,59 (m, 1H); 2,26 (dd, $J = 2,2$ e $14,4$, 1H); 1,99 (dd, $J = 5,3$ e $14,1$, 1H); 1,54 (s, 3H); 1,52 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz; CDCl₃) δ : 183,40; 179,72; 155,32; 148,08; 134,29; 133,15; 131,94; 130,79; 130,52; 126,35; 126,12; 123,23; 120,97; 118,35; 116,05; 112,29; 79,00; 43,10; 37,34; 28,79; 26,07.

EI/HRMS: (m/z) [M+H]⁺ 413,0397. Calculado para [C₂₁H₁₈BrNO₃]⁺ 413,2765.

5.4. – Protocolo de avaliação da atividade antitumoral (Laboratório da Professora Claudia Pessoa – Universidade Federal do Ceará)

Foram utilizadas as seguintes linhagens nos estudos anti-câncer: MOLT-4 (leucemia), CEM (leucemia), K562 (leucemia), HL-60 (leucemia), OVCAR-8 (ovários), MDA-MB-435 (mama), MDA-MB-231 (mama), MCF-7 (mama), HS-578-T (mama), MX1 (mama), HS578t (mama), SW-620 (cólon), HCT-8 (cólon), COLO-205 (cólon), HCT-15 (cólon), SF295 (sistema nervoso central), PC3 (próstata), DU-145 (próstata), UACC-62 (melanoma), NCI-H358 (carcinoma de pulmão de células não pequenas), V79 (fibroblastos murinos), L929 (fibroblatos murinos) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano), que foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA), sendo cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido estéril na concentração estoque de 5mg/mL. A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano. É um método rápido, sensível e barato. Foi descrito primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de substratos de enzimas microssomais e mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação.

A determinação das concentrações inibitórias médias (CI₅₀) dos compostos **X** e **F** foram realizadas pelo método do MTT em concentração de 25 µg/mL. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços.

As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais de 25 µg/mL e adicionadas em placa de 96 poços 100 µL/ poço. Após um período de incubação de 72 horas, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm / 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 150 µL de solução de MTT 10% em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5%



UFMG

de CO₂ por 3 horas. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm / 10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspenso em 150 µL de DMSO e agitado por 30 minutos, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 595nm. O cálculo das CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos IC95% (intervalo de 95% de confiança) foram realizados a partir da regressão não-linear no programa *GraphPad Prism* (versão 4). A análise foi feita a partir de dois experimentos realizados em triplicata.

Anexos

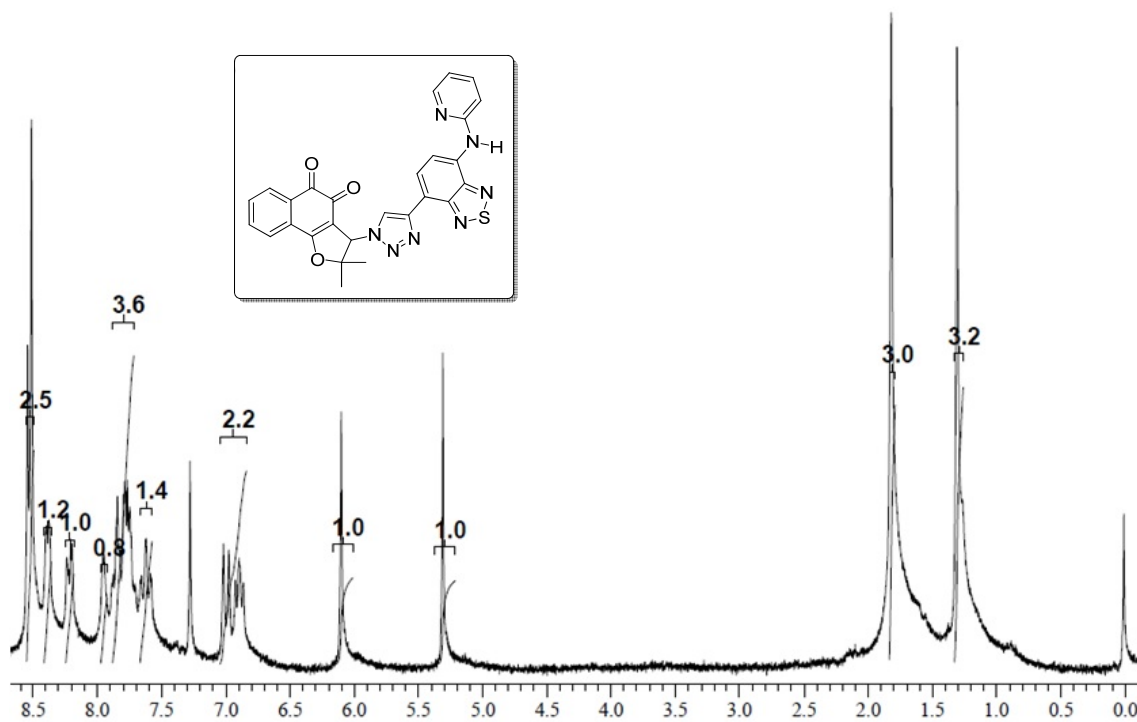


Figura 1. Espectro de RMN de ¹H, CDCl₃, (200 MHz), da substância **54**.

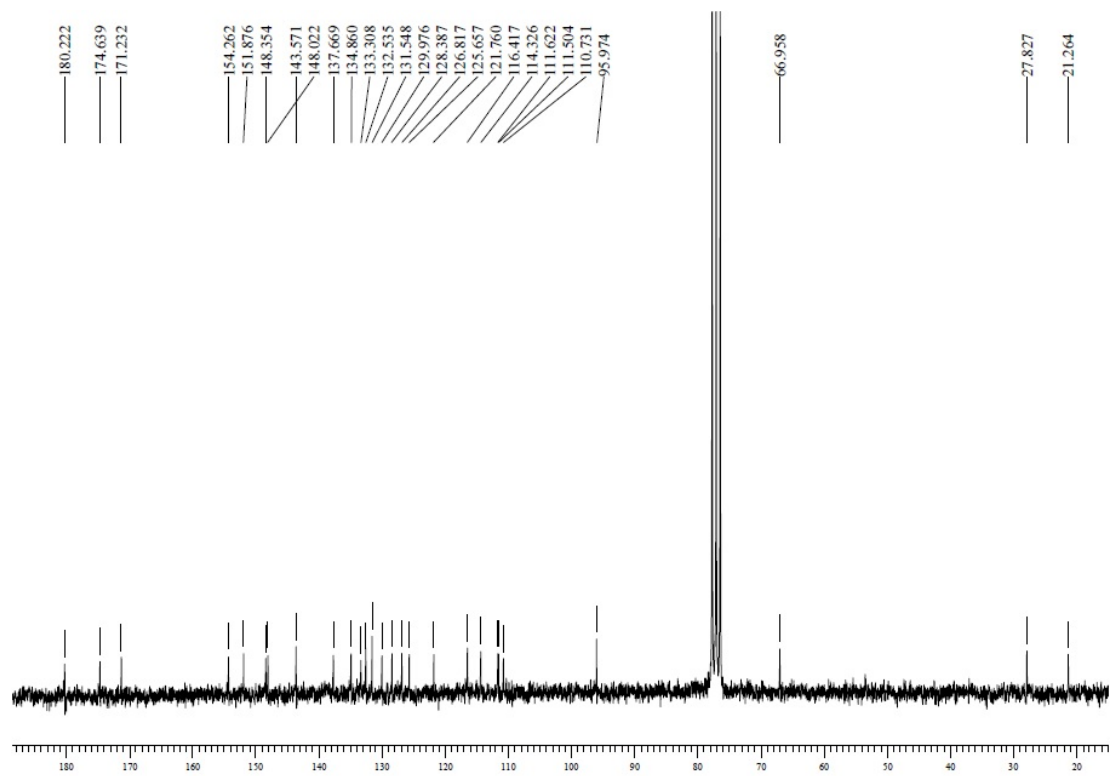


Figura 2. Espectro de RMN de ^{13}C , CDCl_3 , (50 MHz), da substância **54**.

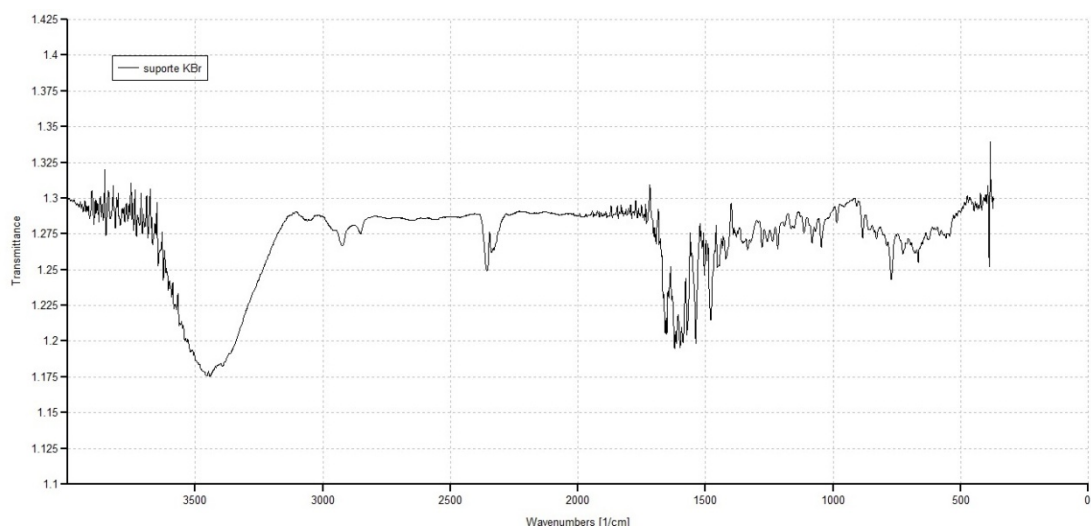


Figura 3. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **54**.

