

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TALITA BÁRBARA GONTIJO**

**SÍNTESE DE NAFTOQUINONAS ACOPLADAS À FLUORÓFOROS  
BODIPYS: ATIVIDADE ANTITUMORAL E ESTUDOS DE  
LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

UFMG/ ICEX/DQ. 1190<sup>a</sup>

D 651<sup>a</sup>

**TALITA BÁRBARA GONTIJO**

**SÍNTESE DE NAFTOQUINONAS ACOPLADAS À FLUORÓFOROS  
BODIPYS: ATIVIDADE ANTITUMORAL E ESTUDOS DE  
LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR**

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**

**2017**

G641s Gontijo, Talita Bárbara  
2017 Síntese de naftoquinonas acopladas à fluoróforos  
D bodipys [manuscrito]: atividade antitumoral e estudos  
de localização subcelular / Talita Bárbara Gontijo.  
2017.

[xiii], 115 f. : il.

Orientadora: Rossimiriam Pereira de Freitas.  
Coorientador: Eufrânio Nunes da Silva Júnior.

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

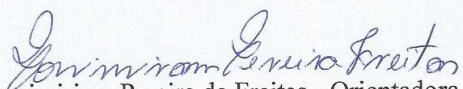
1. Química orgânica - Teses 2. Quinona - Teses 3.  
Luminescência - Teses 4. Agentes antineoplásicos -  
Teses I. Freitas, Rossimiriam Pereira de, Orientadora  
II. Silva Júnior, Eufrânio Nunes da, Coorientador III.  
Título.

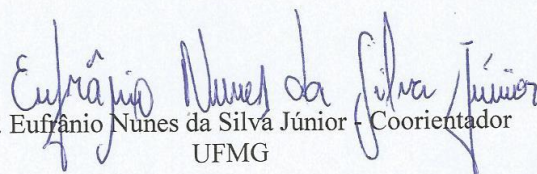
CDU 043

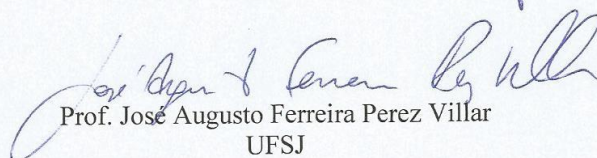
**"Síntese de Naftoquinonas Acopladas à Fluoróforos BODIPYS: Atividade Antitumoral e Estudos de Localização Subcelular."**

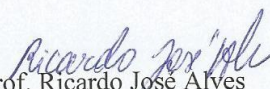
**Talita Bárbara Gontijo**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Profa. Rossimiriam Pereira de Freitas - Orientadora  
UFMG

  
Prof. Eufrânio Nunes da Silva Júnior - Coorientador  
UFMG

  
Prof. José Augusto Ferreira Perez Villar  
UFSJ

  
Prof. Ricardo José Alves  
UFMG/FAFAR

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2017.

*“Você tem que ser o espelho da mudança que está propondo. Se eu quero mudar o mundo, tenho que começar por mim.”*

*(Mahatma Gandhi)*



Agradeço a Deus.

Aos meus orientadores, Profa. Rossimiriam e Prof. Eufrânio, pela dedicação, paciência e pela oportunidade de aprender e desenvolver este trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Química, aos professores que contribuíram para minha formação ao longo desses dois anos.

Aos amigos e colegas de laboratório, pelo companheirismo e por alegrarem meus dias de trabalho, Samara, Wagner, Wallace, Lucas, Ana Carolina, Phillipe, Fernanda, Rafael, Gabriel, Matheus e Guilherme.

Em especial ao Eduardo e Gleiston, pela ajuda na realização de alguns experimentos, pela disponibilidade sempre que precisei e discussões sempre produtivas sobre a química e a vida.

Aos colaboradores, pela realização de experimentos essenciais para construção desse trabalho, Prof. Flavio Emery, o aluno de doutorado Lucas Resende, Prof. José Correia, Prof. Bruno Cavalcanti, Profa. Claudia Pessoa e Profa. Marília Goulart.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de dificuldades e felicidades, Diego, Fabíola, Fabiane e Roberta. À Fran, Nathy e a Renatinha pela amizade, desabafos e conversas produtivas.

À minha família, essenciais na minha vida, sem eles não estaria aqui hoje. Ao meu marido André pelo amor, carinho, compreensão e principalmente paciência, sem sua ajuda essa caminhada seria mais difícil. Aos meus Pais, obrigada por tudo, por sempre acreditarem no meu potencial mesmo quando não acreditei, por não deixarem eu desistir no início e compreenderem minha ausência em momentos especiais.

À banca examinadora por aceitarem o convite.

Aos órgãos financiadores CNPQ, FAPEMIG e CAPES pela bolsa concedida e financiamento da pesquisa.



UFMG

## RESUMO

Atualmente a grande maioria dos agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer não são tão seletivos, ocasionando diversos efeitos colaterais aos pacientes. Devido a isso muitas pesquisas científicas estão sendo realizadas para buscas de novas substâncias ativas mais seletivas. Estudos de mecanismo de ação de substâncias ou classes de compostos que apresentam-se como bio-ativas tendem a facilitar o planejamento molecular racional de derivados mais seletivos, sendo que um dos métodos mais frequentemente utilizado nesse tipo de pesquisa são estudos de localização subcelular das substâncias ativas. As naftoquinonas apresentam-se como uma classe promissora no desenvolvimento de agentes quimioterápicos, porém estudos de localização subcelular dessas substâncias não são tão evidentes, uma vez que a obtenção de derivados naftoquinoidais com características luminescentes apresenta-se como um desafio. Neste trabalho descreve-se a síntese e a caracterização de seis novos derivados naftoquinoidais acoplados à fluoróforos do tipo BODIPY, obtidos através de reações de cicloadição do tipo “click”. Testes *in vitro* utilizando diferentes linhagens de células tumorais foram realizados com os compostos **56-60**, e os resultados apontaram que dois desses compostos mostraram-se ativos contra as linhagens de células testadas. Os derivados (**60**) e (**61**) sintetizados apresentaram propriedades luminescentes, e suas propriedades fotofísicas foram estudadas, sendo estes os primeiros derivados naftoquinoidais luminescentes obtidos e reportados na literatura. Estudos de marcação e localização subcelular com linhagens de células tumorais foram realizados para o composto (**60**), mostrando a localização deste composto na mitocôndria.

**Palavras Chaves:** naftoquinonas, BODIPYS, reação “click”, luminescência, localização subcelular.



UFMG

## ABSTRACT

The majority of chemotherapeutic agents in use for the management of cancer are not selective, causing several adverse effects to patients. For this reason, there is a lot of research being conducted currently aiming at the development of new and more selective substances. Studies of mechanism of action of bioactive substances can contribute to the rational molecular design of more selective derivatives, and one of the methods more frequently used to achieve this goal are subcellular localization studies. The naphthoquinones constitute a promising class of chemotherapeutic agents, but subcellular localization studies for these substances are not so feasible because the production of luminescent naphthoquinoidal derivatives is a major challenge nowadays. In this work, we describe the synthesis and total characterization of six new naphthoquinones- based BODIPY. The synthesis was accomplished via a convergent synthetic route, using a classical click chemistry reaction to join the quinone and BODIPY moieties *In vitro* tests using different tumor cell lines were performed with compounds **56-60**, and the results indicated that two of these compounds were active. The photophysical properties of fluorescent derivatives (**60**) and (**61**) were studied by means of absorption and emission spectra, To the best of our knowledge, the present study reports for the first time the synthesis of fluorescent lapachone-based BODIPY. Subcellular localisation studies with tumor cell lines were performed for the compound (**60**), showing that this probe was a specific mitochondria-staining agent.

**Keywords:** naphthoquinones, BODIPYS, “click” reaction, luminescence, subcellular localization.





## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTAS DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTAS DE ESQUEMAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTAS DE TABELA .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Câncer .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Quinonas bioativas.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Luminescência .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Luminescência - estudos de localização subcelular .....	11
1.3.2. Fluoróforos do tipo BODIPY .....	14
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Objetivos Gerais.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Síntese e caracterização das naftoquinonas acopladas à BODIPYs.....</b>	<b>24</b>
3.1.1. Síntese e caracterização dos intermediários naftoquinoidais .....	24
3.1.2. Síntese dos fluoróforos do tipo BODIPY .....	31
3.1.3. Síntese e caracterização dos triazóis naftoquinoidais contendo fluoróforos BODIPYs	41
<b>3.2. Estudos Fotofísicos.....</b>	<b>58</b>
3.2.1. Solvatocromismo.....	58
3.2.2. Rendimento Quântico.....	62
<b>3.3. Atividade Citotóxica .....</b>	<b>65</b>
3.3.1. Ensaio MTT.....	65
3.3.2. Dosagem de tióis intracelulares e peroxidação lipídica – Ensaio TBARS.....	69
<b>3.4. Testes de localização subcelular .....</b>	<b>74</b>



UFMG

<b>4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>77</b>
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>78</b>
<b>5.1. Materiais e equipamentos .....</b>	<b>78</b>
<b>5.2. Síntese das substâncias descritas na literatura .....</b>	<b>79</b>
<b>5.3. Procedimento geral para síntese dos triazóis inéditos 56-61.....</b>	<b>87</b>
<b>5.4. Estudo Fotofísico.....</b>	<b>94</b>
5.4.1. Solvatocromismo.....	94
5.4.2. Rendimento quântico.....	94
<b>5.5. Atividade antitumoral .....</b>	<b>95</b>
5.5.1. Teste MTT .....	95
5.5.2. Análise do conteúdo de glutathiona reduzida.....	96
5.5.3. Teste TBARS .....	97
<b>5.6. Testes de Marcação.....</b>	<b>98</b>
5.6.1. Cultura das células .....	98
5.6.2. Ensaio de fluorescência.....	98
5.6.3. Teste de co-coloração do composto (60) e Mitotracker .....	98
5.6.4. Ensaio de Fotobranqueamento .....	99
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>100</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{M}$	micromolar
$\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	eterato de trifluoreto de boro
BTD	1,2,3-benzotiadiazola
CCD	cromatografia em camada delgada
$\text{CDCl}_3$	clorofórmio deuterado
cm	centímetros
COSY	Espectroscopia de correlação H-H
d	duplete
DCM	díclorometano
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
E1	eliminação unimolecular
EROs	espécies reativas de oxigênio
ESI	espectrometria de massas por eletrospray
GSH	glutationa reduzida
GSSG	glutationa oxidada
HMBC	Correlação heteronuclear de múltiplos quanta
HSQC	Correlação heteronuclear de um único quantum
Hz	Hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento (Hz)
m	multiplete
MDA	malonaldeído
MHz	Megahertz
NAC	<i>N</i> -acetilcisteína
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NCI	Instituto Nacional do Câncer
nm	nanômetros



UFMG

PET	transferência oxidativa fotoinduzida
ppm	parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
S	estado simpleto
s	simpleto
$\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$	substituição nucleofílica aromática
$\text{S}_{\text{N}}2$	substituição nucleofílica bimolecular
T	estado tripleto
t	tripleto
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetraidrofurano
UV-vis	ultravioleta – visível
$\delta$	deslocamento químico
$\epsilon$	absortividade molar
$\epsilon_{\text{abs}}$	absortividade molar de absorção
$\epsilon_{\text{em}}$	absortividade molar de emissão
$\lambda$	comprimento de onda
$\lambda_{\text{maxabs}}$	comprimento de onda máximo de absorção
$\lambda_{\text{maxemi}}$	comprimento de onda máximo de emissão
$\text{CI}_{50}$	concentração inibitória média
$\Phi_{\text{F}}$	rendimento quântico de fluorescência
ta	temperatura ambiente

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classificação das quinonas de acordo com sua estrutura aromática e disposição das carbonilas.....	3
<b>Figura 2:</b> Quinonas naturais empregadas no tratamento de algumas neoplasias .....	5
<b>Figura 3:</b> Estrutura da nor- $\beta$ -lapachona ( <b>14</b> ) e os centros de modificações sintéticas identificados .....	7
<b>Figura 4:</b> Diagrama de Jablonski (Adaptado da Ref. 21).....	10
<b>Figura 5:</b> PAC-1, PAC-1 ( <b>2h</b> ), e a imagem da marcação celular pelo composto PAC-1 ( <b>2h</b> )	12
<b>Figura 6:</b> Composto ( <b>23</b> ) à esquerda. A direita tem-se: por microscopia confocal, da linhagem celular DA3, da doxorubicina ( <b>7</b> ) (Imagens A-D) e do composto ( <b>23</b> ) (Imagens E-F e H). 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 doxorubicina e LysoTracker red para o composto <b>23</b> . 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. (adaptado da Ref. 19).....	13
<b>Figura 7:</b> Núcleo BODIPY numerado de acordo com as regras da IUPAC .....	15
<b>Figura 8:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do <b>BODIPY</b> ( <b>52</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) .....	35
<b>Figura 9:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do <b>BODIPY</b> ( <b>52</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) .....	36
<b>Figura 10:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>53</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	37
<b>Figura 12:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>59</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	44
<b>Figura 13:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>59</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	45
<b>Figura 14:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>57</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	46
<b>Figura 15:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>57</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	47
<b>Figura 16:</b> Espectro de RMN de H do composto ( <b>60</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	49
<b>Figura 17:</b> Mapa de correlação COSY do composto ( <b>60</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz). .....	50
<b>Figura 18:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>60</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	51
<b>Figura 19:</b> (A): Mapa de correlação HSQC do composto ( <b>60</b> ). (B): Expansão do mapa de correlação HSQC do composto ( <b>60</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz). .....	52
<b>Figura 20:</b> Mapa de correlação HMBC do composto ( <b>60</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz). .....	53



UFMG

<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN de H do composto (61) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	54
<b>Figura 22:</b> Mapa de correlação COSY do composto (61) (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz).....	55
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do composto (61) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	56
<b>Figura 24:</b> Mapa de correlação HSQC do composto (61) (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz). ....	57
<b>Figura 25:</b> Mapa de correlação HMBC do composto (61) (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz).....	58
<b>Figura 26:</b> Espectros de absorção e emissão em diferentes solventes do composto (60) .....	59
<b>Figura 27:</b> Espectros de absorção e emissão em diferentes solventes do composto (61) .....	60
<b>Figura 28:</b> Estrutura da fluoresceína .....	63
<b>Figura 29:</b> Relação entre o máximo de absorção versus a área sob espectro de emissão do composto (60), (A), e do padrão fluoresceína, (B).....	64
<b>Figura 30:</b> Relação entre o máximo de absorção versus a área sob espectro de emissão do composto (61), (A), e do padrão fluoresceína, (B).....	64
<b>Figura 31:</b> Concentração de MDA nas células tratadas, por 24h, com o composto (59) na presença e ausência de NAC. ....	70
<b>Figura 32: 3A :</b> Células MDA-MB231 incubadas com o composto (60). As imagens A e B, D e E mostram células vivas e fixadas respectivamente. As imagens C e F mostram aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase. <b>3B:</b> Células T47-D incubadas com o composto (60). As imagem A e B, D e E mostram células vivas e fixadas respectivamente. As imagens C e F mostram aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase. <b>3C:</b> Células PANC-1 incubadas com o composto (60). As imagem A e B, D e E mostram células vivas e fixadas respectivamente. As imagens C e F mostram aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase. (barra de escala 25 µm). ....	74
<b>Figura 33: 3A:</b> Células MCF-7 incubadas com o composto (60). As imagem A e B, D e E mostram células vivas e fixadas respectivamente. As imagens C e F mostram aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase. <b>3B:</b> Células MCF-7 incubadas com (60) e Mitotracker <sup>TM</sup> . As imagens A e B mostram o padrão de fluorescência das células incubadas com (60) e Mitotracker <sup>TM</sup> , respectivamente. As imagens B e D mostram aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase.(barra de escala 25 µm).....	75
<b>Figura 34:</b> Ensaio de fotobranqueamento.....	76
<b>Figura 35:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto (44) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	101



UFMG

<b>Figura 36:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>44</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	101
<b>Figura 37:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>44</b> ) .....	102
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>47</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	102
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>47</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	103
<b>Figura 40:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>47</b> ) .....	103
<b>Figura 41:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>46</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	104
<b>Figura 42:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>46</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	104
<b>Figura 43:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>46</b> ).....	105
<b>Figura 44:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>49</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	105
<b>Figura 45:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>49</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	106
<b>Figura 46:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>49</b> ) .....	106
<b>Figura 47:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>56</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	107
<b>Figura 48:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>56</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	107
<b>Figura 49:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>56</b> ) .....	108
<b>Figura 50:</b> Espectro de Massas do composto ( <b>56</b> ) (ESI+).....	108
<b>Figura 51:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>58</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	109
<b>Figura 52:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>58</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	109
<b>Figura 53:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>58</b> ) .....	110
<b>Figura 54:</b> Espectro de Massas do composto ( <b>58</b> ) (ESI+).....	110
<b>Figura 55:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>59</b> ) .....	111
<b>Figura 56:</b> Espectro de Massas do composto ( <b>59</b> ) (ESI+).....	111
<b>Figura 57:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>60</b> ) .....	112
<b>Figura 58:</b> Espectro de Massas do composto ( <b>60</b> ) (ESI+ .....	112
<b>Figura 59:</b> Espectro no Infravermelho (IV) do composto ( <b>61</b> ) .....	113
<b>Figura 60:</b> Espectro de Massas do composto ( <b>61</b> ) (ESI+).....	113
<b>Figura 61:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>54</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	114
<b>Figura 62:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>54</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	114
<b>Figura 63:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto ( <b>55</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	115
<b>Figura 64:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>55</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	115



## LISTAS DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Ciclo redox induzido por quinonas, gerando EROS (adaptado da Ref .4).....	4
<b>Esquema 2:</b> Lapachol (9) e alguns de seus derivados sintéticos .....	6
<b>Esquema 3:</b> Obtenção de derivados do nor-lapachol (13), nor-β-lapachona (14) e nor-α-lapachona (15) .....	7
<b>Esquema 4:</b> Estratégia de hibridização usada para obtenção dos derivados triazólicos da nor-β-lapachona (14) (adaptado da Ref. 14) .....	8
<b>Esquema 5:</b> Obtenção dos derivados das nor-β-lapachona (14) contendo aril-aminas (Adaptado da Ref. 11) .....	8
<b>Esquema 6:</b> Obtenção de naftoquinonas acopladas à diferentes fluoróforos .....	14
<b>Esquema 7:</b> Obtenção dos primeiros derivados do tipo BODIPY por Treibs e Kreuzer (Adaptada da Ref. 27).....	15
<b>Esquema 8:</b> Rotas sintéticas para obtenção de BODIPYs- meso substituídos, a partir do pirrol <sup>2930</sup> .....	16
<b>Esquema 9:</b> Rota Sintética para obtenção de BODIPYs assimétricos. <sup>31</sup> .....	17
<b>Esquema 10:</b> Modificações na estrutura do BODIPY (32), através de reações de substituição eletrofílica, e propriedades fotofísicas dos derivados BODIPYs .....	18
<b>Esquema 11:</b> Modificações estruturais no BODIPY (36) para obtenção de sondas fluorescentes que emitem na região do vermelho <sup>33</sup> .....	18
<b>Esquema 12:</b> Reações de substituição nucleofílica aromática a partir do 3,5-dicloro-BODIPY (37) (Adaptado da ref. 34) .....	19
<b>Esquema 13:</b> Reação de condensação do 1,3,5,7-tretametil-BODIPY (40) com aldeídos aromáticos, gerando fluoróforos com sistema π estendido. <sup>30, 36,</sup> .....	20
<b>Esquema 14:</b> Proposta sintética para obtenção de azidas derivadas da <i>orto</i> -naftoquinonas e <i>para</i> -naftoquinonas.....	21
<b>Esquema 15:</b> Proposta Sintética para obtenção do BODIPY (53) .....	22
<b>Esquema 16:</b> Proposta sintética para obtenção dos derivados para-naftoquinoidais acoplados à BODIPYs 56-58.....	22
<b>Esquema 17:</b> Proposta sintética para obtenção dos derivados orto-naftoquinoidais acoplados à BODIPYs 59-61.....	23
<b>Esquema 18:</b> Obtenção do lapachol (9) a partir do cerne do Ipê roxo. ....	24





**UFMG**

<b>Esquema 19:</b> Rota sintética para obtenção da 4-azido- $\alpha$ -lapachona (44) .....	25
<b>Esquema 20:</b> Mecanismo para formação da 4-azido- $\alpha$ -lapachona (44) .....	26
<b>Esquema 21:</b> Síntese do nor-lapachol (13) .....	27
<b>Esquema 22:</b> Proposta mecanística para obtenção do nor-Lapachol (13) .....	27
<b>Esquema 23:</b> Rota sintética para obtenção da 3-azido- $\alpha$ -lapachona (47) .....	28
<b>Esquema 24:</b> Síntese da 3-azido- $\beta$ -lapachona (46) .....	28
<b>Esquema 25:</b> Proposta mecanística para obtenção da 3-azido-nor- $\beta$ -lapachona (46) .....	29
<b>Esquema 26:</b> Rota sintética para obtenção da azida (49) .....	30
<b>Esquema 27:</b> Proposta mecanística para obtenção da azida (49) .....	31
<b>Esquema 28:</b> Impedimento estérico dos grupos volumosos impedindo rotação livre da porção fenila nos BODIPYS (55) e (53) .....	32
<b>Esquema 29:</b> Rota sintética para obtenção do BODIPY (52) .....	33
<b>Esquema 30:</b> Proposta mecanística para obtenção do dipirrometano .....	34
<b>Esquema 31:</b> Síntese do BODIPY (53) .....	36
<b>Esquema 32:</b> Síntese de dipirromentanos (78) e (79) .....	38
<b>Esquema 33:</b> Síntese do BODIPY (54) .....	39
<b>Esquema 34:</b> Proposta mecanística para síntese do BODIPY alcino (54) .....	40
<b>Esquema 35:</b> Rota sintética para obtenção do BODIPY (55) .....	40
<b>Esquema 36:</b> Mecanismo da cicloadição catalisada por Cu (I) proposto por Sharpless em 2002 <sup>48</sup> .....	42
<b>Esquema 37:</b> Mecanismo da reação “click” mostrando o ciclo lento ( <i>via</i> acetileno de cobre) e o rápido (com intermediário dinuclear) (Adaptado da referência 50) .....	42
<b>Esquema 38:</b> Obtenção dos triazóis não luminescentes 56-59 a partir do BODIPY (54) .....	43
<b>Esquema 39:</b> Síntese dos triazóis luminescentes (60) e (61). i) CuI/CH <sub>3</sub> CN .....	48
<b>Esquema 40:</b> Compostos avaliados frente à linhagens de células tumorais e células normais .....	66
<b>Esquema 41:</b> Reação do teste de TBARS entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído (MDA), formando o composto colorido (Adaptado da referência 62) .....	69



## **LISTAS DE TABELA**

<b>Tabela 1:</b> Dados do solvatocromismo: máximos de absorção e emissão e deslocamento de Stokes, para os compostos <b>(60)</b> e <b>(61)</b> .....	61
<b>Tabela 2:</b> Coeficientes de absorção e emissão molar dos compostos <b>(60)</b> e <b>(61)</b> em diferentes solventes .....	62
<b>Tabela 3:</b> Resultados dos testes de citotoxicidade dos compostos <b>56-59</b> , depois de 24h de exposição celular na presença e ausência de glutathiona reduzida. ....	67
<b>Tabela 4:</b> Atividade citotóxica do composto <b>(60)</b> , expressa em $CI_{50} \mu M/72h$ ( $CI 95\%$ ) .....	68
<b>Tabela 5:</b> Dosagem de tióis nas células tratadas com o composto <b>(59)</b> , na presença e ausência de NAC.....	72
<b>Tabela 6:</b> Efeito do composto <b>(60)</b> sobre a glutathiona reduzida (GSH) e na peroxidação lipídica, após 24h de exposição .....	73



UFMG

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células alteradas.<sup>1</sup> Estas células, comumente chamadas de células cancerosas, são diferentes em alguns aspectos das células normais. Além do crescimento desordenado e rápido, células cancerosas são menos específicas em suas funções do que as suas correspondentes normais. Conforme a multiplicação ocorre, as células normais vão sendo substituídas pelas células cancerosas e, conseqüentemente, os tecidos invadidos perdem sua função, podendo levar à falência dos órgãos afetados.<sup>2</sup>

As causas desta doença estão relacionadas com fatores externos e internos ao organismo, estando ambas inter-relacionadas.<sup>1</sup> Fatores externos relacionam-se ao meio ambiente em geral que o indivíduo vive, hábitos social e cultural, sendo responsáveis por cerca de 80 a 90% dos casos de câncer. As causas internas estão relacionadas em grande parte com a predeterminação genética, que se correlacionam com a capacidade do organismo em se defender de agressões externas.<sup>1,2</sup>

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. A estimativa mundial, realizada pelo projeto Globocan/Iarc em 2012, mostrou que dos 14 milhões dos novos casos de câncer, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para o biênio 2016-2017, estima-se a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil.<sup>3</sup>

O tratamento do câncer consiste na eliminação das células cancerosas, bem como dos tumores formados a partir delas, através de cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. A cirurgia juntamente com a radioterapia pode ser um método eficaz no tratamento da doença em casos em que não ocorreu metástase. A radioterapia, utilizada isoladamente, tem capacidade de diminuir tumores grandes bem como reduzir a chance de metástase, sendo um tratamento antineoplásico muito empregado, porém apresenta limitações principalmente

---

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. O que é câncer? <http://www1.inca.gov.br/> Acesso em: 27/09/2016.

<sup>2</sup> de Oliveira, R.; Alves, R. J.; Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Quim. Nova*, **2002**, 25, 976-984.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estatísticas do Câncer [www.inca.gov.br/estimativa/2016](http://www.inca.gov.br/estimativa/2016). Acesso em 27/09/2016.

devido aos efeitos colaterais. Aproximadamente um terço dos pacientes são curados utilizando medidas antineoplásicas locais (cirurgia e/ou radioterapia), todavia em casos em que ocorreu a metástase é necessário o uso de quimioterapia.<sup>4</sup>

A quimioterapia consiste na utilização de fármacos, com o objetivo de destruir as células cancerosas, deixando intactas as normais. Atualmente os agentes antineoplásicos utilizados no tratamento quimioterápico são classificados pelo tipo de mecanismo de ação citotóxicos (agentes alquilantes e antimetabólitos), origem (produtos naturais), ação fisiológica (hormônios) e outros agentes.<sup>5</sup> Sabe-se que grande parte dessas substâncias antineoplásicas agem sobre o DNA da célula, bem como no processo de divisão celular,<sup>4</sup> desencadeando a apoptose celular, mecanismo de morte programada da célula. No entanto, a grande maioria dos fármacos utilizados não são seletivos o suficiente, ocasionando lesões tanto nas células malignas como nas normais, acarretando diversos efeitos colaterais, tornando o tratamento doloroso e invasivo.

Visto que o câncer atualmente é considerado um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento, e que a maioria dos casos desta doença é tratada com agentes quimioterápicos de baixa seletividade, pesquisas tem sido realizadas objetivando a descoberta de fármacos mais seletivos e que apresentem efeitos colaterais menos agressivos ao paciente.<sup>6</sup>

## 1.2. Quinonas bioativas

Quinonas naturais e sintéticas representam um grupo de substâncias carbonílicas cíclicas com apreciável potencial biológico e, conseqüentemente, nos últimos anos vem atraindo a atenção da comunidade científica, principalmente na busca de novos compostos bioativos.

As quinonas podem ser classificadas baseando-se em seu esqueleto carbônico, levando em consideração o tipo de sistema aromático presente em sua estrutura. Outro aspecto que deve ser considerado na classificação desses compostos é a posição relativas das carbonilas,

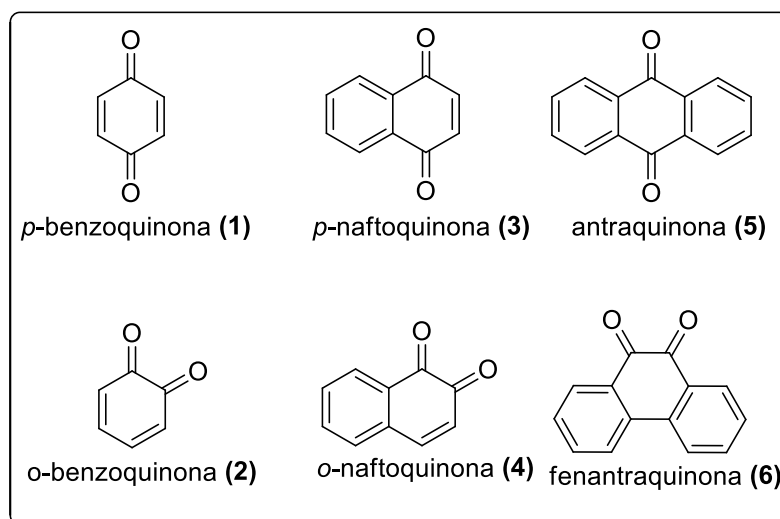
---

<sup>4</sup> Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopez, M.T.P.; Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nov.* **2005**, 28, 118-129.

<sup>5</sup> ANVISA. Fármacos utilizados em neoplasia. [http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro\\_eletronico/neoplasia.html](http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/neoplasia.html) Acesso em 29/09/216

<sup>6</sup> Maia, A.F., Siqueira, R.P., Oliveira, F.M.d., Ferreira, J.G., Silva, S.F.d., Caiuby, C.A.D., Oliveira, L.L.d., Paula, S.O.d., Souza, R.A.C., Guilardi, S., Bressan, G.C., Teixeira, R.R., Synthesis, Molecular Properties Prediction and Cytotoxic Screening of 3-(2-aryl-2-oxoethyl) Isobenzofuran-1(3H)-ones, *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 2810-2816.

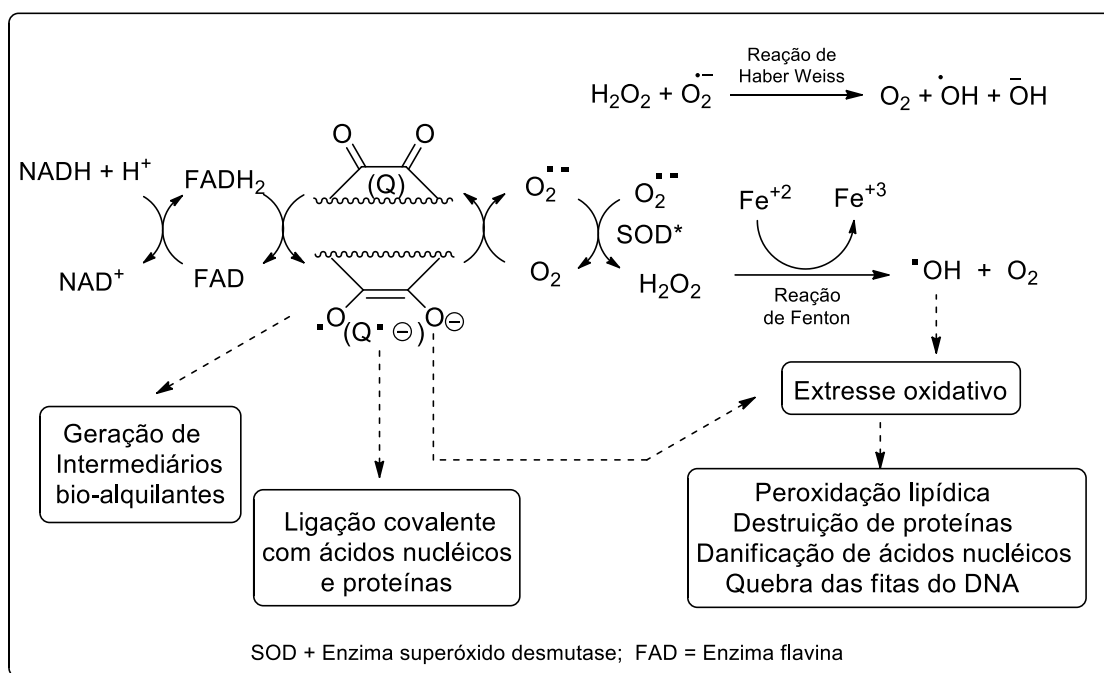
ocorrendo isômeros 1,2 ou *orto*-quinônicos e 1,4 ou *para*-quinônicos.<sup>7</sup> Na Figura 1 estão representadas estruturas de diferentes quinonas e suas classificações de acordo os aspectos descritos acima.