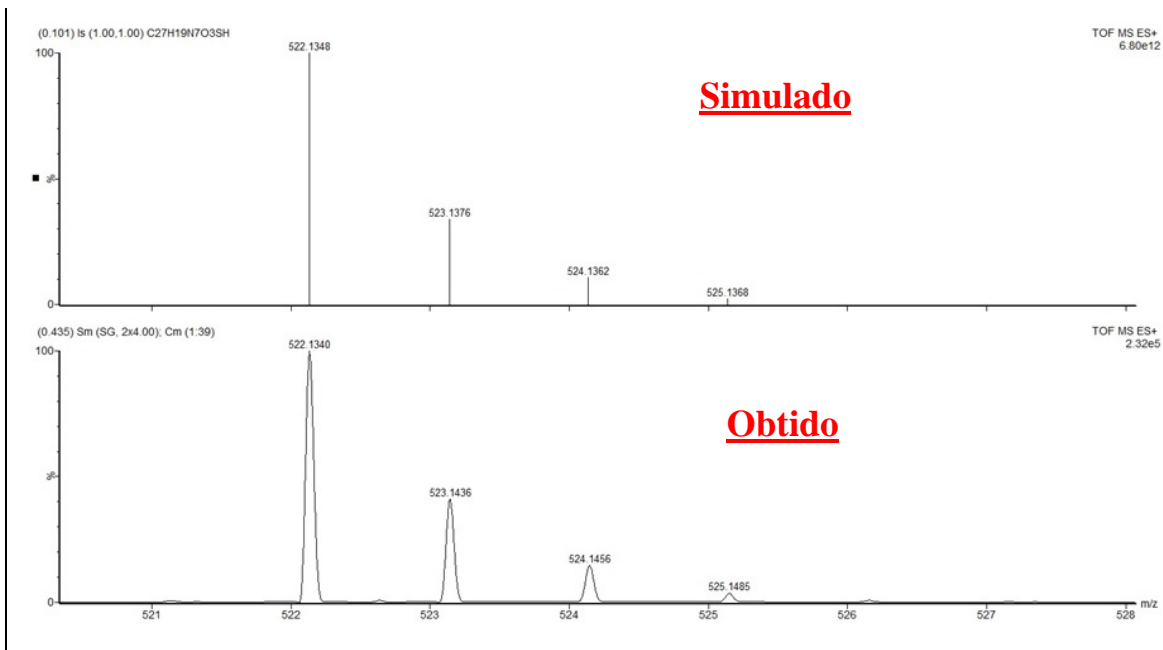


Figura 4. Espectro de massas de alta resolução, da substância **54**.

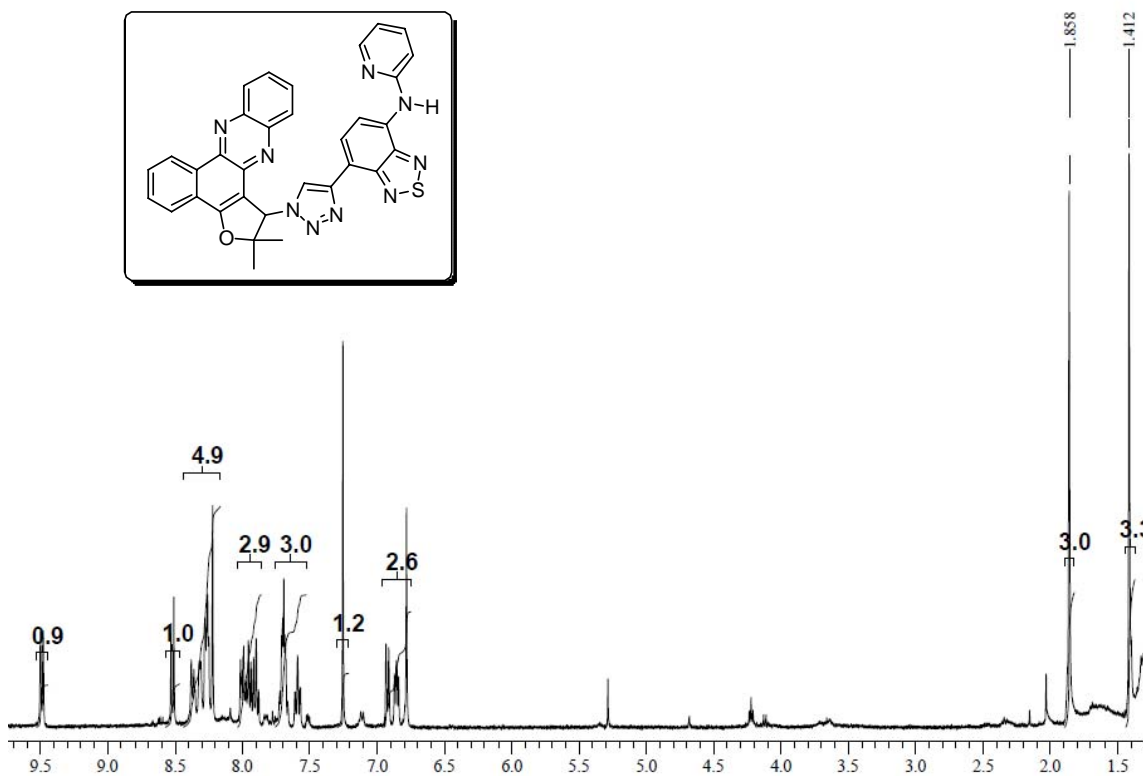


Figura 5. Espectro de RMN de ¹H, CDCl₃, (400 MHz), da substância **55**.

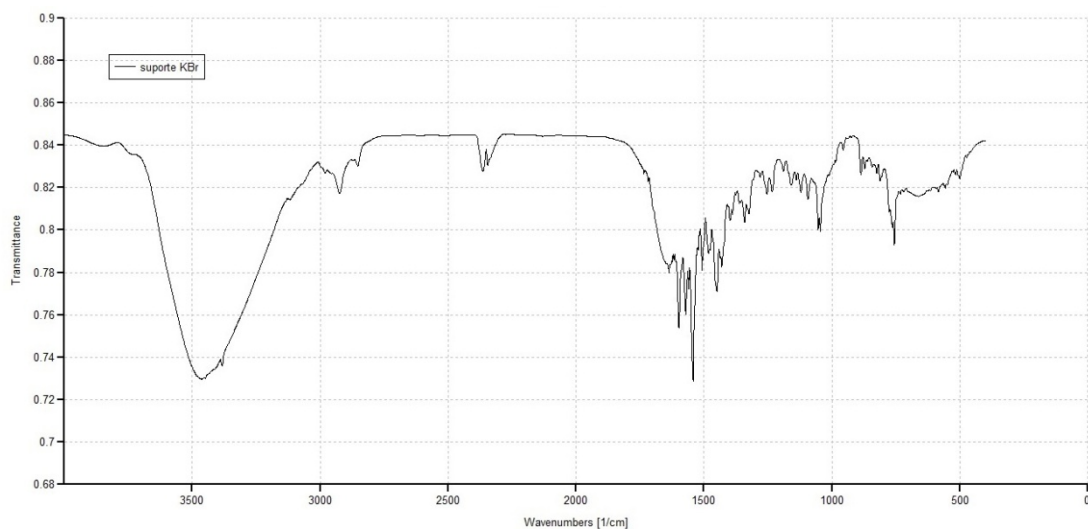


Figura 6. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **55**.

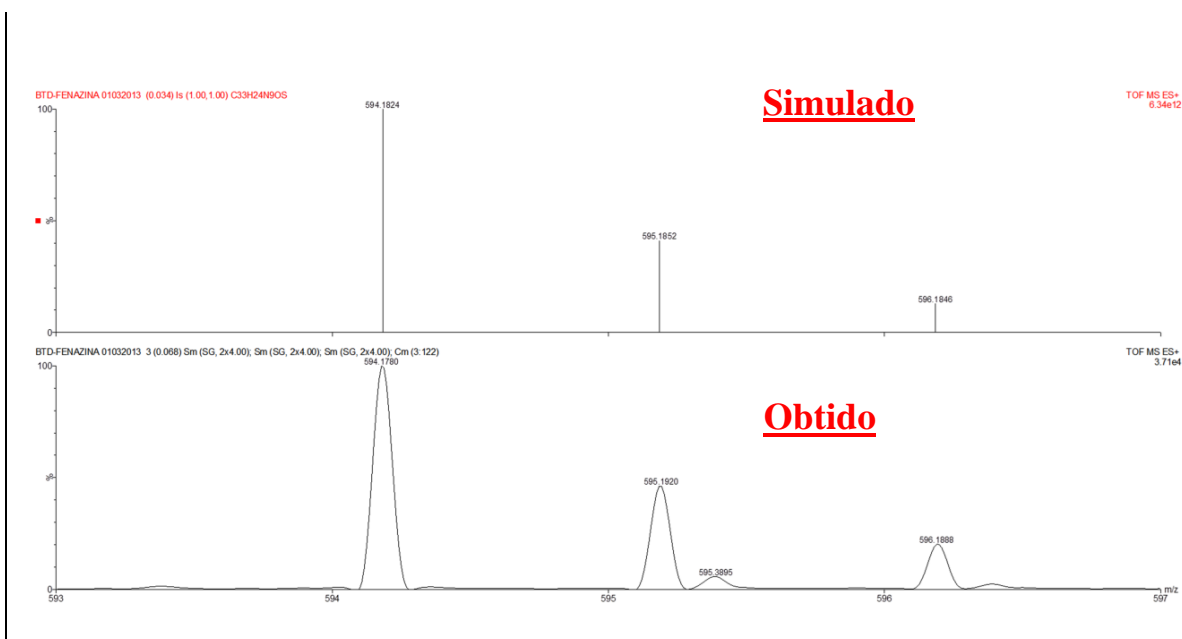


Figura 7. Espectro de massas de alta resolução, da substância **55**.

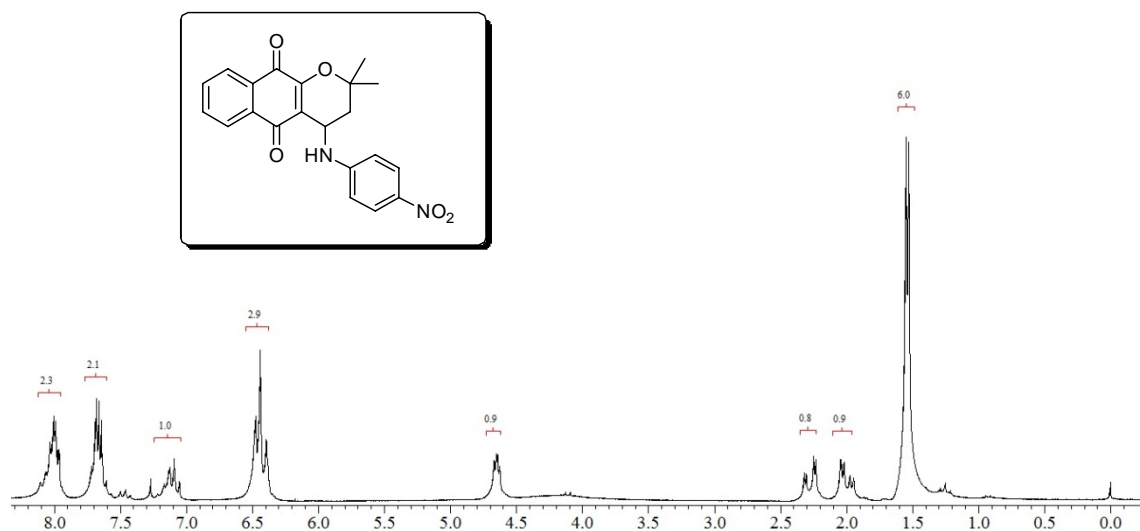


Figura 8. Espectro de RMN de ¹H, CDCl₃, (200 MHz), da substância **74**.

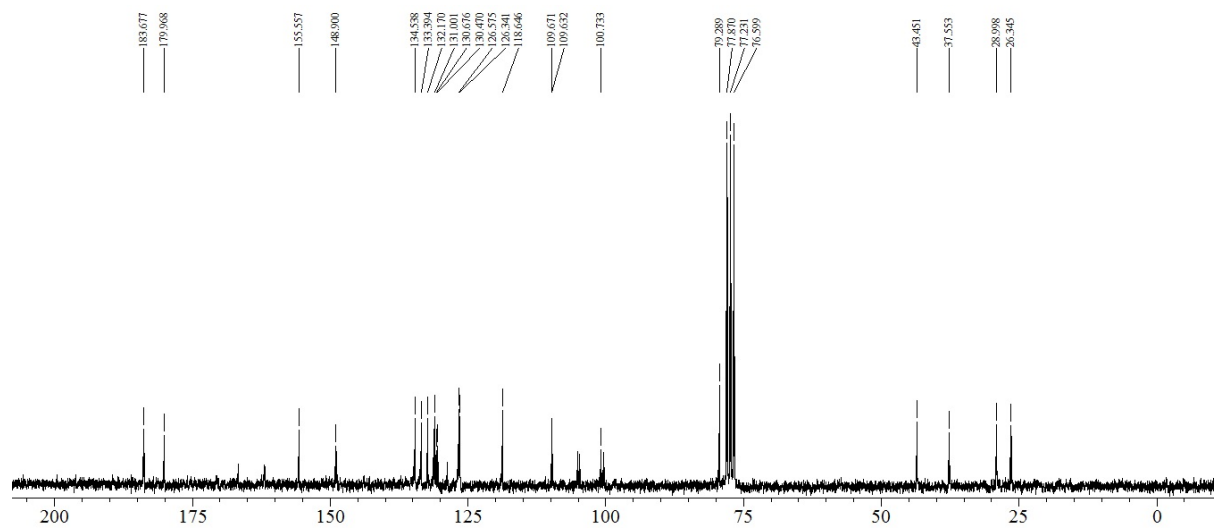


Figura 9. Espectro de RMN de ¹³C, CDCl₃, (50 MHz), da substância **74**.

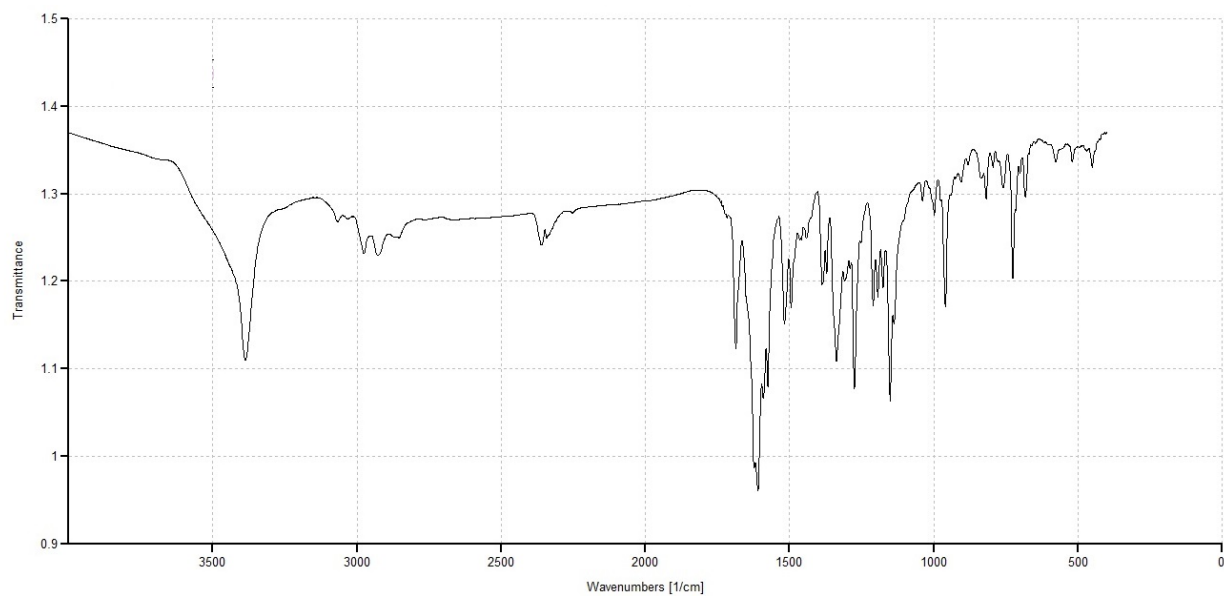


Figura 10. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **74**.

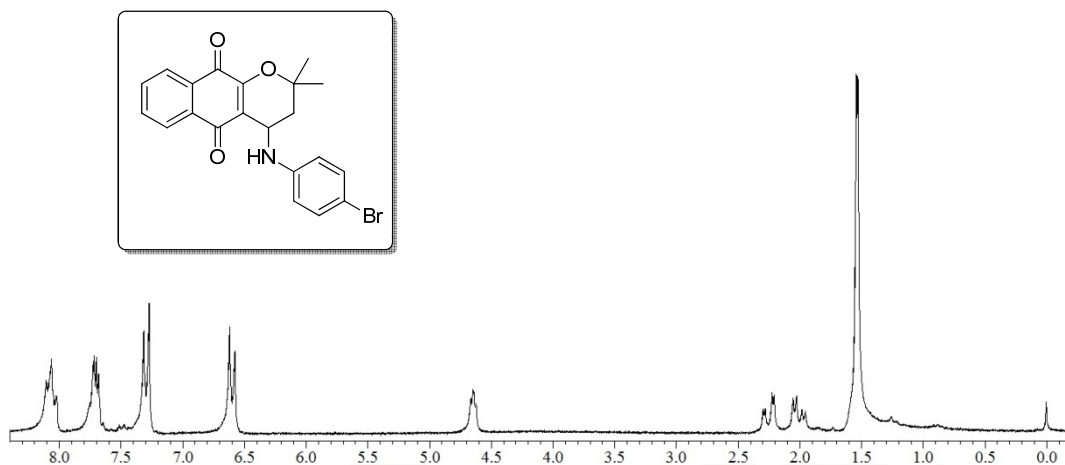


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H , CDCl_3 , (200 MHz), da substância **75**.

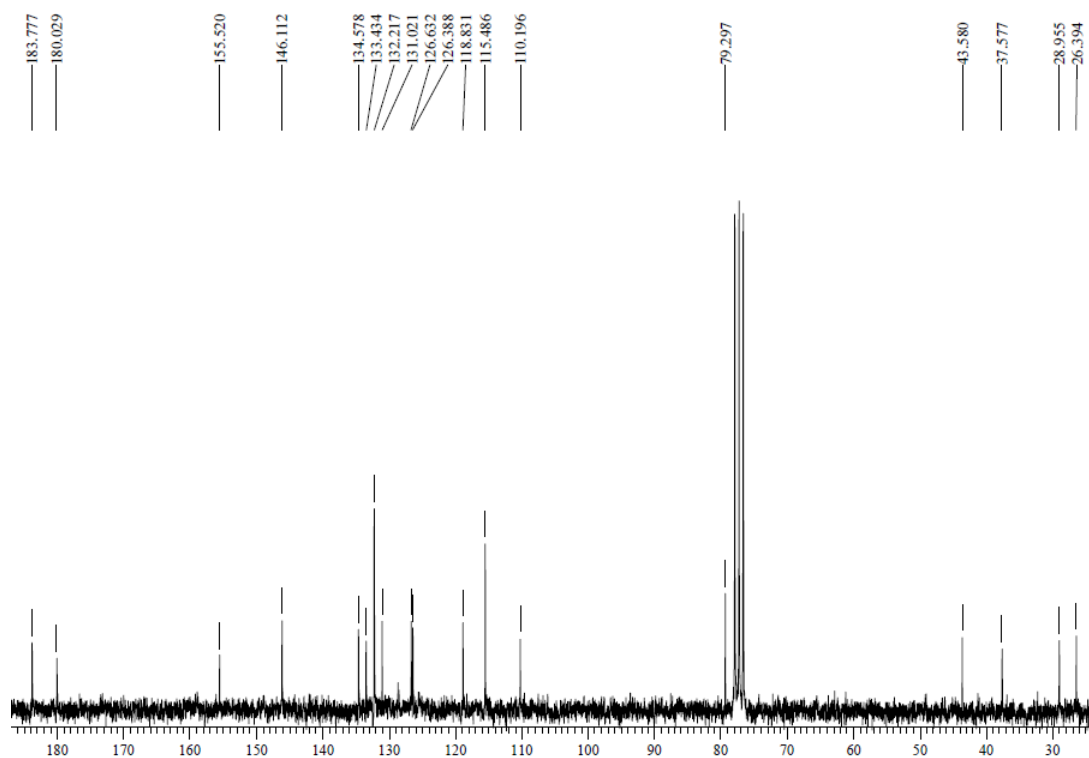


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C , CDCl_3 , (50 MHz), da substância **75**.

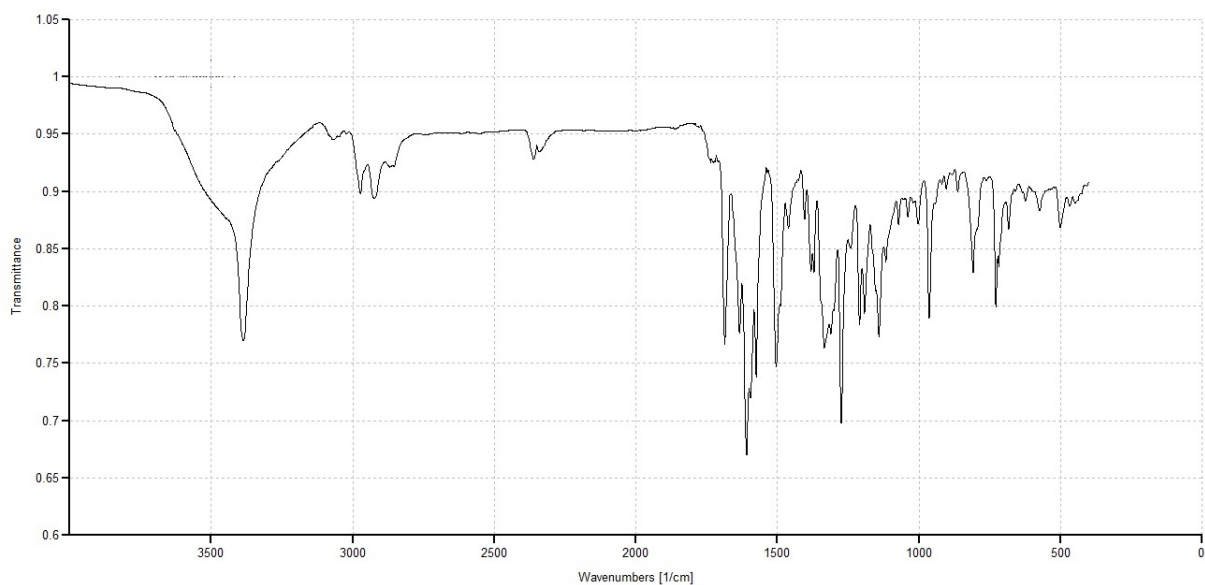


Figura 13. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **75**.