**Figura 1:** Classificação das quinonas de acordo com sua estrutura aromática e disposição das carbonilas

O potencial biológico das quinonas vem despertando interesse no meio científico devido, principalmente, às suas propriedades de bio-oxidação/redução, que as torna capazes de participar de processos de transferências de elétrons, e pela capacidade de induzir estresse oxidativo nas células, gerando espécies reativas de oxigênio (EROS) (Esquema 1).<sup>7</sup> Deve-se destacar também a capacidade de compostos quinônicos em agir como inibidores do complexo das topoisomerases, via intercalação no DNA da célula, ação que desencadeia a apoptose celular.<sup>7</sup>

<sup>7</sup> Da Silva, M.N.; Ferreira, V.F.; Souza, M.C.B.V.; Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. *Quim. Nov.* **2003**, 3, 407-416.



**Esquema 1:** Ciclo redox induzido por quinonas, gerando EROS (adaptado da Ref .4)

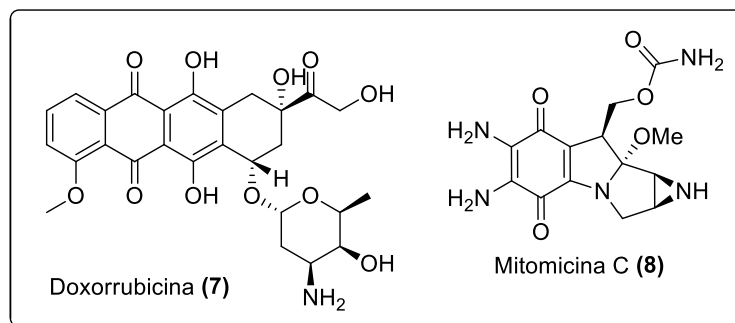
No Esquema 1 está exemplificado o ciclo redox induzido por quinonas no meio celular. Inicialmente o substrato quinonoídico (Q) é reduzido com um elétron, formando o ânion semiquinona ( $Q^{\cdot-}$ ), reação esta catalisada pelas enzimas NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxireductase. Posteriormente, a espécie reduzida, semiquinona, age como um redutor, ocasionando a redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) ao ânion-radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que, na presença da enzima superóxido desmutase (SOD), se transforma em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . O ânion superóxido também reage com outras espécies dentro da célula, na presença de metais de transição, como o Fe, através de uma catálise, ou por reação com o  $H_2O_2$ , gerando espécies de radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ) são as principais espécies responsáveis pelo estresse oxidativo celular.<sup>7</sup>

Estresse oxidativo é o termo usado para denominar situações em que o meio celular encontra-se com aumento apreciável nas concentrações de espécies pró-oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (EROS,  $O_2^{\cdot-}$ , ânion superóxido;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio;  $HO^{\cdot}$ , radical hidroxila), espécies reativas de nitrogênio (ERN,  $NO^{\cdot}$  e o peróxido de nitrito  $ONOO^-$ ) e íons metálicos livres (íons cobre), em detrimento de espécies antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, flavonóides e a glutaciona peroxidase (GPx); ocasionando um

desbalanço redox, o que pode levar à apoptose celular.<sup>7,8</sup> Este desequilíbrio nas concentrações de espécies pró-oxidantes e antioxidantes pode ocasionar diversas doenças inflamatórias, neurodegenerativas, artrites, e alguns tipos de câncer.<sup>9</sup>

Células cancerosas apresentam-se naturalmente em estado de estresse oxidativo, e quando comparadas a células saudáveis seus níveis de EROs são consideravelmente maiores e próximos do limite redox crítico em que a apoptose é induzida.<sup>10</sup> Diante desta informação, muitos estudos veem sendo realizados na busca de novos fármacos que apresentem características de geradores de EROS no meio celular, que proporcione o aumento do nível de EROs nas células cancerosas, induzindo a apoptose celular de forma bastante seletiva, não atingindo as células normais.<sup>10</sup> Devido também a tais características, as quinonas apresentam-se como uma classe promissora para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-tumoral.<sup>7</sup>

Entre as quinonas de origem natural, destacam-se a doxorubicina (**7**), um fármaco empregado atualmente no tratamento de algumas neoplasias, e a mitomicina C (**8**) um antibiótico antitumoral utilizado na quimioterapia de tumores sólidos (Figura 2).<sup>7</sup>



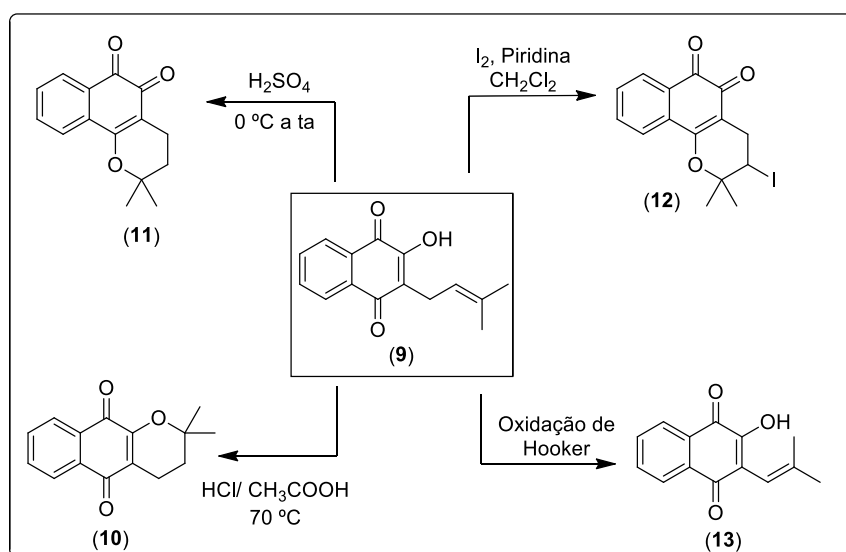
**Figura 2:** Quinonas naturais empregadas no tratamento de algumas neoplasias

Outra quinona de origem natural que merece destaque é o lapachol (**9**) (Esquema 2), uma naftoquinona constituinte de plantas das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae e Prostaceae; sendo largamente encontrada na família Bignoniaceae, no gênero *Tabebuia*.<sup>7</sup> O

<sup>8</sup> Sies, H.; Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **1991**, *91*, 31S-38S  
<sup>9</sup> Da Silva Júnior, E. N.; de Deus, C. F.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; de 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- $\beta$ -lapachone Derivatives: Synthesis and Cytotoxicity against Cancer Cell Lines. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 504-508.

<sup>10</sup> Jamier, V.; Ba, L. A.; Jacob, C.; Selenium- and tellurium-containing multifunctional redox agents as biochemical redox modulators with selective cytotoxicity. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10920-10928.

lapachol (**9**) se destaca entre as quinonas por apresentar diversas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e antineoplásica,<sup>11</sup> bem como por possuir uma versatilidade estrutural, o que possibilita modificações em sua estrutura a fim de obter diferentes derivados com potencial atividade biológica (Esquema 2).<sup>12,13</sup> Como por exemplo, a partir do lapachol (**9**), é possível através de reações de ciclização em meio ácido obter os derivados  $\beta$ -lapachona (**11**) e a  $\alpha$ -lapachona (**10**).



**Esquema 2:** Lapachol (**9**) e alguns de seus derivados sintéticos

Dentre os diversos derivados do lapachol (**9**), o *nor*-lapachol (**13**) apresenta-se como um importante precursor de naftoquinonas bioativas. A partir do *nor*-lapachol (**13**) é possível obter a *nor*- $\beta$ -lapachona (**14**) ou a *nor*- $\alpha$ -lapachona (**15**), através de reações de ciclização em meio ácido (Esquema 3). Kongkathig e colaboradores avaliaram a atividade citotóxica das naftoquinonas (**14**) e (**15**) frente a algumas linhagens de células tumorais, e os resultados mostraram que a naftoquinona (**14**) apresentou uma moderada atividade antitumoral, com

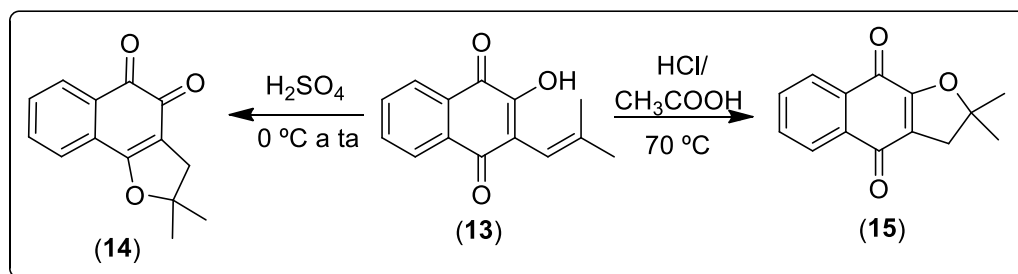
<sup>11</sup> Araújo, E. L., Alencar, J. R. B., Rolim N., P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. *Ver. Bras. de Farm.* **2002**,12, 57-59.

<sup>12</sup> Guimarães, T. T. *et.al.* Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant Leishmania parasites: Synthesis of novel alpha- and nor-alpha-lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Eur J. Med. Chem.* **2013**, 63, 523-530.

<sup>13</sup> Jardim, G. A. M; Guimarães, T. T.; Pinto, M. C. F. R.; Cavalcanti, B. C.; Farias, K. M.; Pessoa, C.; Gatto, C. C.; Nair, D. K., Namboothiri, I. N. N.; Da Siva Júnior, E. N. Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potente activity against cancer cell lines. *Med.Chem. Commun.* **2015**, 5, 120-130.

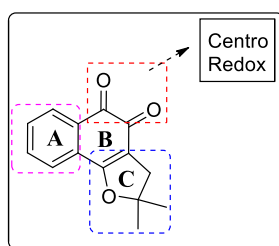


valores de  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento das células tumorais) entre 2,24-2,48  $\mu\text{M}$ , sendo que a naftoquinona (**15**) mostrou-se inativa.<sup>14</sup>



**Esquema 3:** Obtenção de derivados do *nor*-lapachol (**13**), *nor*-β-lapachona (**14**) e *nor*-α-lapachona (**15**)

Os compostos (**14**) e (**15**) apresentam-se como precursores versáteis na obtenção de diferentes derivados, via modificações estruturais no anel A, no centro redox (anel B) e/ou no anel C (Figura 3). Relatos na literatura mostraram que modificações realizadas no anel C desses compostos apresentou-se como uma eficiente estratégia para obtenção de novas substâncias bioativas.<sup>9, 12</sup>

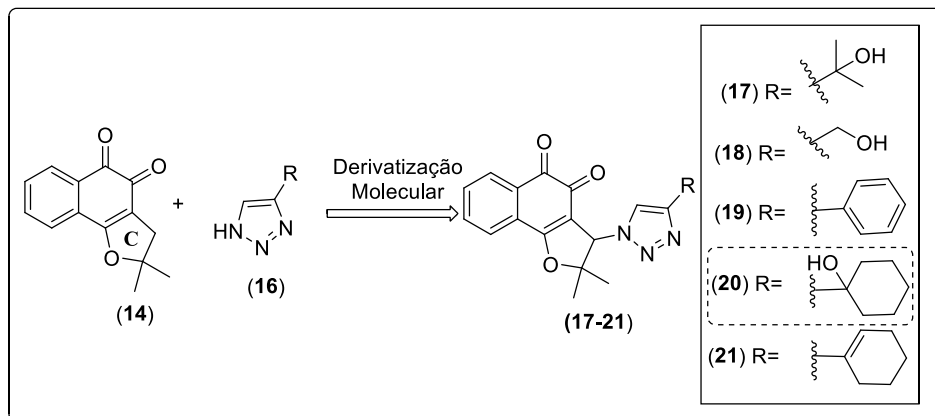


**Figura 3:** Estrutura da *nor*-β-lapachona (**14**) e os centros de modificações sintéticas identificados

Da Silva Júnior e colaboradores, por exemplo reportaram a síntese e avaliação citotóxica de cinco derivados 1,2,3-triazólicos da *nor*-β-lapachona (**14**) (Esquema 4). Os compostos foram avaliados *in vitro* frente a seis linhagens de células tumorais: SF-295 (sistema nervoso central), HCT-8 (cólon), MDAMB-435 (melanona), HL-60 (leucemia), PC-3 (próstata) e B-16 (melanoma murino). Os resultados mostraram que os cinco triazóis foram ativos frente a pelo menos um tipo de linhagem celular tumoral testada, e que alguns mostraram-se mais citotóxicos para determinados tipos de células do que a própria *nor*-β-lapachona (**14**). O composto (**20**) mostrou-se também altamente citotóxico para células

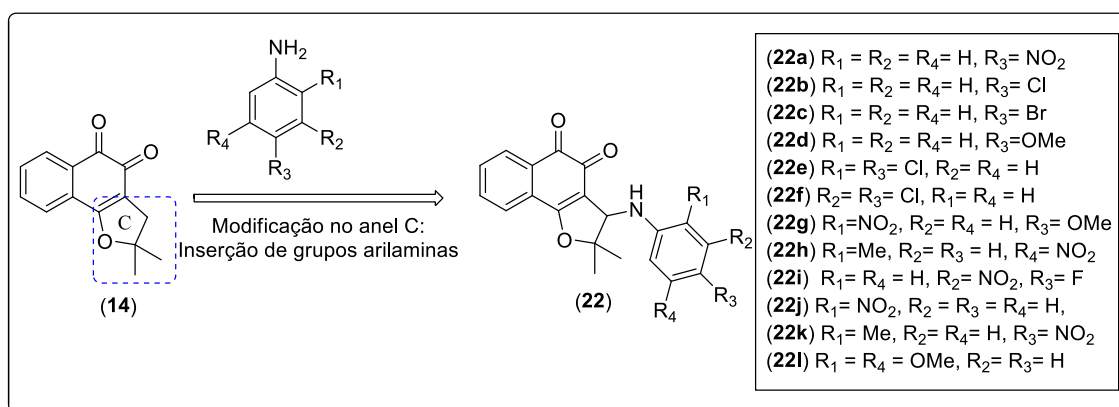
<sup>14</sup> Kongkathip, N.; Kongkathip, B.; Siripong, P.; Sangma, C.; Luangkamin, S.; Niyomdech,.; Pattanapa, S.; Piyaviriyagul, S.; Kongsaree, P.; Potent Antitumor Activity of Synthetic 1,2-Naphthoquinones and 1,4-Naphthoquinones; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3179.

tumorais do tipo MDAMB-435, apresentando valor de  $CI_{50}$  ( $0,43 \mu M$ ) menor do que o encontrado para o controle positivo (doxorubicina).<sup>15</sup>



**Esquema 4:** Estratégia de hibridização usada para obtenção dos derivados triazólicos da *nor*- $\beta$ -lapachona (**14**) (adaptado da Ref. 15)

Posteriormente o mesmo grupo de pesquisa reportou o estudo de citotoxicidade com outros derivados da *nor*- $\beta$ -lapachona (**14**) contendo diferentes arilaminas. Estes compostos foram testados *in vitro* contra diversas linhagens de células tumorais. Os resultados obtidos neste estudo de forma geral foram promissores, sendo que os compostos foram altamente ativos, apresentando  $CI_{50} < 2 \mu M$ .<sup>9</sup>



**Esquema 5:** Obtenção dos derivados das *nor*- $\beta$ -lapachona (**14**) contendo aril-aminas (Adaptado da Ref. 9)

<sup>15</sup> 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*- $\beta$ -lapachone-based 1, 2, 3-triazoles. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20.4*, 635-643.



Tendo em vista os resultados promissores de atividade antitumoral de derivados naftoquinoidais, estudos foram realizados com o propósito de obter informações que contribuíssem para o esclarecimento do mecanismo de ação desta classe de compostos.<sup>16,17</sup> Estes estudos mostraram que os derivados naftoquinoidais são responsáveis pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular, bem como agem no DNA da célula prejudicando a atividade de reparação do mesmo, fatores que acarretam apoptose celular.