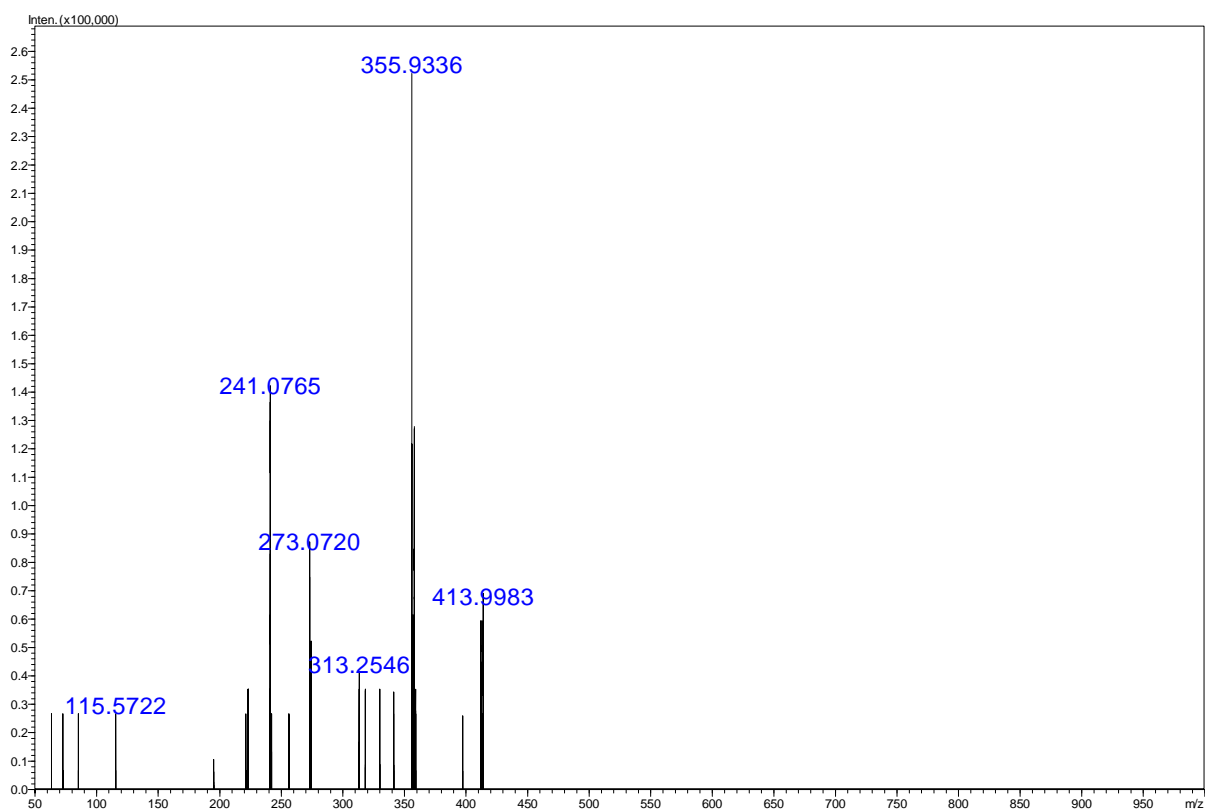


Figura 14. Espectro de massas de alta resolução, da substância **75**.

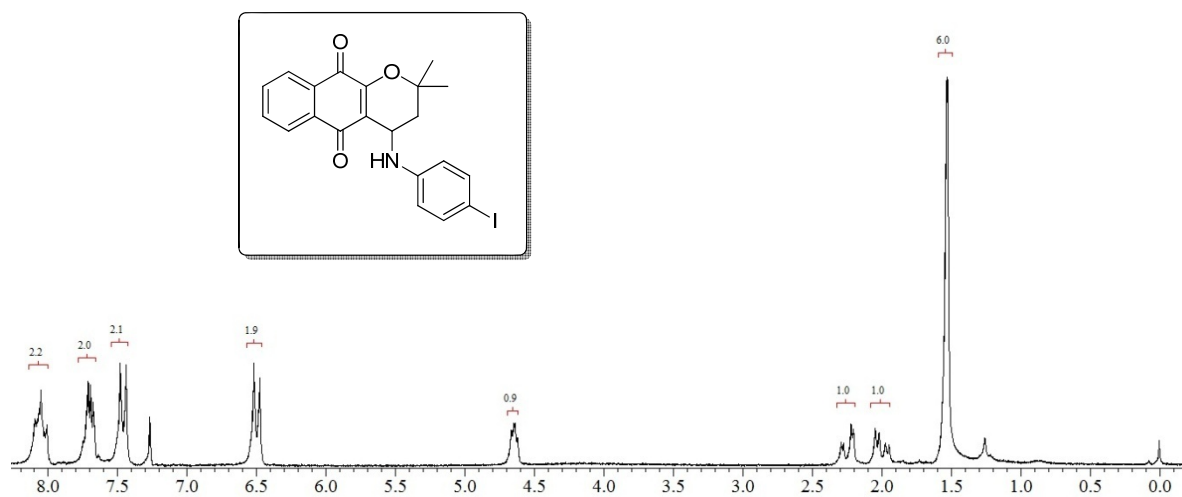


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H , CDCl_3 , (200 MHz), da substância **76**.

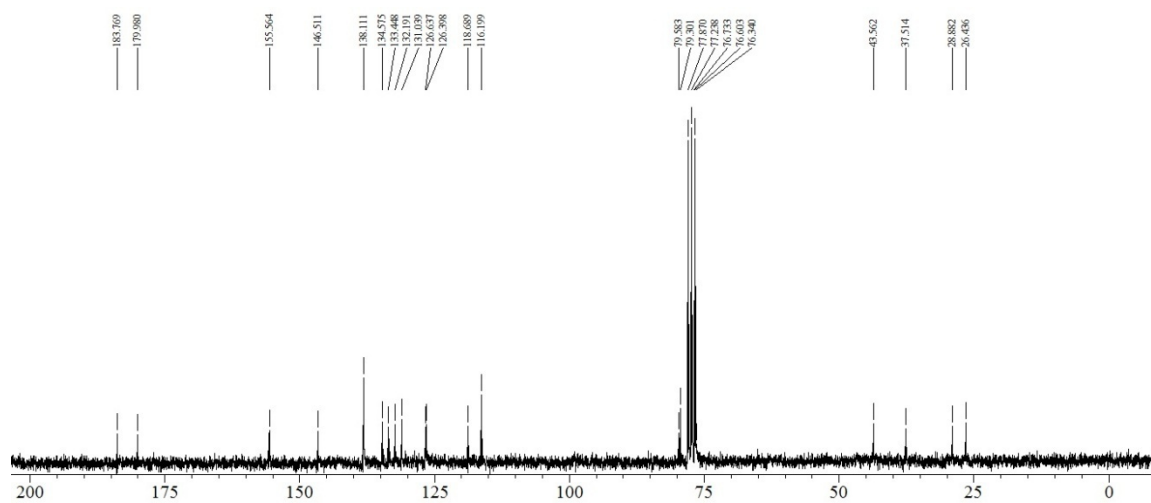


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C , CDCl_3 , (50 MHz), da substância **76**.

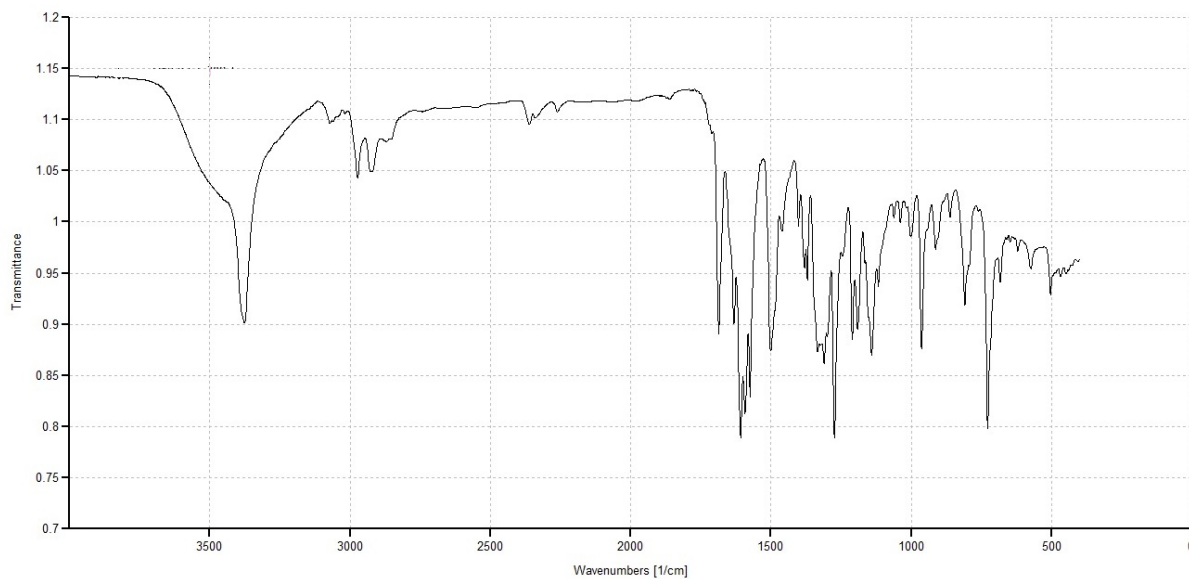


Figura 17. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **76**.

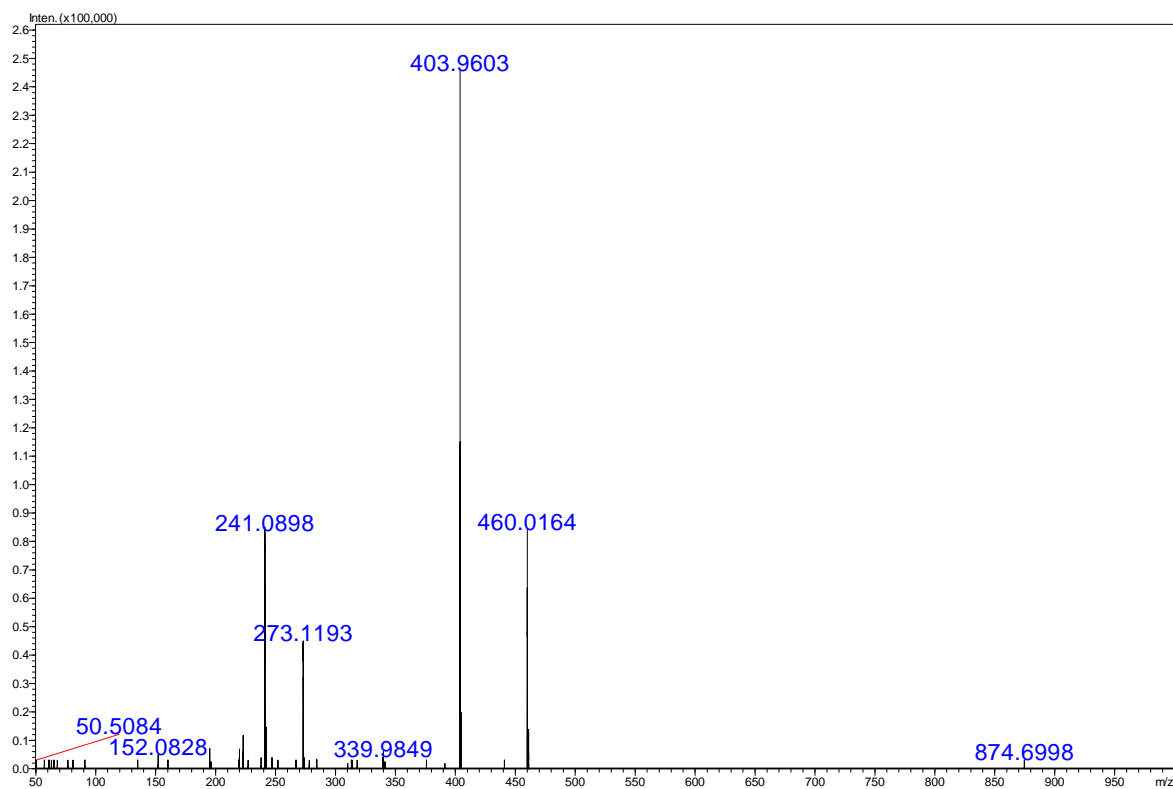


Figura 18. Espectro de massas de alta resolução, da substância **76**.

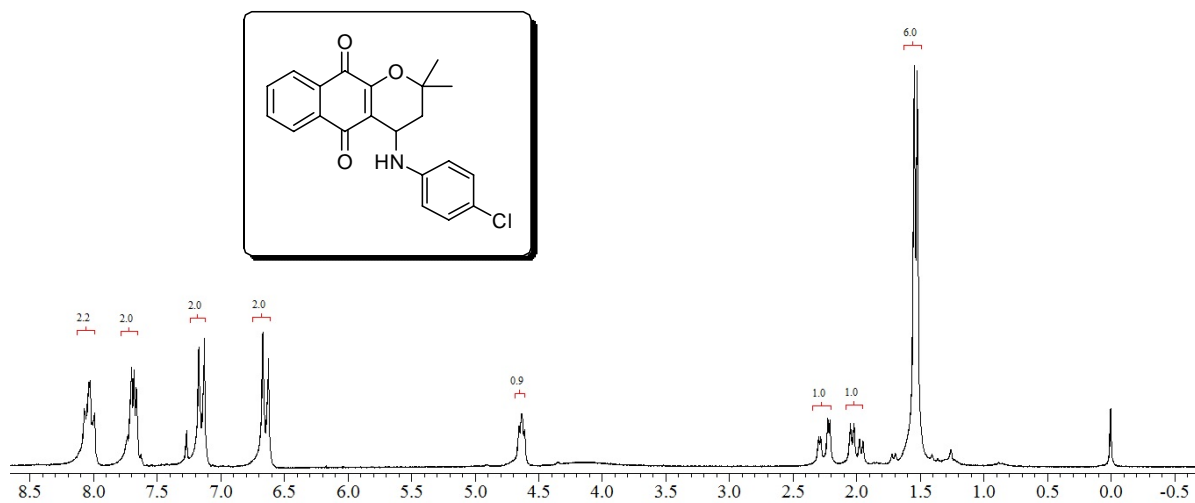


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H , CDCl_3 , (200 MHz), da substância **77**.

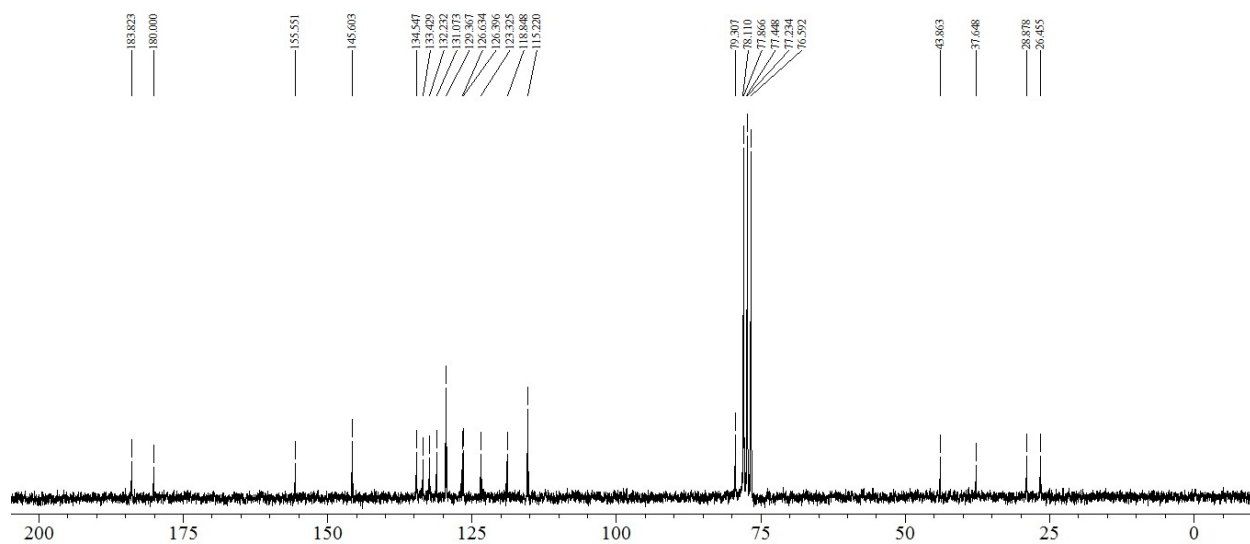


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C , CDCl_3 , (50 MHz), da substância **77**.

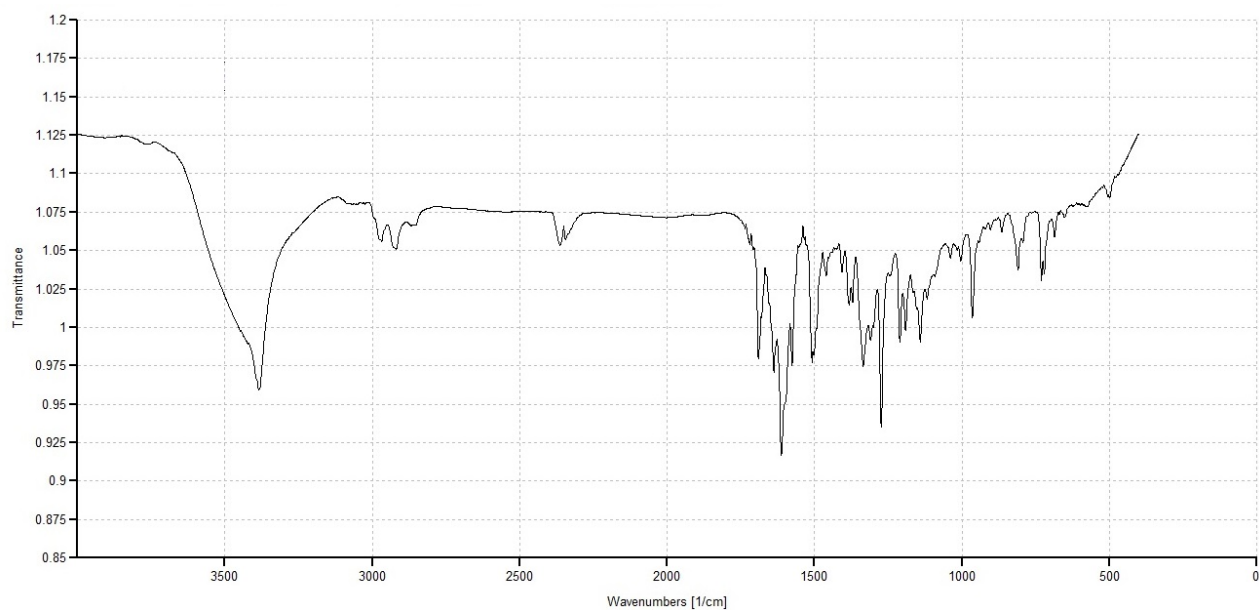


Figura 21. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância 77.

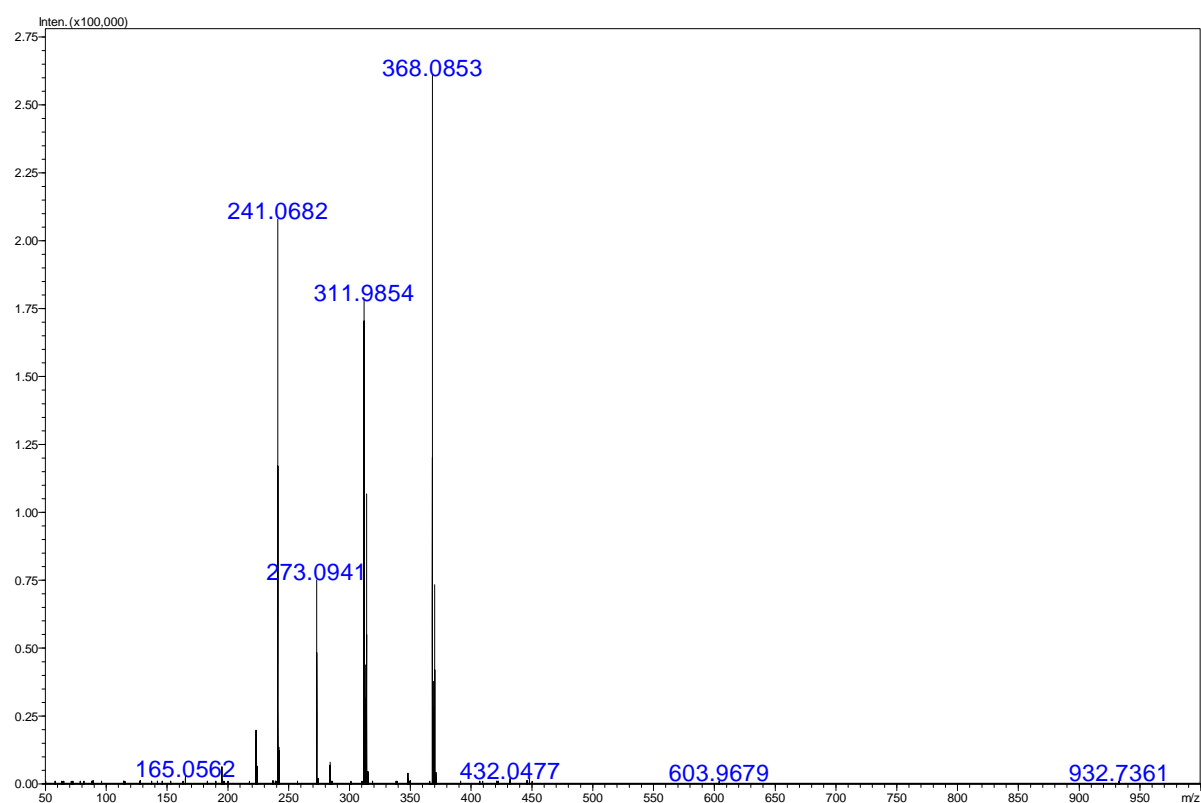


Figura 22. Espectro de massas de alta resolução, da substância 77.