Com o conhecimento do mecanismo de ação de determinados fármacos ou classes de substâncias, o planejamento molecular racional para obtenção de novos fármacos pode se tornar um trabalho com menor complexidade e mais rápido, contribuindo assim na busca de novos agentes quimioterápicos mais seletivos, que causem menos efeitos colaterais. Nos últimos anos, estudos de localização subcelular usando substâncias ativas luminescentes vem ganhando destaque na comunidade científica, com o objetivo de se obter informações que colaborem no estudo de mecanismo de ação farmacológica das mesmas.<sup>18,19</sup> Este tipo de estudo tende a facilitar a compreensão de como e onde uma substância bioativa está agindo no interior da célula, o que pode no futuro contribuir para o planejamento de novos fármacos mais seletivos.

---

<sup>16</sup> 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-phenylamino nor- $\beta$ -lapachone against HL-60: A redox-dependent mechanism. *Toxicol. in Vitro.* **2012**, *26*, 585-594

<sup>17</sup> Cavalcanti, B. C.; Cabral, I. O.; Rodrigues, F. A. R.; Barros, F. W.; 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.; de 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.* **2013**, *24.1*, 145-163.

<sup>18</sup> 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.

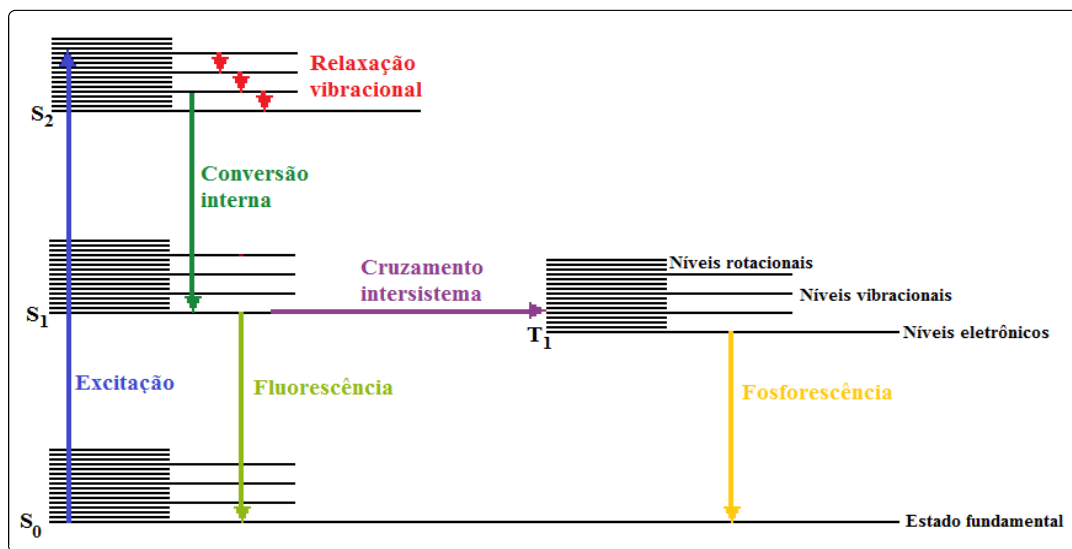
<sup>19</sup> Shaul, P.; Frenkel, M.; Goldstein, E. B.; Mittelman, L.; Grunwald, A.; Ebenstein, Y.; Tsarfaty, I.; Fridman, M. The Structure of anthracycline derivatives determines their subcellular localization and cytotoxic activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 323-328.

### 1.3. Luminescência

Luminescência é o processo de emissão de luz por algum composto, a partir da absorção de energia.<sup>20</sup> Neste processo as moléculas excitadas retornam ao seu estado fundamental, liberando energia na forma de luz.

Quando um composto absorve energia e é excitado, e sequencialmente retorna ao seu estado fundamental, ocorre liberação de energia por diferentes mecanismos como relaxação vibracional, conversão interna, cruzamento inter-sistema, fluorescência e fosforescência.<sup>21</sup>

Para ilustrar melhor estes diferentes mecanismos de liberação de energia, são usados frequentemente diagramas de transições eletrônicas, conhecidos como diagrama de Jablonski (Figura 4), que facilita a compreensão destes processos.<sup>22</sup>



**Figura 4:** Diagrama de Jablonski (Adaptado da Ref. 21).

No diagrama de Jablonski, representado na Figura 4, pode-se observar os diferentes estados eletrônicos, sendo os simpletos representados por  $S_0$  (estado fundamental),  $S_1$  e  $S_2$  (estados excitados), e o estado tripleto  $T_1$ . A excitação da molécula para um estado mais energético ocorre com absorção de fótons, e a partir desses estados excitados, diferentes processos de relaxação podem ocorrer, sendo classificados como não-radioativos (não ocorre emissão de fótons) e radioativos (ocorre emissão de fótons).<sup>22</sup>

<sup>20</sup> Lakowicz, J.R.; Principles of fluorescence spectroscopy; Plenum: New York, 1983

<sup>21</sup> Molecular fluorescence: principles and applications. Valeur, B. Wiley-VCH Verlag GmbH. 2001. 381p.

<sup>22</sup> Lichtman, J.W., Conchello, J-A. Fluorescence microscopy; Nature Methods. 2005, 2, 910

Os processos de relaxação não radioativos são: relaxação vibracional, que corresponde à perda de energia vibracional devido a colisões com outras moléculas; conversão interna, que é transição entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin, sem levar ao estado fundamental; e por fim o cruzamento inter-sistema, que corresponde a uma transição isoenergética entre dois estados com diferentes multiplicidades ( $S_1 \rightarrow T_1$ ).<sup>22</sup> A diferença de multiplicidade dos estados está relacionada com o número quântico total de spin, que pode ser 0 e 1. Quando o elétron está no estado singleto (S), este apresenta multiplicidade de estado igual a 1, já no estado tripleto (T) a multiplicidade é igual a 3.

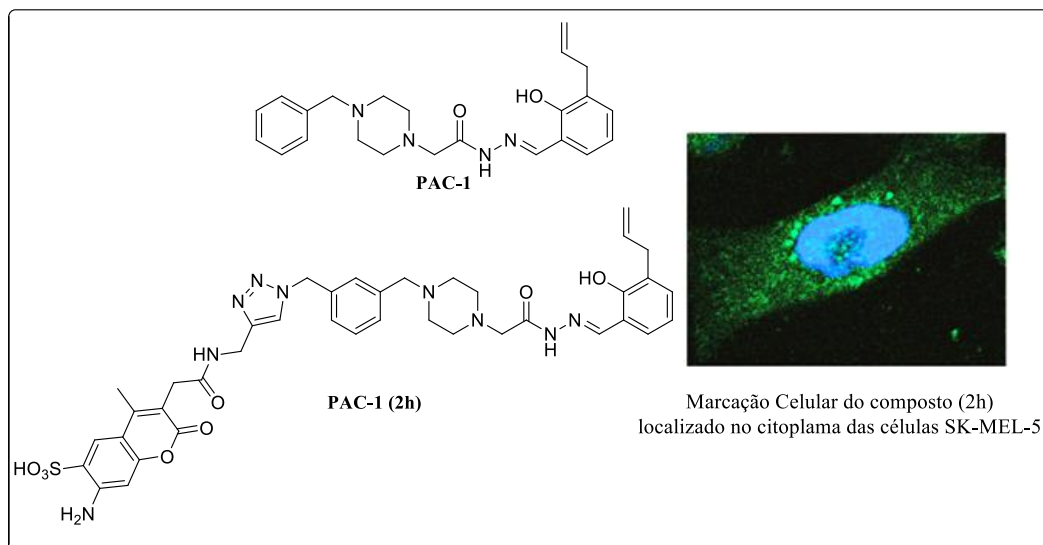
Dentre os processos de relaxação radioativos tem-se a fluorescência, que consiste na transição entre os estados singleto  $S_1$  para  $S_0$  (estado fundamental), e a fosforescência, que corresponde às transições entre o estado tripleto ( $T_1$ ) para o estado fundamental ( $S_0$ ), de diferentes multiplicidades. Nesse último tipo de transição o elétron excitado, ao decair, muda sua orientação do spin, emparelhando-se ao elétron que permaneceu no estado fundamental. Devido a essa alteração na orientação do spin, as taxas de emissão para fosforescência são mais lentas, desta forma a fosforescência só é observada em condições específicas.<sup>22</sup>

### 1.3.1. Luminescência - estudos de localização subcelular

Atualmente vários estudos de localização subcelular, bem como estudos de bioimageamento, estão sendo realizados por diversos pesquisadores em todo o mundo, com o objetivo de se obter informações relevantes que possam contribuir para esclarecer mecanismos de ação de fármacos já estudados e/ou classes de compostos com potencial atividade biológica.

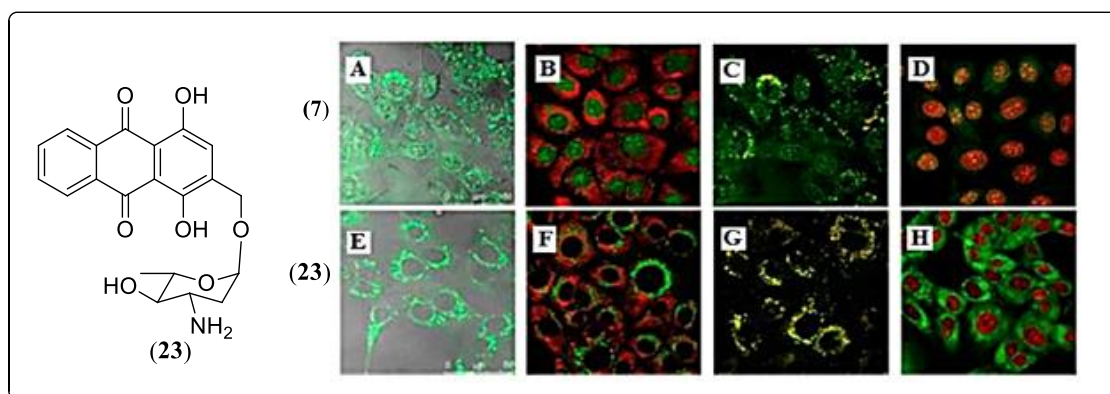
Peterson e colaboradores realizaram, por exemplo, estudos com substâncias derivadas do PAC-1 (Figura 5), composto que induz a autoativação *in vitro* de algumas proteases, a fim de compreender melhor como tal substância atua. Foram realizados testes com diferentes derivados de PAC-1 para determinar exatamente quais grupos funcionais são responsáveis pela ativação da caspase (protease baseada em cisteína) bem como pela quelação de íons zinco e pela morte celular. Os íons zinco são responsáveis por inibir alguns tipos de caspases. Foram realizados também estudos com um novo derivado fluorescente do PAC-1(2h) contendo um pró-fluoróforo cumarínico. Experimentos de microscopia confocal indicaram que o marcador fluorescente localizava-se em locais de atividade da protease caspase-3,

apresentando fluorescência no citoplasma e uma ligeira coloração na região do núcleo celular (Figura 5).<sup>18</sup>



**Figura 5:** PAC-1, PAC-1 (2h), e a imagem da marcação celular pelo composto PAC-1 (2h)

Recentemente Shaul e colaboradores reportaram a síntese e atividade citotóxica de antraquinonas como a substância (23) (Figura 6) análogas à doxorubicina (7) frente a quatro linhagens de células tumorais. Aproveitando-se da fluorescência intrínseca destes compostos, estudos de localização subcelular foram realizados, mostrando a presença da doxorubicina (7) no núcleo celular e localização de todos os derivados estudados nos lisossomos das células (Figura 6).<sup>19</sup> Os experimentos indicaram também que pequenas diferenças estruturais nos derivados resultaram em diferenças na localização subcelular.<sup>19</sup>



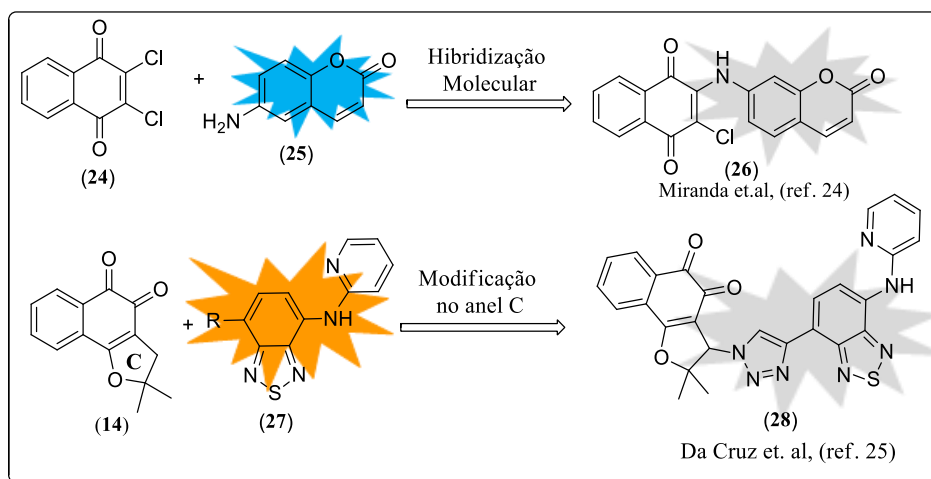
**Figura 6:** Composto (23) à esquerda. A direita tem-se: por microscopia confocal, da linhagem celular DA3, da doxorubicina (7) (Imagens A-D) e do composto (23) (Imagens E-F e H). A localização subcelular foi avaliada utilizando o corante mitocondrial MitoTracker deep red ou o corante nuclear DRAQ-5 deep red. Experimentos de co-localização foram realizados utilizando o corante para lisossomos LysoTracker green para a doxorubicina e LysoTracker red para o composto 23. 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. (adaptado da Ref. 19)

Embora possam ser encontrados esses e outros exemplos de marcação fluorescente de compostos citotóxicos, a marcação de compostos naftoquinoidais usando esta estratégia não é tão evidente. Alguns estudos objetivando a obtenção de naftoquinonas luminescentes foram descritos na literatura, porém os resultados obtidos não foram promissores. Miranda e colaboradores, por exemplo, reportaram a síntese de quatro novos híbridos do tipo 6-aminocumarina-naftoquinona (26), com a pretensão de obter naftoquinonas luminescentes, entretanto observou-se o fenômeno de atenuação da luminescência do fluoróforo cumarínico, fenômeno conhecido como “quenching”,<sup>21</sup> nos quatro derivados. Na tentativa de explicar o fenômeno ocorrido, os autores realizaram experimentos e cálculos computacionais; os resultados indicaram que o grupo fluorescente, neste caso a 6-aminocumarina (25), doa elétrons para o orbital LUMO da naftoquinona que tem forte caráter  $\pi$  aceptor, o que ocasionou atenuação da luminescência nos novos híbridos, através do fenômeno de transferência oxidativa fotoinduzida (PET).<sup>23</sup> Da Cruz e colaboradores, também na tentativa de obter naftoquinonas luminescentes, sintetizaram derivados da *nor*- $\beta$ -lapachona (14)

<sup>23</sup>Miranda, F. S.; Ronconi, C. M.; Sousa, M. O. B.; Silveira, G. Q.; Vargas, M. D. 6-Aminocoumarin-Naphthoquinone Conjugates: Design, Synthesis, Photophysical and Electrochemical Properties and DFT Calculations. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 133–142.



utilizando como fluoróforo compostos do tipo 1,2,3-benzotiadiazola (BTD) (28), todavia resultados similares de atenuação da luminescência foram obtidos (Esquema 6).<sup>24</sup>



**Esquema 6:** Obtenção de naftoquinonas acopladas à diferentes fluoróforos.

Pode-se observar a partir dos trabalhos descritos acima que a obtenção de naftoquinonas luminescentes apresenta-se como um desafio na área. A escolha do fluoróforo nesse tipo de pesquisa é bastante relevante pois dependendo do composto utilizado, o produto final pode não apresentar propriedades luminescentes, inviabilizando estudos de localização subcelular.