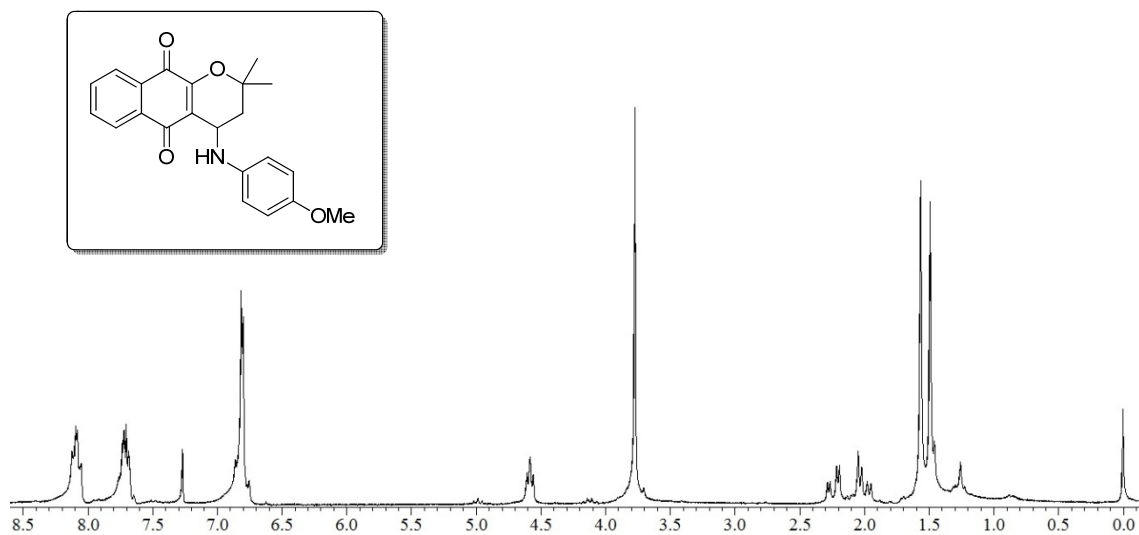


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H , CDCl_3 , (200 MHz), da substância **78**.

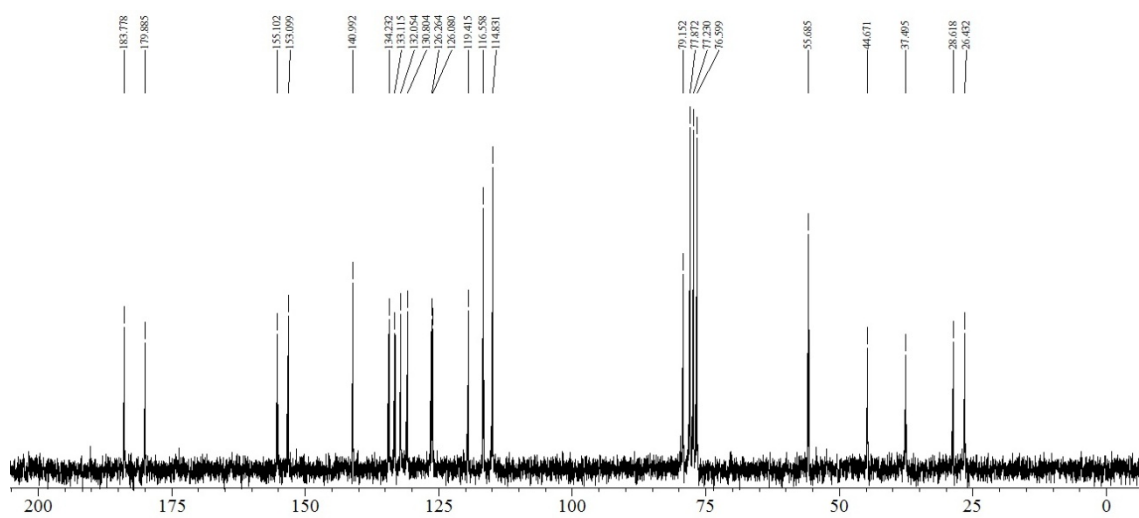


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C , CDCl_3 , (50 MHz), da substância **78**.

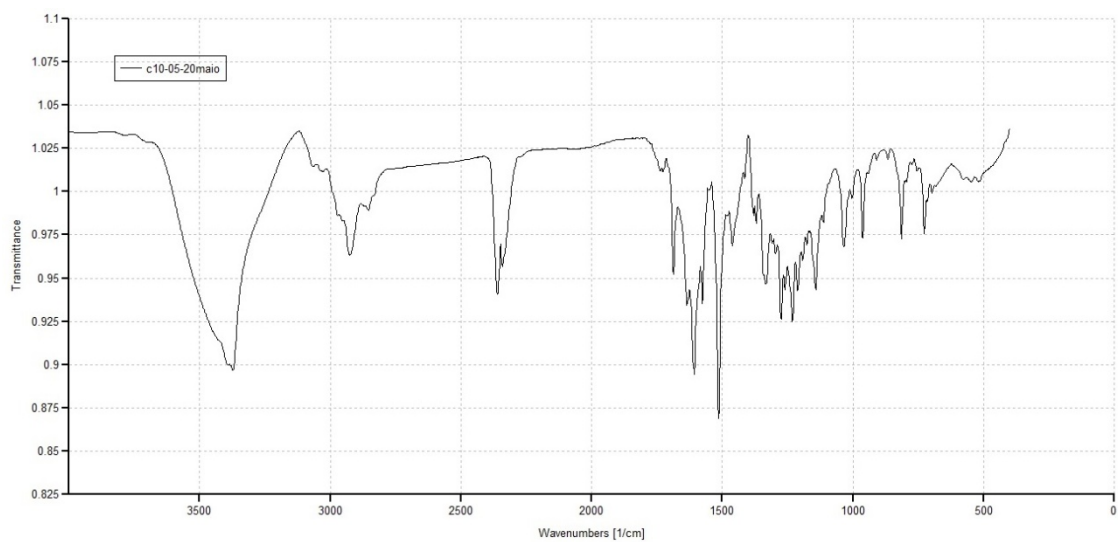


Figura 25. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **78**.

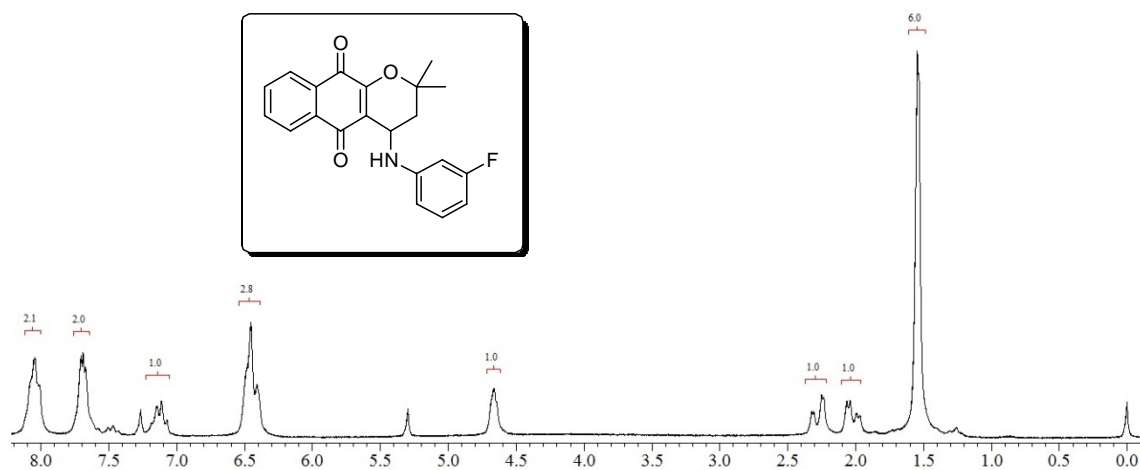


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H , CDCl_3 , (200 MHz), da substância **79**.

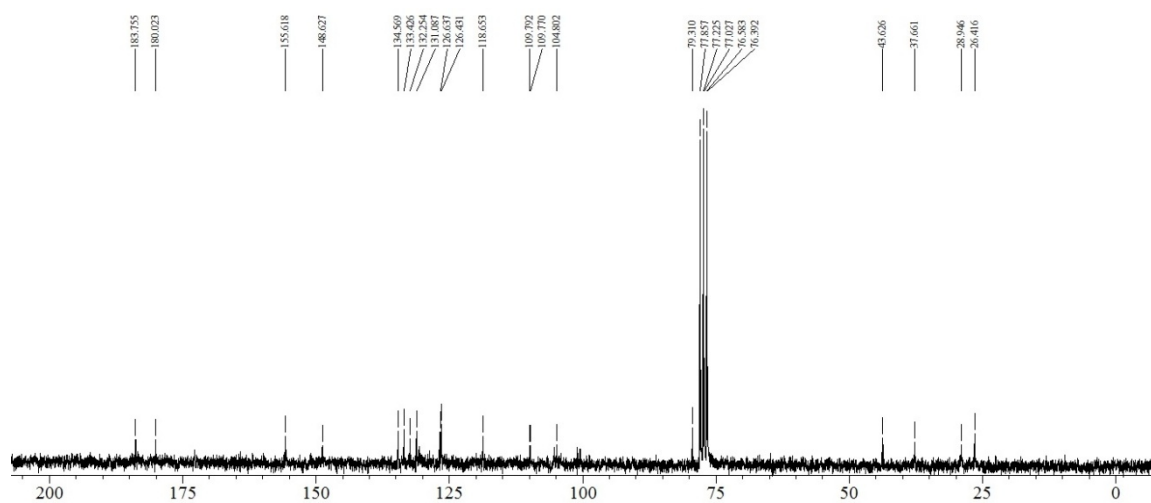


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C , CDCl_3 , (50 MHz), da substância **79**.

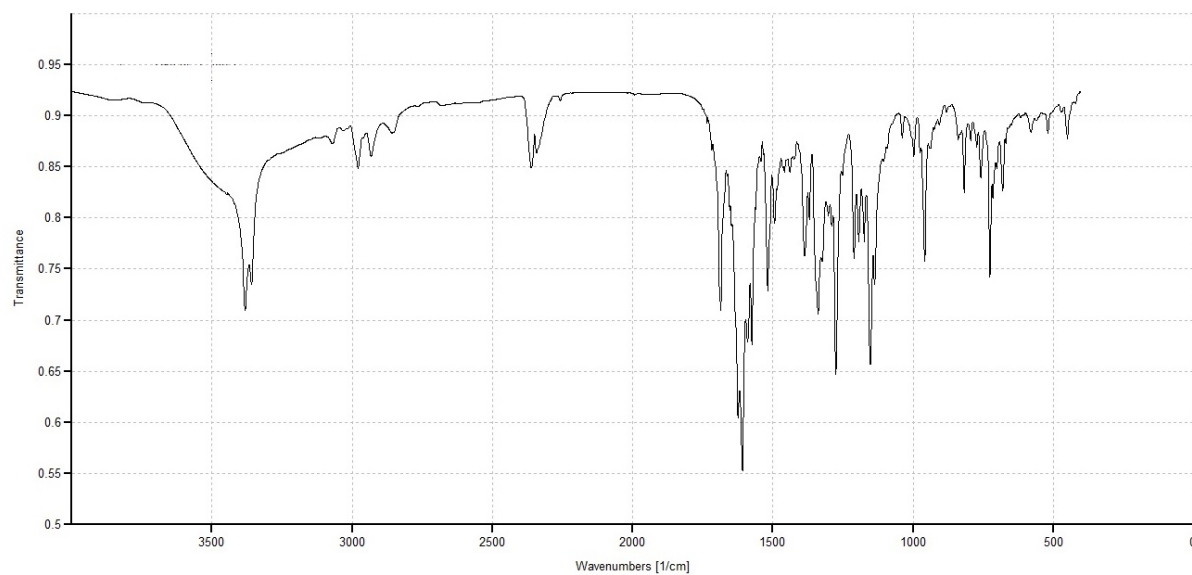


Figura 28. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **79**.

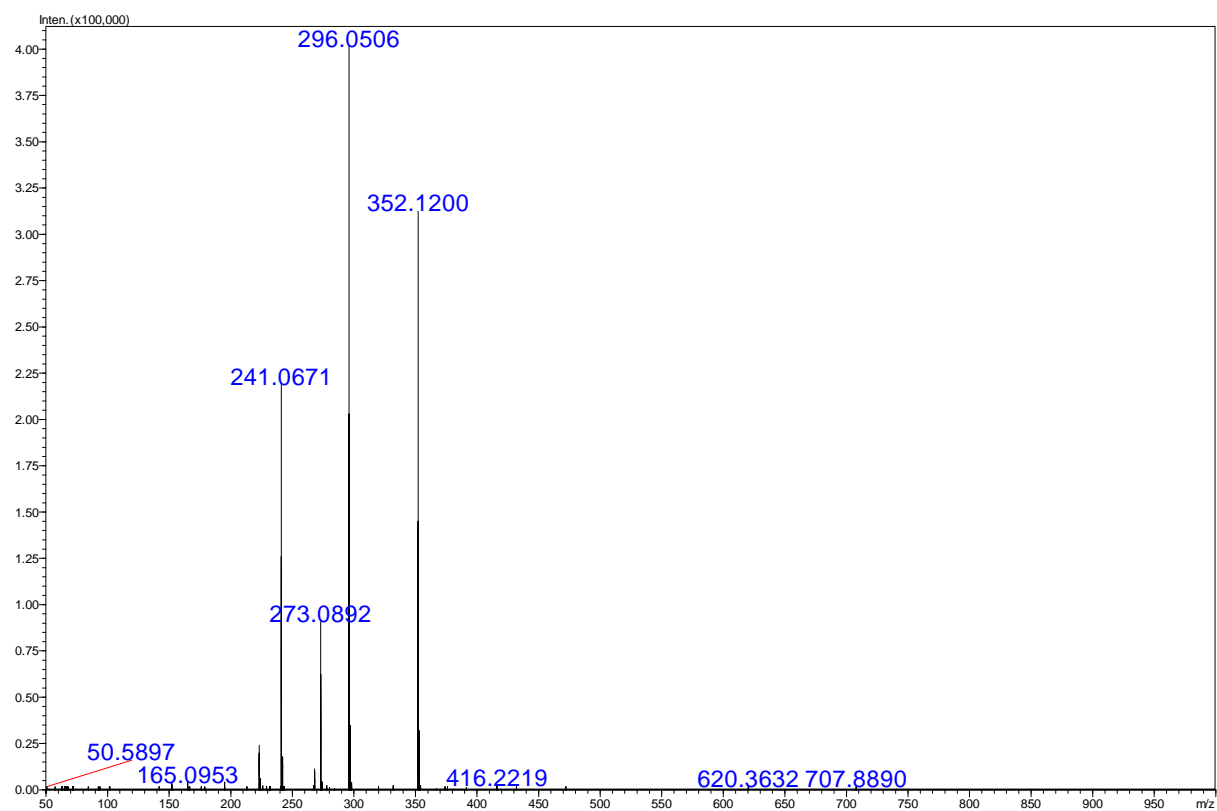


Figura 29. Espectro de massas de alta resolução, da substância **79**.

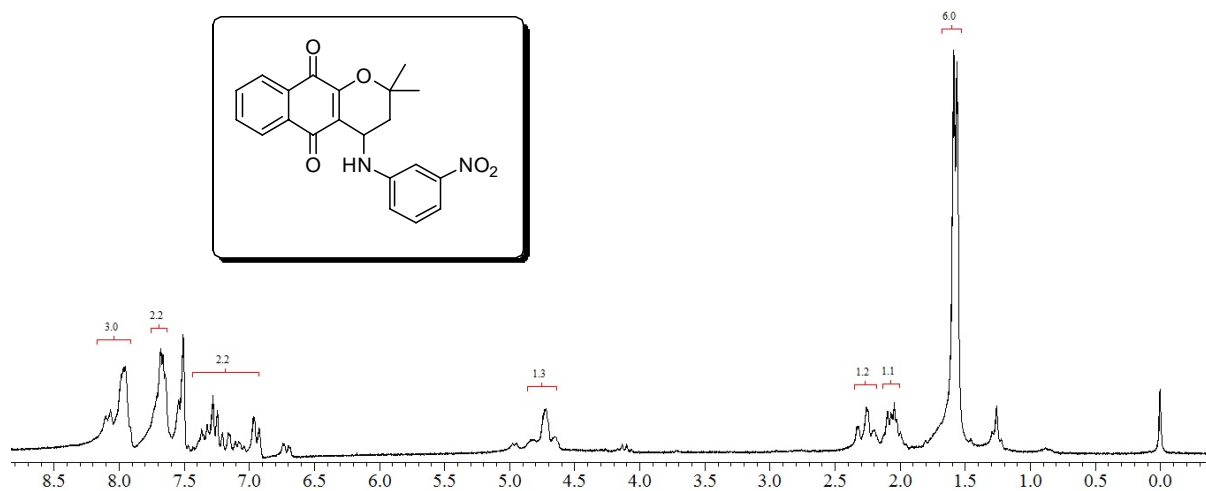


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H , CDCl_3 , (200 MHz), da substância **80**.

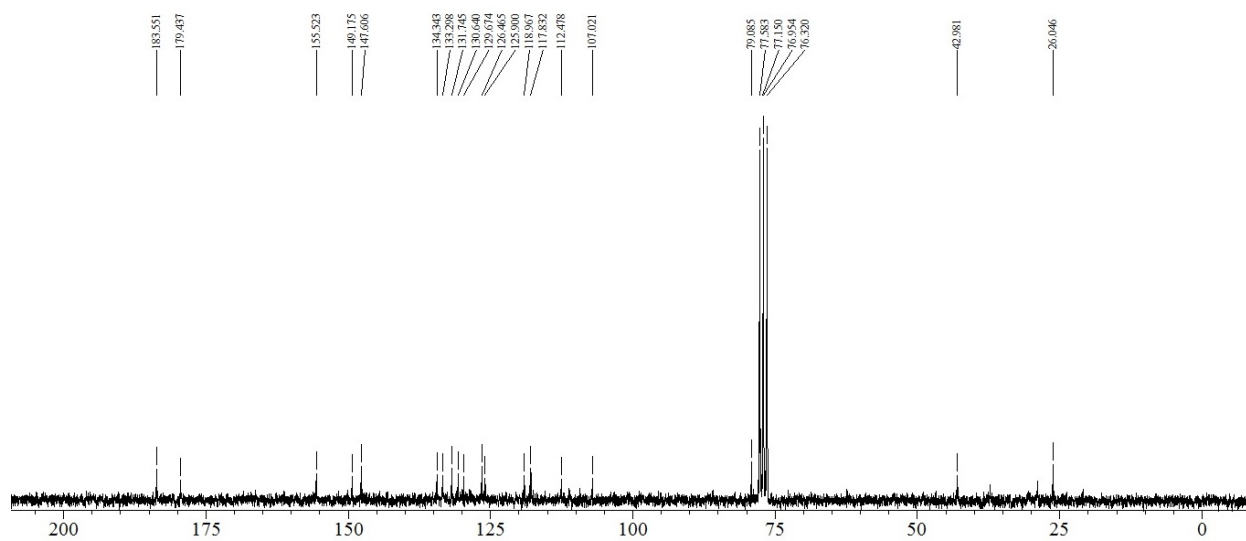


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C , CDCl_3 , (50 MHz), da substância **80**.