### 1.3.2. Fluoróforos do tipo BODIPY

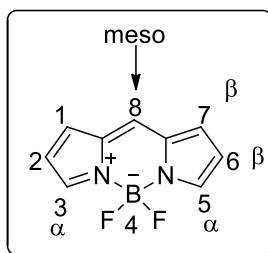
Fluoróforos são substâncias que apresentam a capacidade de emitir luz após absorver energia na forma de fótons. Tais substâncias possuem características estruturais que favorecem mecanismos de relaxação radioativos na forma de fluorescência, como por exemplo: rigidez, planaridade, sistemas conjugados, grupos aromáticos e anéis condensados.<sup>20</sup>

Dentre os fluoróforos, destacam-se os BODIPYs (acrônimo em inglês para boron-dipyrromethene), compostos contendo o núcleo 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (Figura 7). Esta classe de fluoróforos vem despertando o interesse no meio científico,

<sup>24</sup> da Cruz, E. H. G.; Carvalho, P. H. P. R.; Corrêa, J. R.; Silva, D. A. C.; Diogo, E. B. T.; de Souza Filho, J. D. ; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; de Oliveira, H. C. B.; Guido, B. C.; da Silva Filho, D. A.; Neto, B. A. D.; da Silva Júnior, E. N. Design, synthesis and application of fluorescent 2,1,3-benzothiadiazole-triazole-linked biologically active lapachone derivatives. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 2569–2580.

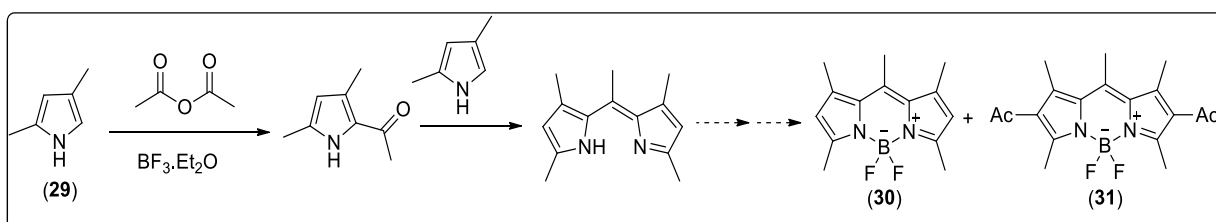


principalmente nas áreas de biologia e química, devido às suas propriedades fotofísicas notáveis, como altos rendimentos quânticos de fluorescência, elevados valores de coeficientes de absorvidade molares, bem como fotoestabilidade.<sup>25</sup> A rigidez estrutural do núcleo BODIPY é considerada o fator predominantemente responsável pelos altos valores de rendimentos quânticos, uma vez que a taxa de decaimentos não radioativos é quase inexistente nesse tipo de sistema.<sup>26</sup>



**Figura 7:** Núcleo BODIPY numerado de acordo com as regras da IUPAC

BODIPYs são substâncias sintéticas, sendo o primeiro relato de síntese desses compostos reportado em 1968 por Treibs e Kreuzer, quando ambos, na tentativa de realizar a acetilação do 2,4-dimetilpirrol na presença de anidrido acético e  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , obtiveram dois produtos com propriedades luminescentes (Esquema 7).<sup>27</sup>



**Esquema 7:** Obtenção dos primeiros derivados do tipo BODIPY por Treibs e Kreuzer (Adaptada da Ref. 27)

Embora o relato da primeira síntese tenha sido reportado no final dos anos 1960s, poucos estudos abordando essa nova classe de compostos fluorescentes foram publicados nos anos seguintes; apenas no ano de 1987, quando a empresa *Molecular Probes*® de produtos

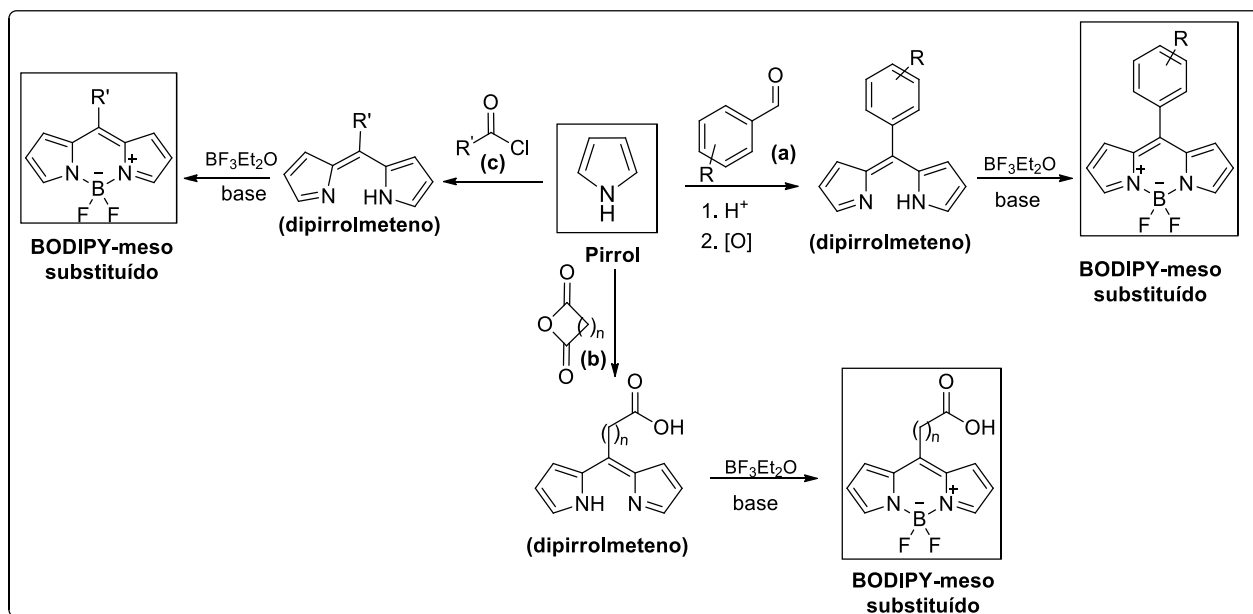
<sup>25</sup> Kowada, T.; Moeda, H.; Kikuchi, K. BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4953–4972

<sup>26</sup> Lu, H., Mack; J., Yang, Y.; Shen, Z. Structural modification strategies for the rational design of red/NIR region BODIPYs. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4778–4823

<sup>27</sup> Treibs, A.; Kreuzer, F. H. Difluorboryl-Komplexe von di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208-223

fluorescentes depositou uma patente,<sup>28</sup> esta classe de fluoróforos começou a ter destaque na área científica e tecnológica.

Rotas sintéticas para obtenção do núcleo BODIPY são relativamente simples, e utilizam como materiais de partida o pirrol ou derivados pirrólicos substituídos. BODIPYs meso substituídos podem ser obtidos a partir de reações entre unidades pirrólicas e aldeídos aromáticos (a), anidridos cíclicos (b) ou cloretos de ácidos (c) (Esquema 8). Apenas nas reações com aldeídos é necessário a utilização de agentes oxidantes, como DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona) ou *p*-cloroanil (2,3,5,6-tetracloro-*p*-benzoquinona), para obtenção do intermediário dipirrolmeteno. O dipirrolmeteno é então tratado com base, e em seguida adiciona-se BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (eterato de trifluoreto de boro), levando à formação do núcleo BODIPY.<sup>29, 30</sup>



**Esquema 8:** Rotas sintéticas para obtenção de BODIPYs- meso substituídos, a partir do pirrol<sup>29,30</sup>

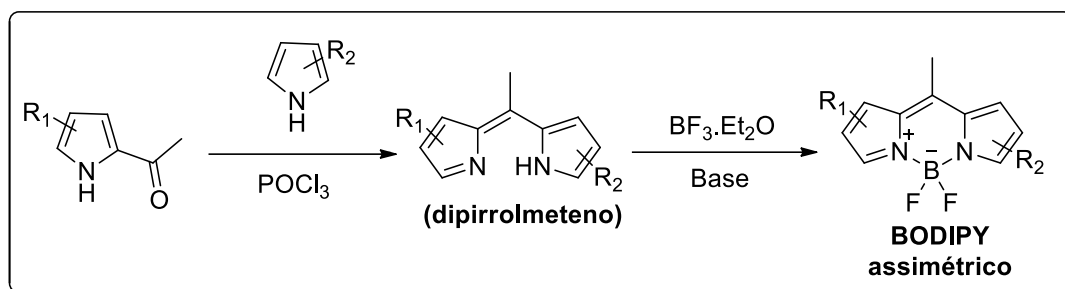
Outra rota sintética muito explorada para obtenção do núcleo BODIPY é a utilização de unidades pirrólicas contendo o grupo carbonila na posição  $\alpha$  do anel. O pirrol acilado reage com outra unidade pirrólica, na presença de cloreto de fosforila (POCl<sub>3</sub>), gerando o

<sup>28</sup>Haugland, R. P.; Kang, H. C. Chemically Reactive Dipyrrometheneboron Difluoride Dyes. U.S. Patent n. 4,774,339,27 set. **1988**.

<sup>29</sup> Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*,7,1184-1201.

<sup>30</sup> Boens, N.; Leen, V.; Dehaen W.; Fluorescent indicators based BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130-1172

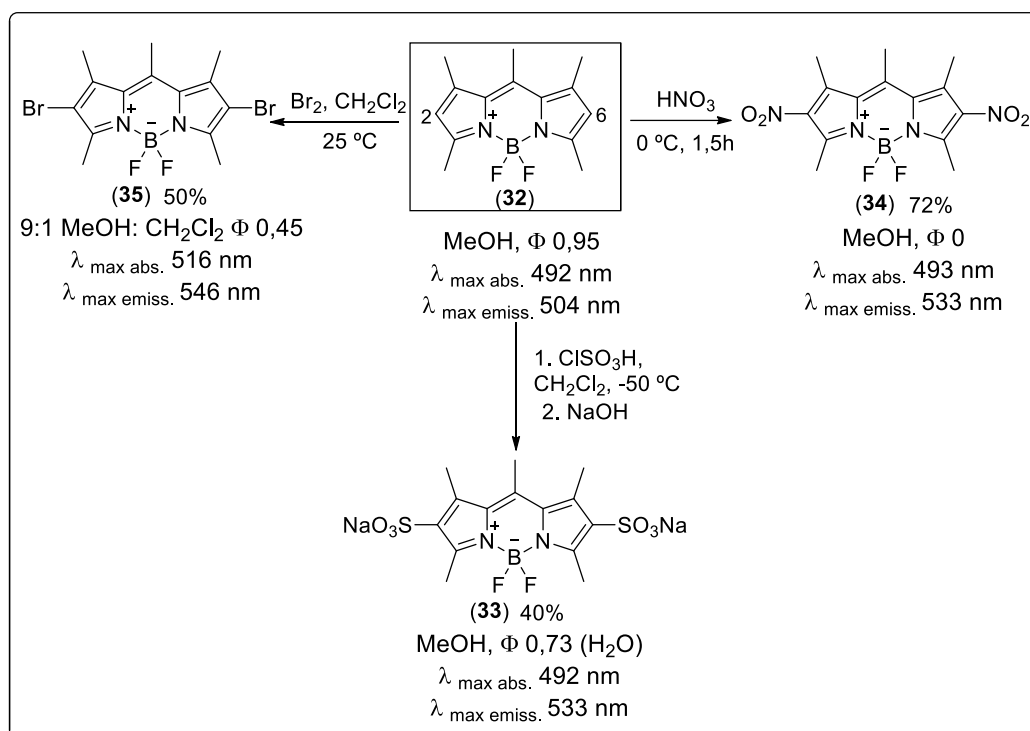
intermediário dipirrolmeteno que é em seguida tratado com base e  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , levando à formação do BODIPY (Esquema 9). Uma vantagem dessa rota sintética é a possibilidade de obter BODIPYs assimétricos, com diferentes substituintes em cada unidade pirrólica utilizada.<sup>30,31</sup>



**Esquema 9:** Rota Sintética para obtenção de BODIPYs assimétricos.<sup>31</sup>

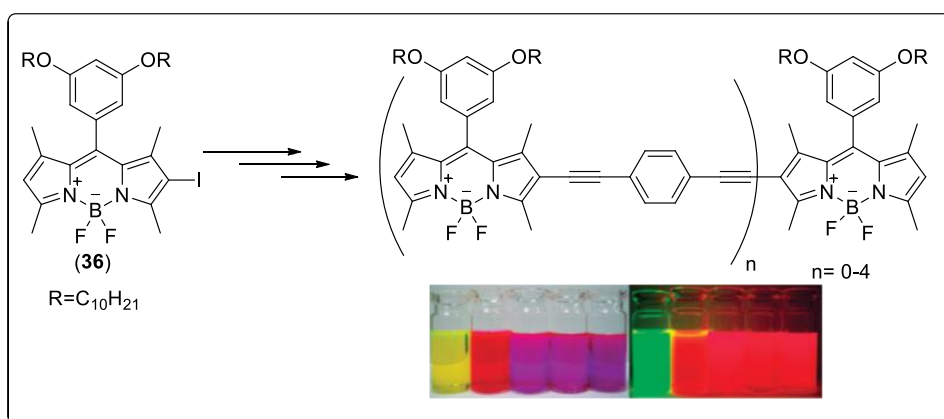
O núcleo BODIPY é bastante versátil frente à modificações químicas estruturais. Reações de substituições eletrofílicas podem ser geralmente realizadas neste núcleo, como sulfonação, halogenação, nitração, dentre outras. Em geral estas reações ocorrem nas posições 2 e 6 do anel BODIPY, devido à nucleofilicidade desses carbonos (Esquema 10).<sup>32</sup> Modificações na estrutura do núcleo BODIPY podem acarretar mudanças em suas propriedades fotofísicas, como por exemplo nos comprimentos de onda de absorção e emissão bem como nos valores de rendimentos quânticos, sendo o último a propriedade mais afetada dependendo do grupo inserido na estrutura do BODIPY.

<sup>31</sup> Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M.-L.; Wolford, L. T.; Boyer, J. H.; Politzer, I. R.; Pavlopoulos, T. G. Pyrromethene- $\text{BF}_2$  complexes as laser dyes:1 *Heteroat. Chem.* **1990**, *1*, 389.



**Esquema 10:** Modificações na estrutura do BODIPY (**32**), através de reações de substituição eletrofílica, e propriedades fotofísicas dos derivados BODIPYs<sup>32</sup>

A introdução de grupos halogênicos como bromo e iodo na estrutura do BODIPY é bastante interessante pois, a partir desses grupos, é possível realizar reações de acoplamento cruzado carbono-carbono, possibilitando estender a conjugação do sistema, obtendo-se sondas fluorescentes que emitem na região do vermelho (Esquema 11).<sup>33</sup>

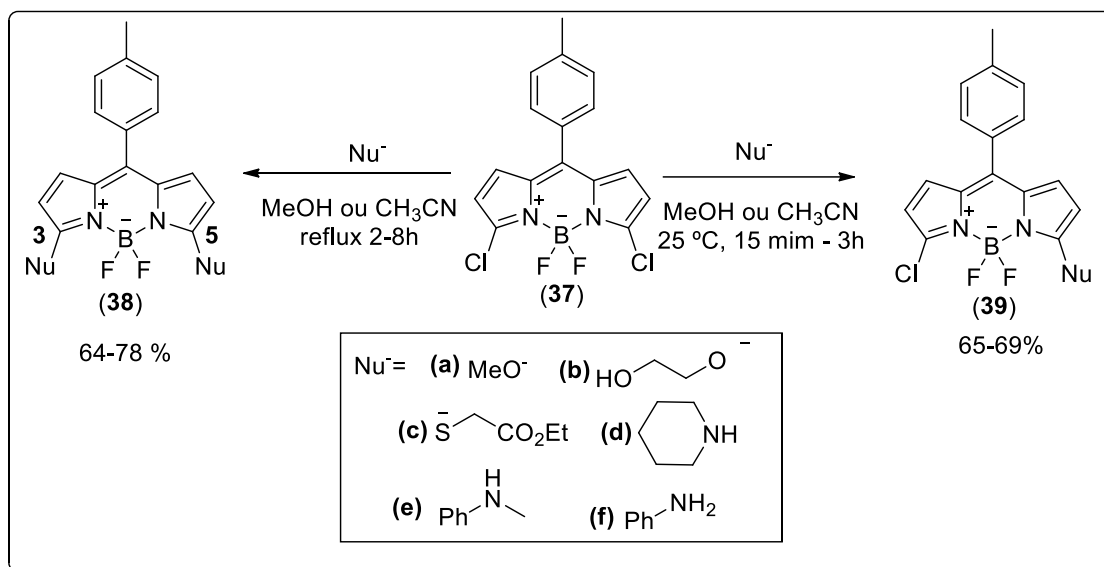


**Esquema 11:** Modificações estruturais no BODIPY (**36**) para obtenção de sondas fluorescentes que emitem na região do vermelho<sup>33</sup>

<sup>32</sup> Loudet, A.; Burgess, K.; BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.