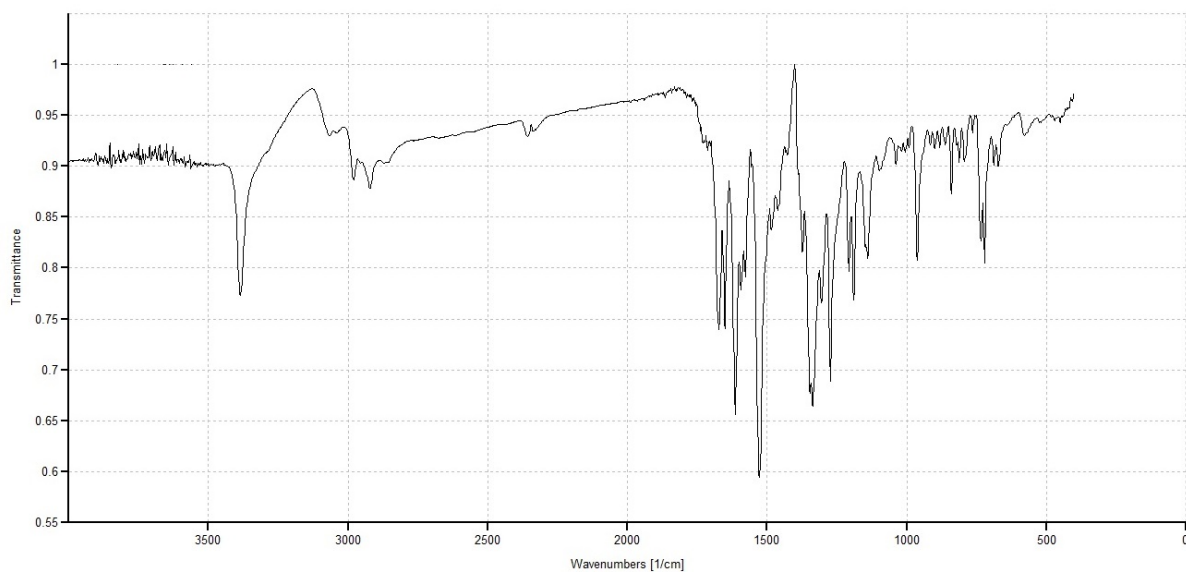


Figura 32. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **80**.

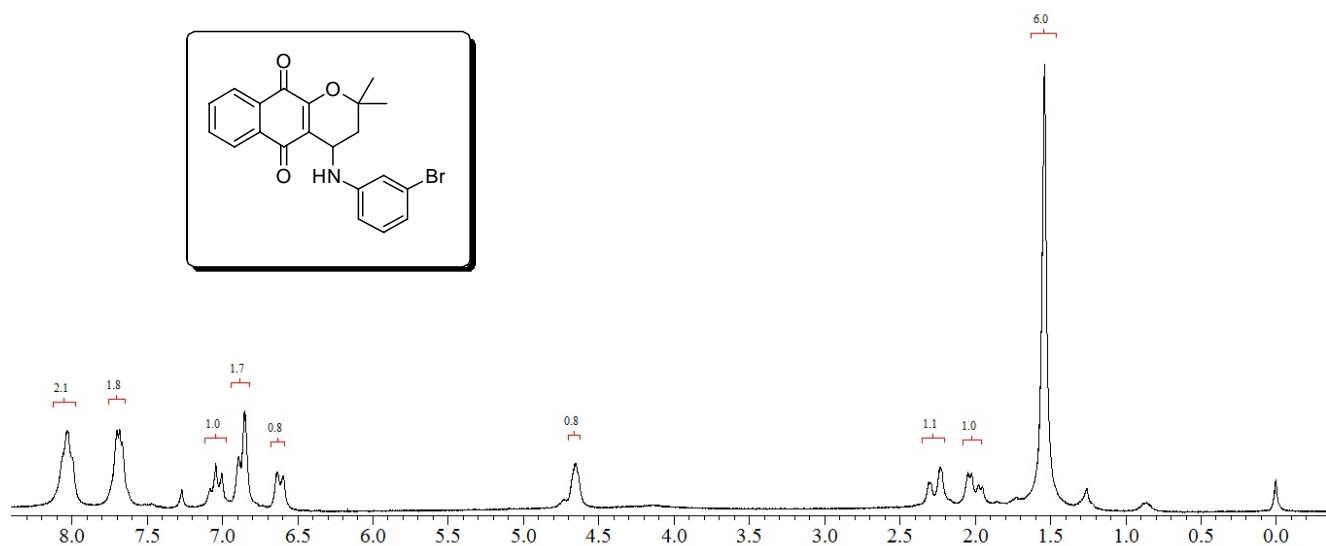


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H , CDCl_3 , (200 MHz), da substância **81**.

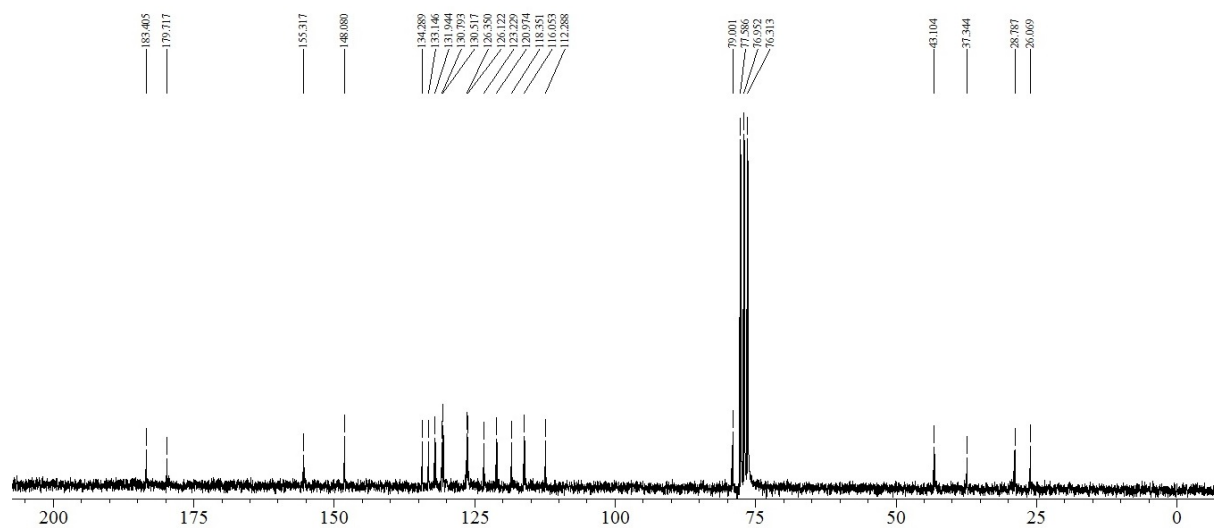


Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C , CDCl_3 , (50 MHz), da substância **81**.

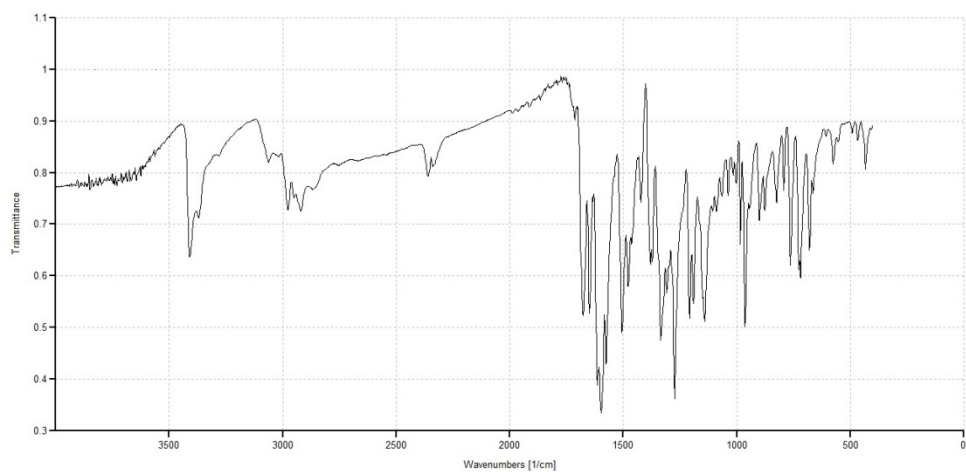


Figura 35. Espectro de infravermelho, pastilha de KBr, da substância **81**.

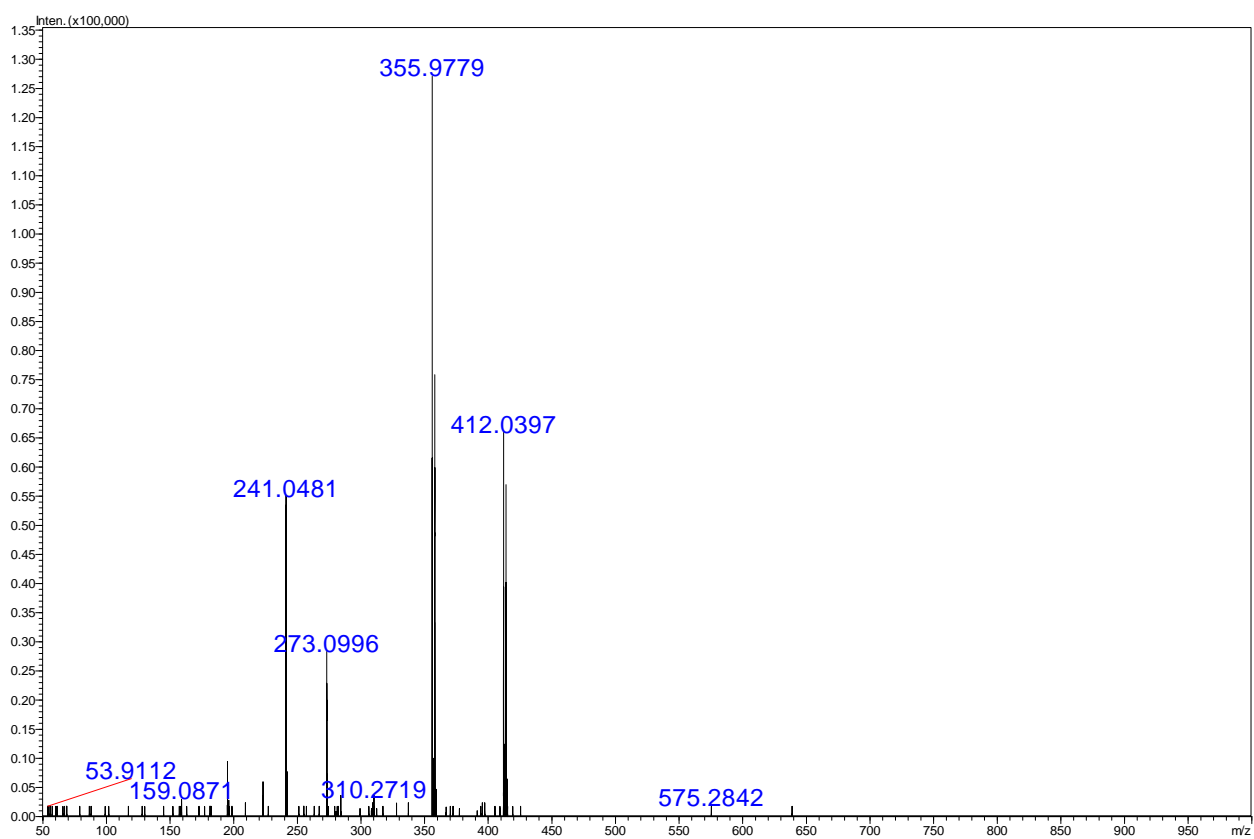


Figura 36. Espectro de massas de alta resolução, da substância **81**.