<sup>33</sup> Cakmak, Y.; Akkaya, E. U. Phenylethynyl-BODIPY Oligomers: Bright Dyes and Fluorescent Building Blocks. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 85-88.

Outra possibilidade de modificação no núcleo BODIPY é a funcionalização das posições 3 e 5, devido à eletrofilicidade destes carbonos. Derivados contendo halogênios nessas posições são amplamente utilizados em reações de substituição nucleofílica aromática, sendo o 3,5-dicloro-BODIPY (**37**) o principal precursor para síntese de novos derivados a partir desse tipo de reação (Esquema 12).<sup>34</sup>



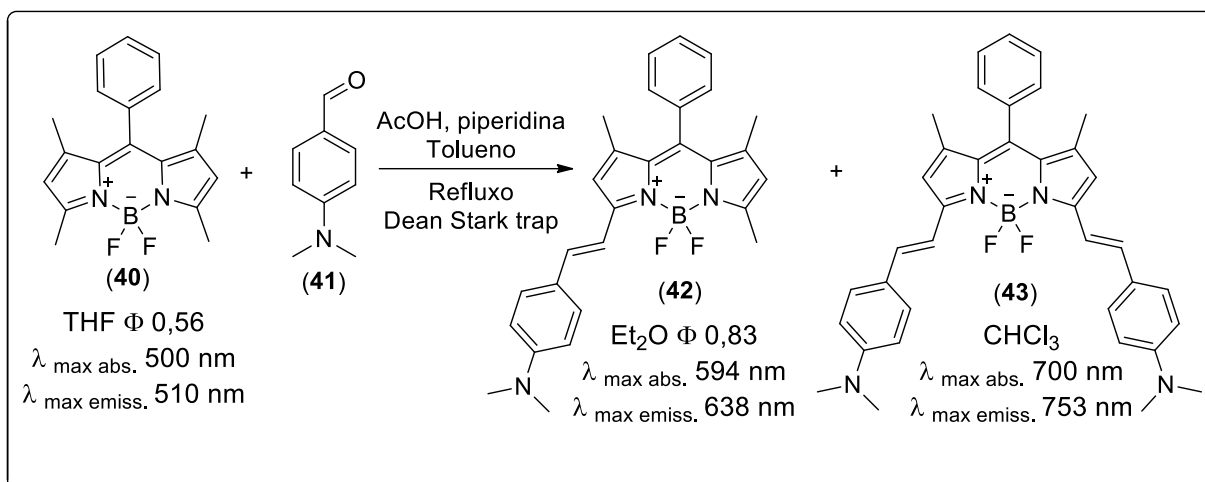
**Esquema 12:** Reações de substituição nucleofílica aromática a partir do 3,5-dicloro-BODIPY (**37**) (Adaptado da ref. 34)

BODIPYs que apresentam grupos metilas ligados aos carbonos 3 e 5 também podem sofrer modificações estruturais nestas posições. Devido à acidez dos hidrogênios do grupo metila, é possível, por exemplo, realizar reações de condensação com aldeídos aromáticos, levando à formação de produtos com dupla ligação, aumentando assim a conjugação dos novos derivados (Esquema 13).<sup>35,36</sup>

<sup>34</sup> Rohand, T.; Baruah, M.; Qin, W.; Boens, N.; Dehaen, W. Functionalisation of fluorescent BODIPY dyes by nucleophilic substitution. *Chem. Commun.* **2006**, 266–268

<sup>35</sup> Rurack, K.; Kollmannsberger, M.; Daub, J. A highly efficient sensor molecule emitting in the near infrared (NIR) : 3,5-distyryl-8-(p-dimethylaminophenyl)- diÑuoroboradiaza-s-indacene. *New J. Chem.* **2001**, 25, 289-292

<sup>36</sup> Deniz, E.; Isbasar, G. C.; Bozdemir, O. A.; Yildirim, L. T.; Siemiarczuk, A.; Akkaya, E. U.; Bidirectional switching of near IR emitting boradiazaindacene fluorophores. *Org. Lett.* **2008**, 10, 3401-3403



**Esquema 13:** Reação de condensação do 1,3,5,7-tetrametil-BODIPY (40) com aldeídos aromáticos, gerando fluoróforos com sistema  $\pi$  estendido.<sup>30, 36, 37</sup>

Diante das notáveis propriedades fotofísicas dos BODIPYs e da versatilidade sintética e estrutural dessa classe de compostos, este núcleo apresenta-se como alternativa promissora na síntese de novos derivados naftoquinoidais luminescentes. Conseqüentemente, estudos de localização subcelular destes novos derivados poderão ser realizados, a fim de obter informações que possam colaborar na elucidação de mecanismos de ação desta classe de substâncias.

<sup>37</sup> Lu, H.; Mack, J.; Yang, Y.; Shen, Z. Structural modification strategies for the rational design of red/NIR region BODIPYs. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4778—4823.

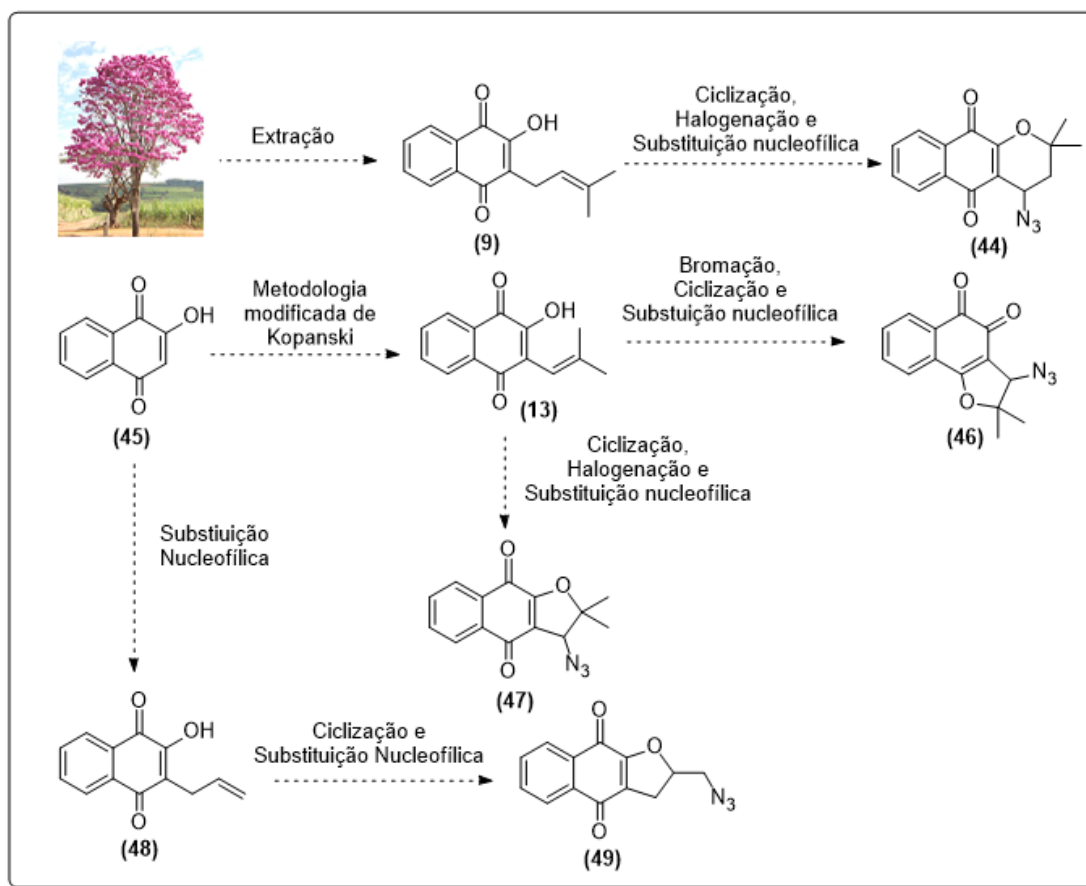
## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo a síntese, caracterização, avaliação antitumoral e estudos de marcação subcelular de derivados naftoquinoidais acoplados a fluoróforos do tipo BODIPY, via reação “click”.

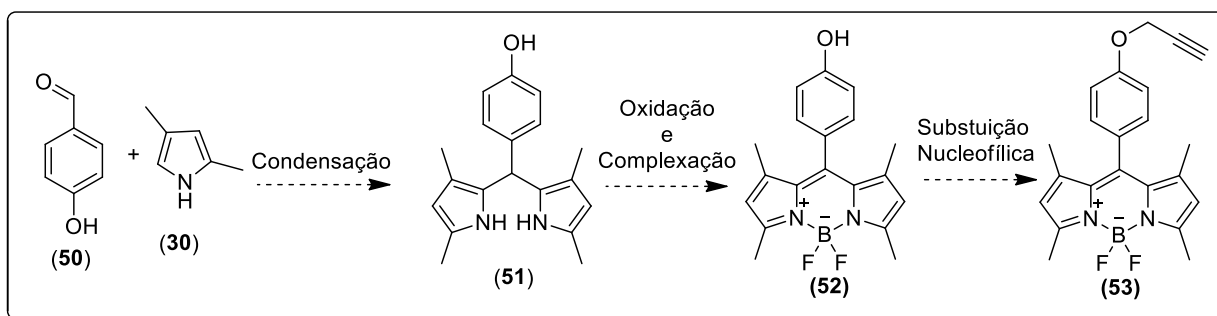
### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Síntese e caracterização da azida (**46**) derivada de *orto*-naftoquinona, e das azidas (**44**), (**47**) e (**49**) derivadas de *para*-naftoquinonas (**44**), (**47**) e (**49**) (Esquema 14);



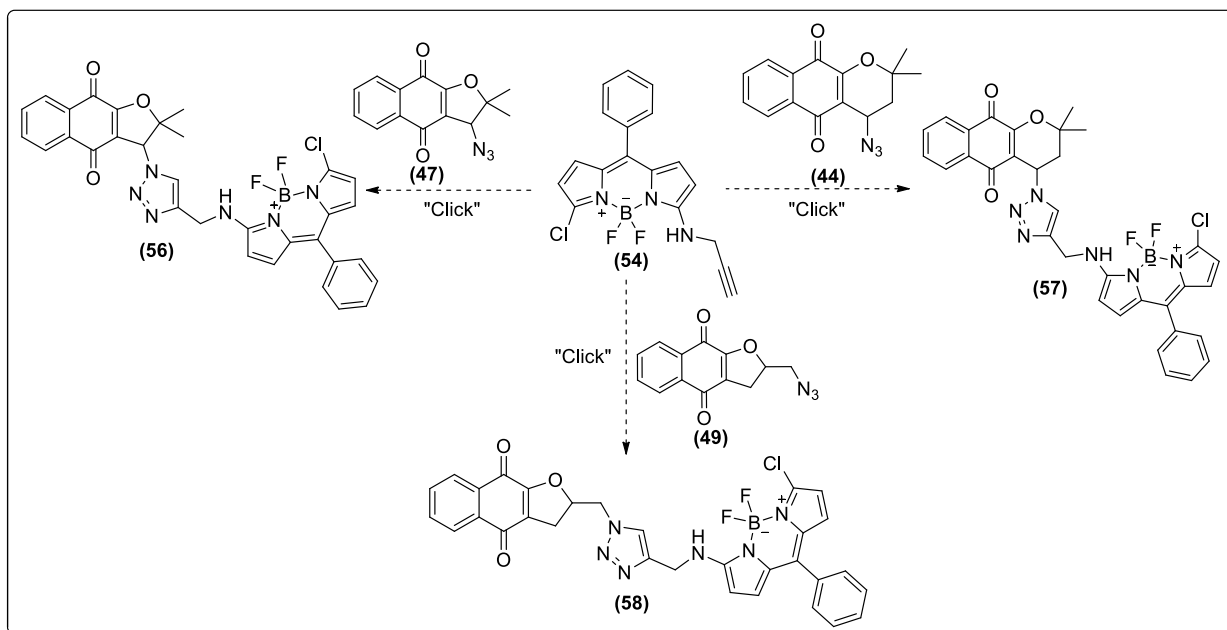
**Esquema 14:** Proposta sintética para obtenção de azidas derivadas de *orto*-naftoquinonas e *para*-naftoquinonas

- ✓ Síntese e caracterização do BODIPY (**53**) (Esquema 15);



**Esquema 15:** Etapas para a obtenção do BODIPY (53)

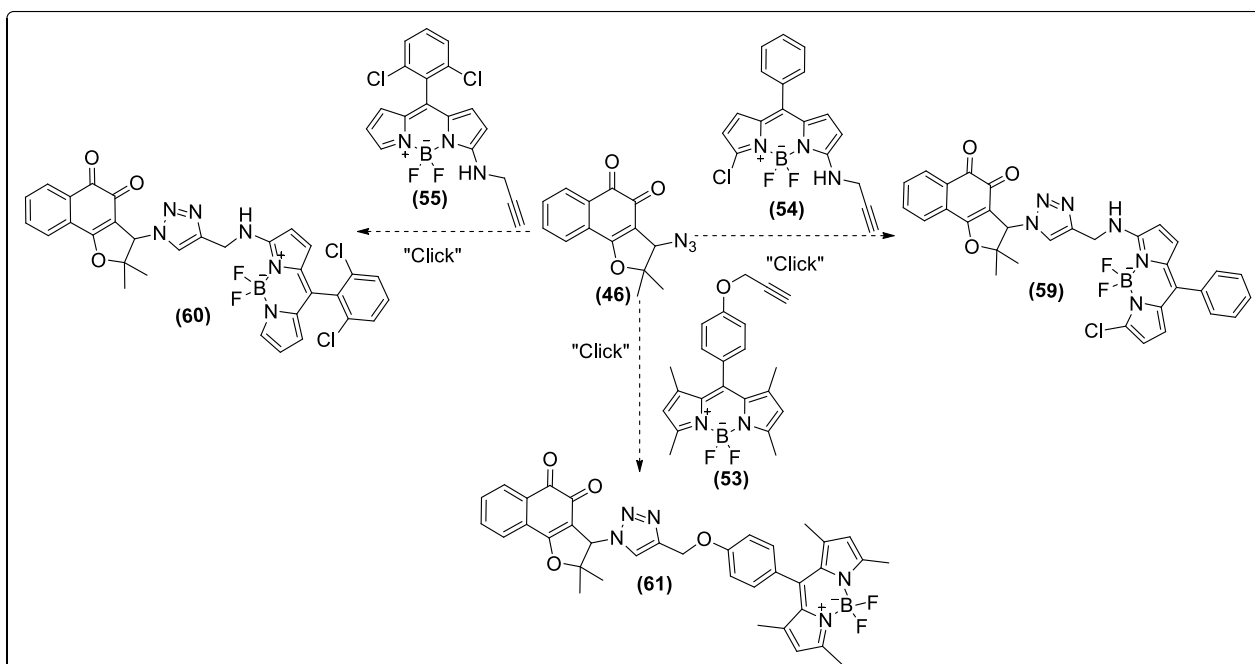
- ✓ Síntese e caracterização das *para*-naftoquinonas **56-58** acopladas aos BODIPYs via reação “click” (Esquema 16);



**Esquema 16:** Proposta sintética para obtenção dos derivados *para*-naftoquinoidais acoplados à BODIPYs **56-58**.

- ✓ Síntese e caracterização das *orto*-naftoquinonas **59-61** acopladas aos BODIPYs via reação “click” (Esquema 17);





**Esquema 17:** Proposta sintética para obtenção dos derivados orto-naftoquinoidais acoplados à BODIPYs **59-61**

- ✓ Estudo das propriedades fotofísicas dos compostos **(60)** e **(61)**;
- ✓ Avaliar *in vitro* os compostos **56-60** frente a linhagens de células tumorais e células normais;
- ✓ Estudo de marcação subcelular do composto **(60)**.

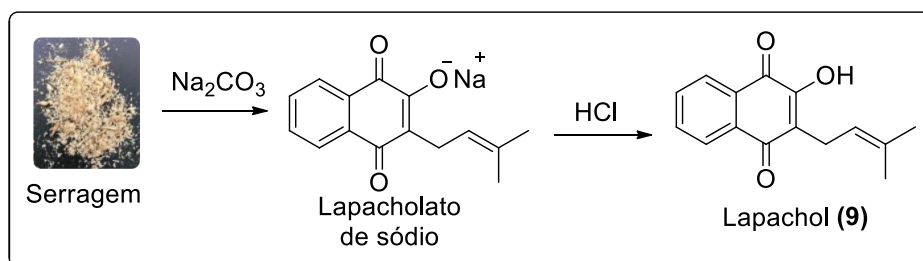
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Síntese e caracterização das naftoquinonas acopladas à BODIPYs

##### 3.1.1. Síntese e caracterização dos intermediários naftoquinoidais

A primeira parte do trabalho consistiu na síntese dos intermediários naftoquinoidais contendo o grupo azida (**44**), (**46**), (**47**) e (**49**), conforme apresentado no Esquema 14 (página 21). A azida (**44**) foi obtida a partir do lapachol (**9**), um produto natural extraído do cerne do Ipê roxo (*Tabebuia avellanediae*) e as azidas (**46**), (**47**) e (**49**) foram obtidas a partir da lausona (**45**), reagente comercial.

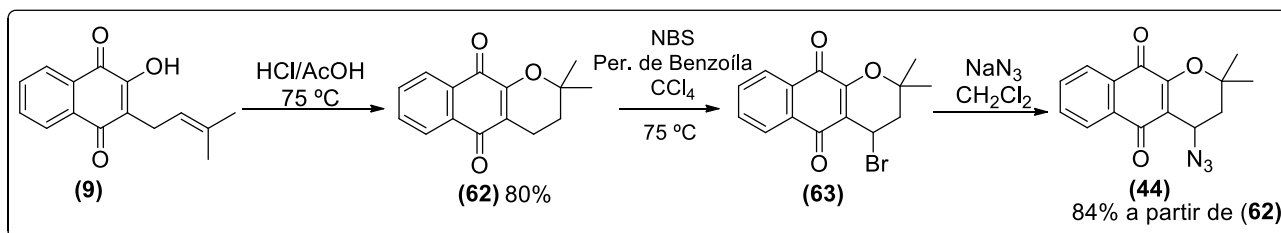
A 4-azido- $\alpha$ -lapachona (**44**) foi obtida em 3 etapas, partindo-se do lapachol (**9**). Primeiramente o lapachol (**9**) foi extraído do cerne do Ipê roxo (serragem da madeira), utilizando-se solução aquosa de carbonato de sódio, o que leva à uma reação ácido-base, formando o lapacholato de sódio. Posteriormente o meio foi filtrado, seguido da adição de solução de HCl ocasionando a precipitação do lapachol (**9**) (Esquema 18).<sup>38</sup> A purificação do lapachol (**9**) foi realizada através de uma extração em Soxhlet, utilizando-se hexano e posterior recristalização do sólido obtido, sendo utilizado hexano e diclorometano como solvente.



**Esquema 18:** Obtenção do lapachol (**9**) a partir do cerne do Ipê roxo.

A partir do lapachol sintetizou-se a  $\alpha$ -lapachona (**62**), através de uma reação de ciclização usando-se ácido clorídrico e ácido acético. Posteriormente realizou-se a bromação de (**62**) via reação radicalar, utilizando-se *N*-bromosuccinimida (NBS), formando-se o derivado bromado (**63**). Este foi tratado com azida de sódio, levando à formação da 4-azido- $\alpha$ -lapachona (**44**) (Esquema 19).<sup>12</sup>

<sup>38</sup> Ferreira V. F.; Aprendendo sobre os conceitos de ácido e base. *Quim. Nov. Esc.* **1996**, *4*, 35-36.

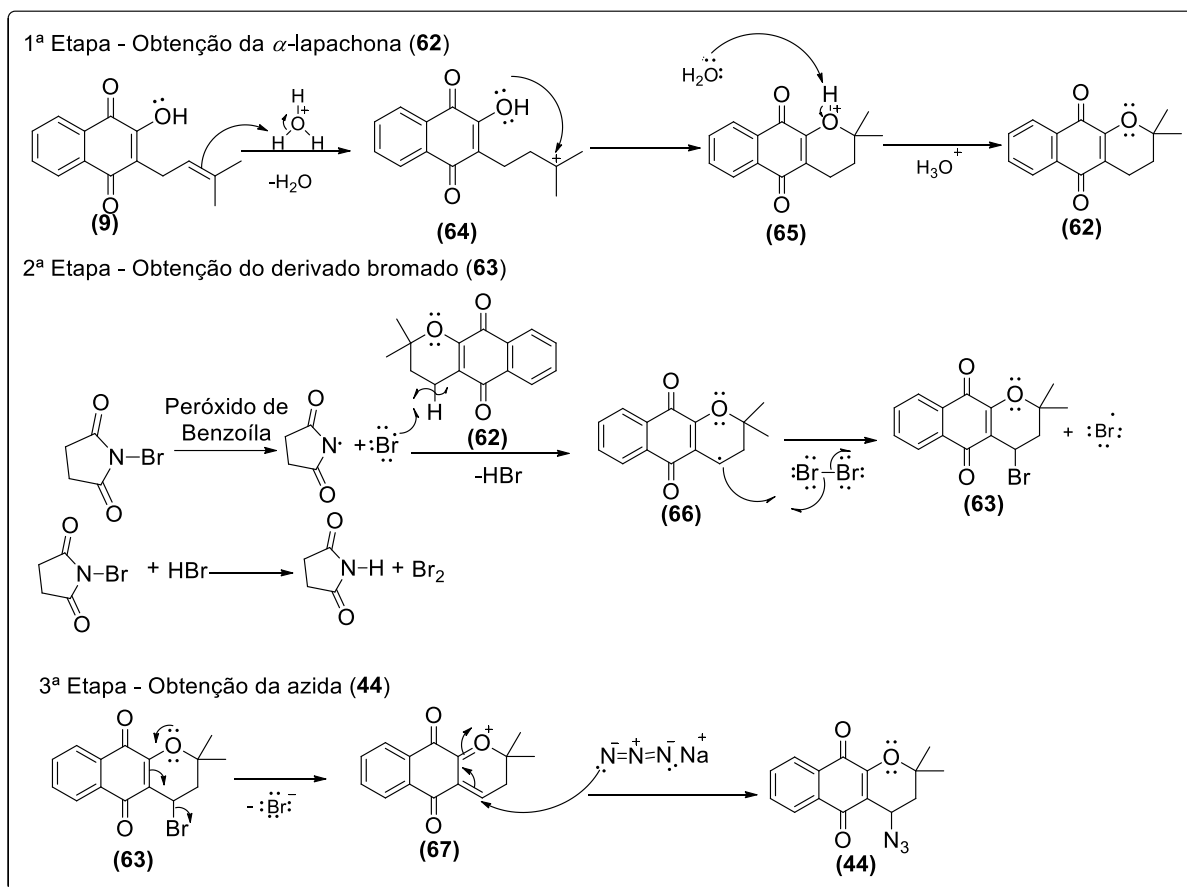


**Esquema 19:** Rota sintética para obtenção da 4-azido- $\alpha$ -lapachona (**44**)

A proposta mecanística para obtenção da 4-azido- $\alpha$ -lapachona (**44**) está representada no Esquema 20. Na primeira etapa ocorre a protonação da dupla ligação da cadeia lateral do lapachol (**9**), formando um intermediário carbocátion terciário (**64**). Sequencialmente ocorre um ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio da hidroxila ao carbocátion terciário, levando à formação do intermediário (**65**) e por fim ocorre a desprotonação do oxigênio, formando-se a  $\alpha$ -lapachona (**62**).

A formação do intermediário bromado (**63**) ocorre via reação radicalar, realizada com NBS e peróxido de benzoíla como iniciador. A reação inicia-se com a quebra homolítica da ligação entre o nitrogênio e o bromo, com a formação do radical Br $\cdot$ , este então reage com a  $\alpha$ -lapachona (**62**), abstraindo um hidrogênio, levando a formação do radical (**66**) e ácido bromídrico (HBr) no meio. Em seguida ocorre a reação entre uma molécula de HBr e NBS, formando bromo molecular e succinimida, essa reação faz com que a concentração de bromo molecular no meio reacional seja constante até o final da reação de bromação. O radical (**66**) reagirá então como o bromo molecular, fornecendo o produto bromado (**63**) e o radical Br $\cdot$ .

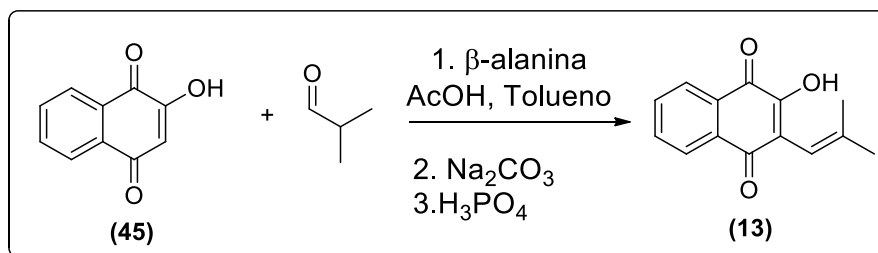
Na terceira etapa ocorre a formação do íon oxônio (**67**), com saída de íon brometo e posterior ataque nucleofílico do íon azida, levando à formação do composto (**44**).



**Esquema 20:** Mecanismo para formação da 4-azido- $\alpha$ -lapachona (**44**)

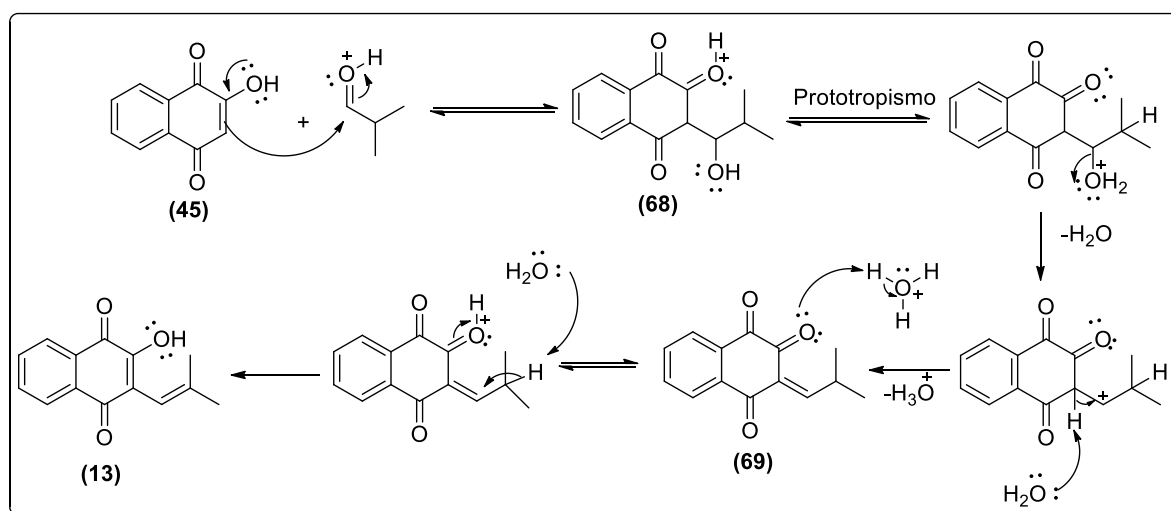
Para a síntese das azidas (**46**) e (**47**) (Esquema 14, página 21) foi necessária a obtenção do *nor*-lapachol (**13**) a partir da lausona comercial (**45**), utilizando-se a metodologia modificada de Kopanski.<sup>39</sup> A lausona (**45**) foi aquecida juntamente com isobutiraldeído, ácido acético,  $\beta$ -alanina e tolueno como solvente (Esquema 21); nesta reação a  $\beta$ -alanina é utilizada como um organocatalisador. A purificação foi realizada por meio de uma extração ácido-base, utilizando-se carbonato de sódio e sequencialmente ácido fosfórico, obtendo no final do processo um sólido alaranjado com rendimento quantitativo, caracterizado como sendo o *nor*-lapachol (**13**).

<sup>39</sup>Kopanski, L.; Karbach, D.; Selbifsehka, G.; Steglich, W.; Vesparion, ein Naphtho[2,3-b]pyrandon- Derivat aus dem Schleimpilz *Metatrachia vesparium* (Myxomycetes). *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, *53*, 793-796.



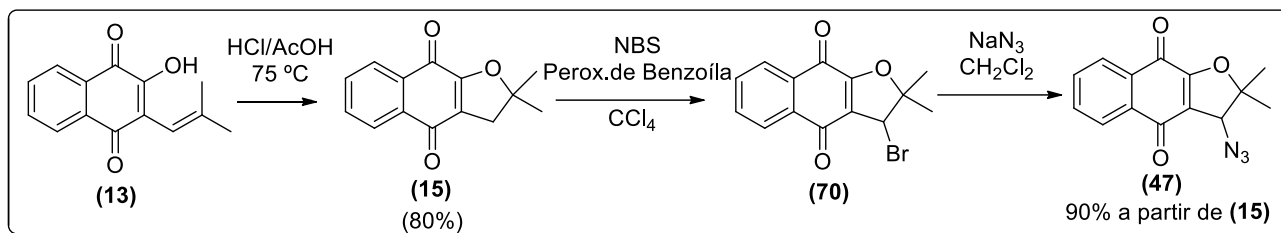
Esquema 21: Síntese do *nor*-lapachol (**13**)

O mecanismo proposto para a reação inicia-se com ataque nucleofílico da dupla ligação da lausona (**45**) à carbonila ativada do isobutiraldeído, auxiliado pelo par de elétrons da hidroxila, formando o intermediário (**68**). Em seguida ocorre um prototropismo e perda de uma molécula de água, provavelmente por mecanismo do tipo E1, formando um carbocátion secundário. Uma base fraca presente no meio reacional abstrai o hidrogênio  $\alpha$ , por ser o mais ácido, levando ao composto tricarbonílico (**69**). Em seguida ocorre a protonação de uma das carbonilas do composto (**69**), para posterior abstração do próton ligado ao carbono terciário por outra molécula de água, levando à formação do *nor*-lapachol (**13**) (Esquema 22).



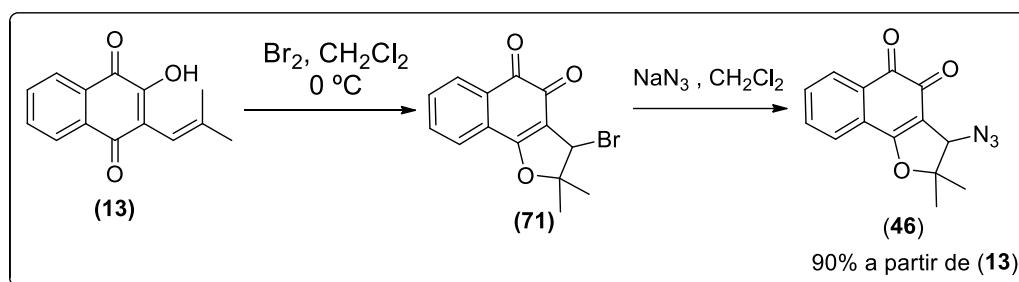
Esquema 22: Proposta mecanística para obtenção do *nor*-Lapachol (**13**)

Após a obtenção do *nor*-lapachol (**13**) realizou-se a síntese das azidas (**46**) e (**47**). A 3-azido- $\alpha$ -lapachona (**47**) foi obtida utilizando a mesma metodologia da síntese da 4-azido- $\alpha$ -lapachona (**6**) (Esquema 23).<sup>14</sup>



**Esquema 23:** Rota sintética para obtenção da 3-azido- $\alpha$ -lapachona (**47**)

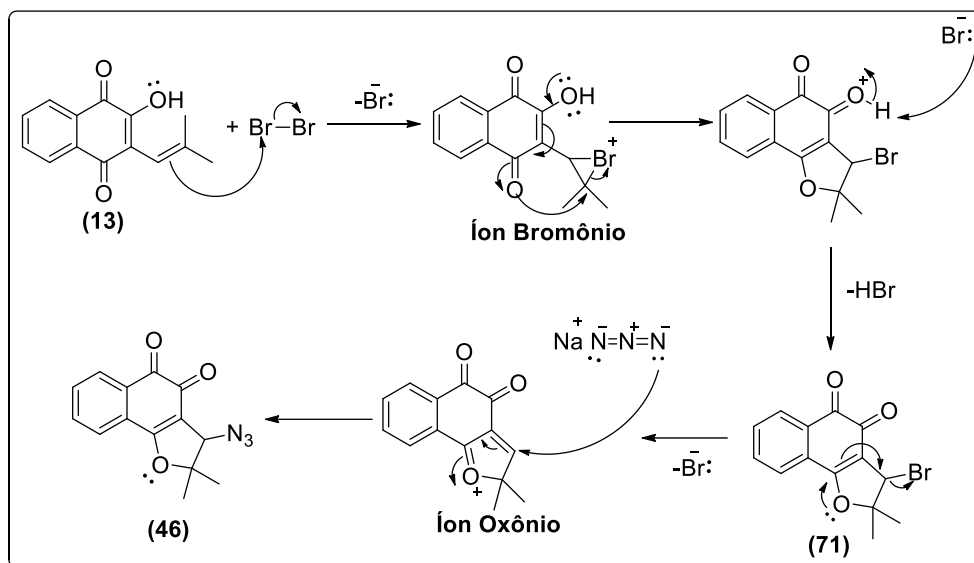
Para síntese da 3-azido-nor- $\beta$ -lapachona (**46**), o nor-lapachol (**13**) foi tratado com excesso de bromo molecular em diclorometano à baixa temperatura, obtendo-se o derivado bromado (**71**). Devido ao fato de (**71**) ser instável e degradar rapidamente, este foi utilizado na próxima etapa logo em seguida. Então (**71**) foi tratado com excesso de azida de sódio em diclorometano, levando à formação do composto (**46**) (Esquema 24).<sup>40</sup>



**Esquema 24:** Síntese da 3-azido- $\beta$ -lapachona (**46**)

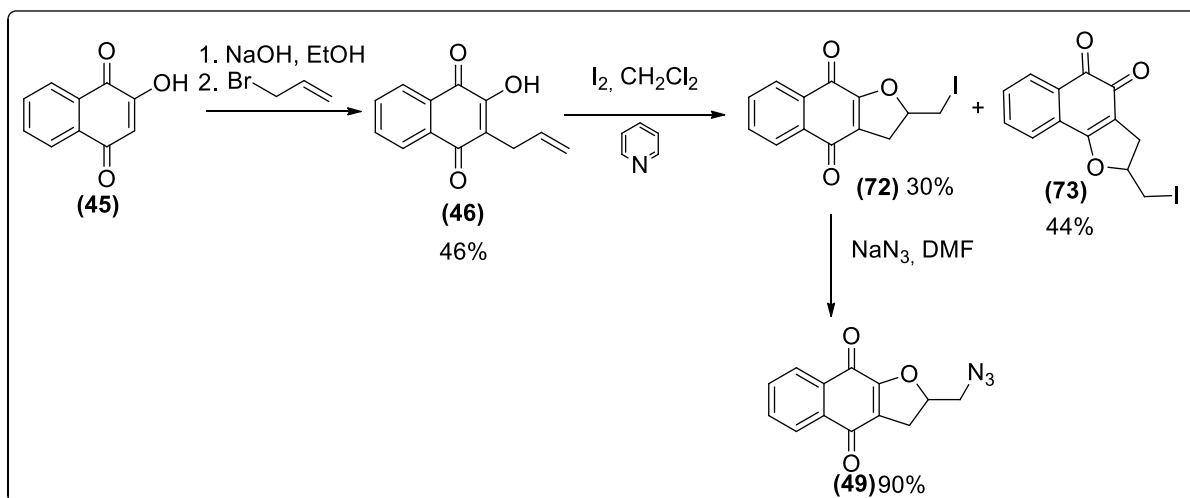
O mecanismo proposto para obtenção da azida (**46**) consiste na adição do bromo à dupla ligação da cadeia lateral do nor-lapachol (**13**) formando o íon bromônio que então sofre um ataque intramolecular do par de elétrons do oxigênio da carbonila, levando ao intermediário bromado instável (**71**). Posteriormente ocorre uma substituição nucleofílica do bromo pelo íon azida, passando pelo intermediário íon oxônio, levando à formação da 3-azido-nor- $\beta$ -lapachona (**46**) (Esquema 25).

<sup>40</sup>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



**Esquema 25:** Proposta mecanística para obtenção da 3-azido-nor-β-lapachona (46)

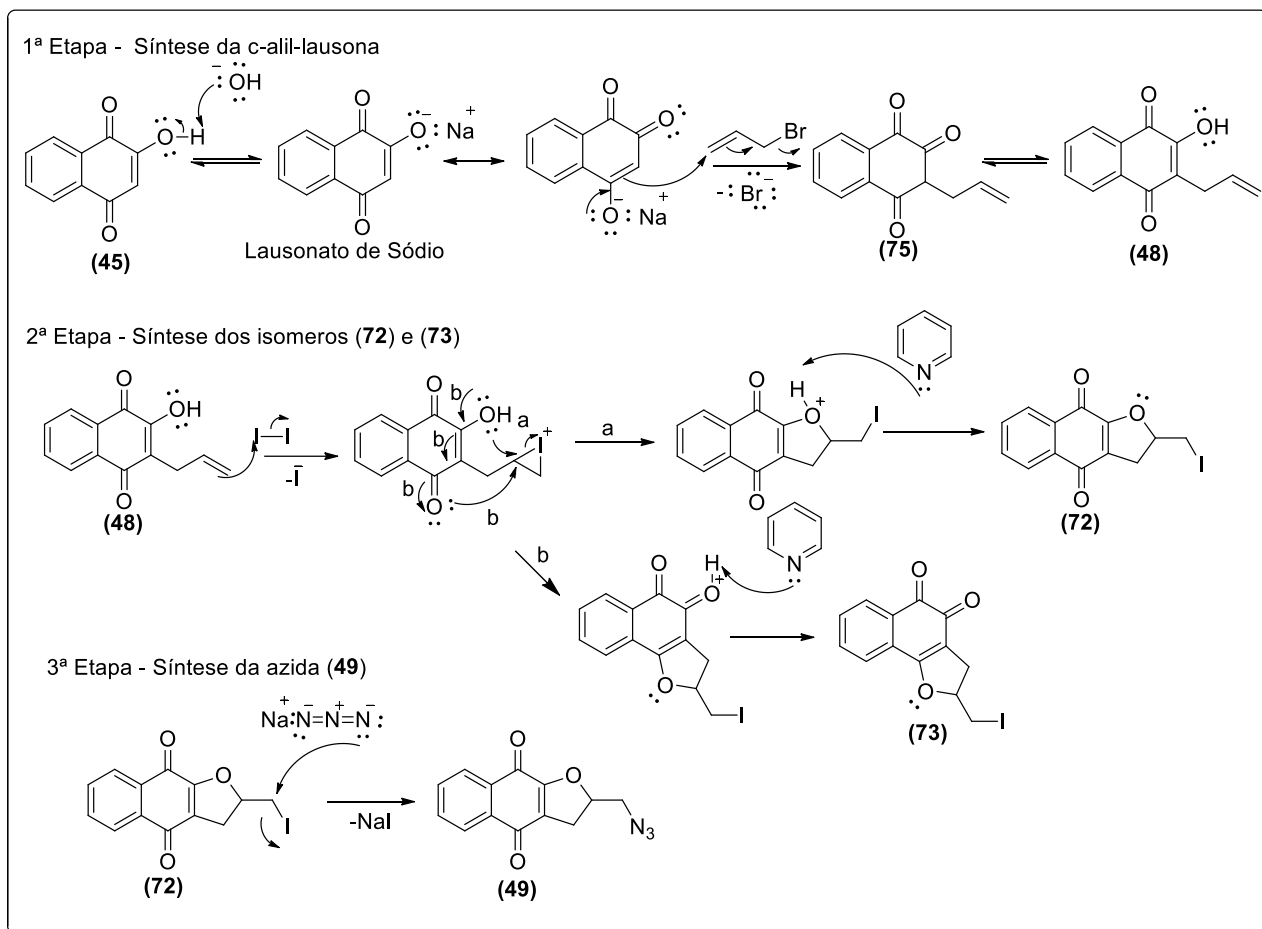
A azida (49), também derivada da lausona (45), foi obtida em 3 etapas. A primeira etapa consistiu na obtenção da C-alil-lausona (2-hidroxi-4-alil-1,4-naftoquinona) (48). Para isso a lausona (45) foi inicialmente tratada com NaOH em etanol formando o lausonato de sódio, que posteriormente reagiu com brometo de alila em água, levando ao produto desejado (48) com baixo rendimento (46%). Este baixo rendimento é devido principalmente à formação do subproduto de O-alkilação, em que o oxigênio age como nucleófilo atacando o brometo de alila. Na etapa seguinte a C-alil-lausona (48) reagiu com iodo molecular em diclorometano, na presença de piridina, formando os derivados iodados (72) e (73). Após separação por cromatografia em coluna, o derivado iodado (72) foi tratado com azida de sódio em DMF levando à formação da azida desejada (49) (Esquema 26).<sup>14,64</sup>



**Esquema 26:** Rota sintética para obtenção da azida (**49**)

A proposta mecanística para obtenção da azida (**49**) está representada no Esquema 27, sendo dividida em 3 etapas. Na primeira etapa o íon hidróxido abstrai o próton da hidroxila da lausona (**45**) formando o lausonato de sódio (**74**). Em seguida ocorre uma alilação deste nucleófilo multidentado com brometo de alila, passando por uma reação de substituição com eliminação do íon brometo e formação do intermediário tricarbonílico (**75**), que está em equilíbrio com sua forma enólica (**48**) representada pela C-alil-lausona. Na segunda etapa a C-alil-lausona (**48**) reage com excesso de  $I_2$ , havendo a adição de iodo à dupla ligação da cadeia lateral, formando o íon iodônio. Posteriormente o par de elétrons do oxigênio da carbonila ataca o íon iodônio, podendo fazê-lo por dois caminhos, a e b, sendo que o caminho a) leva à formação do intermediário iodado (**72**) e pelo caminho b) ocorre a formação de (**73**). A terceira etapa é uma reação de substituição nucleofílica do tipo  $S_N2$ , em que o íon azida ataca o carbono ligado ao iodo do intermediário (**72**), deslocando o íon iodeto e formando o produto de interesse, a azida (**49**).





**Esquema 27:** Proposta mecanística para obtenção da azida (49)

Todas as quatro azidas sintetizadas neste trabalho foram caracterizadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , e espectroscopia no infravermelho (IV). Os espectros no infravermelho e de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  destas azidas encontram-se no apêndice deste trabalho.

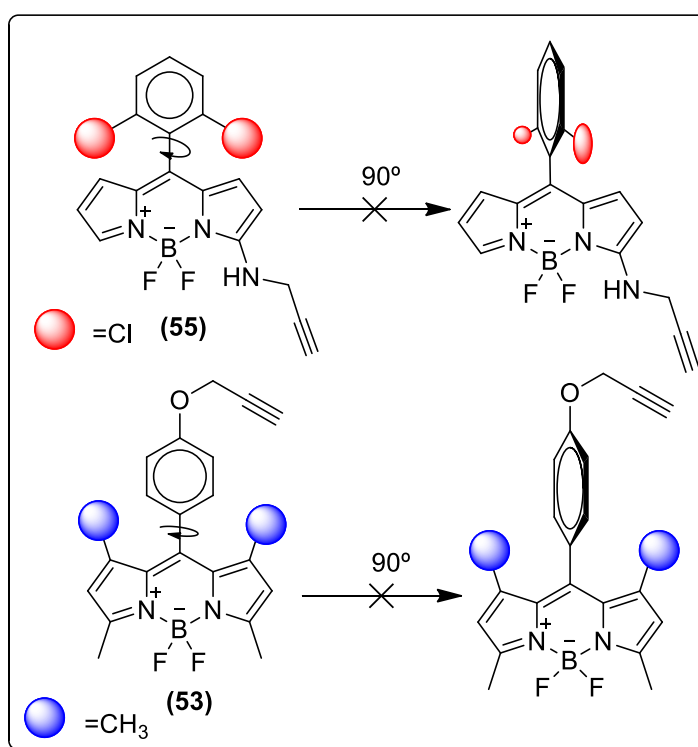
### 3.1.2. Síntese dos fluoróforos do tipo BODIPY

Posteriormente às sínteses das azidas, foi necessário a obtenção dos fluoróforos do tipo BODIPY contendo um alcino terminal em sua estrutura, a fim de realizar a reação “click” com propósito de obter derivados triazólicos naftoquinoidais luminescentes.

Utilizaram-se três BODIPYs diferentes, (53), (54) e (55) (Esquema 17, página 23). Os BODIPYs (54) e (55) não foram sintetizados em nosso grupo de pesquisa, e sim cedidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Flávio Emery, da Faculdade de Farmácia-USP de Ribeirão

Preto-SP. Já o BODIPY (**53**) foi sintetizado nesse trabalho. Mesmo não tendo sintetizado os BODIPYs (**54**) e (**55**), ao longo do texto será discutido a metodologia de síntese para os mesmos.

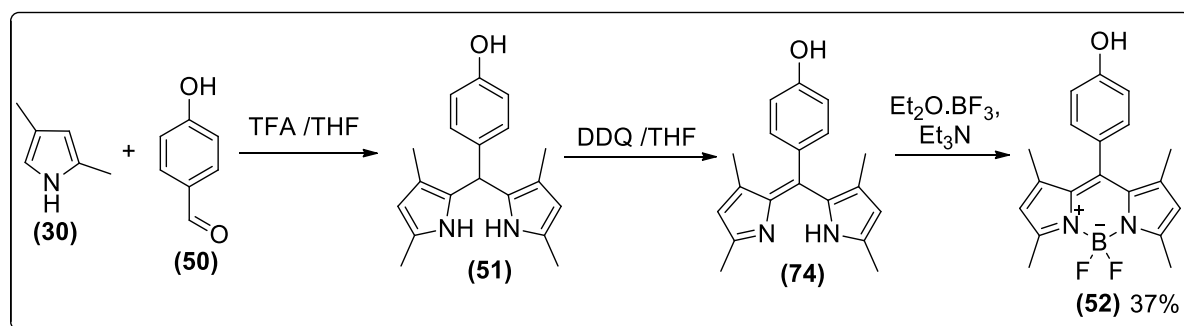
A escolha do BODIPY (**54**) como fluoróforo para realização deste trabalho, se deveu à disponibilidade do mesmo no grupo de pesquisa do Prof. Dr. Flávio Emery, e à facilidade de se inserir um alcino terminal em sua estrutura. Já os BODIPYs (**53**) e (**55**), além da facilidade de inserir o grupo alcino em suas estruturas, também foram escolhidos como fluoróforos devido às suas características estruturais, pois ambos possuem grupos volumosos em sua estrutura que impedem a rotação livre da unidade fenólica (Esquema 28), tornando assim a estrutura da molécula mais rígida e plana, características que favorecem os mecanismos de relaxação radioativos.<sup>41</sup> Como citado na introdução desse trabalho, compostos fluorescentes que possuem tais características tendem a ter propriedades fotofísicas notáveis, como maiores rendimentos quânticos e intensidade de brilho apreciável, o que possibilita modificações em suas estruturas sem ocasionar a atenuação total da sua luminescência.



**Esquema 28:** Impedimento estérico dos grupos volumosos impedindo rotação livre da porção fenila nos BODIPYS (**55**) e (**53**)

<sup>41</sup> Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence*; 3 ed.; Springer: Maryland, 2010

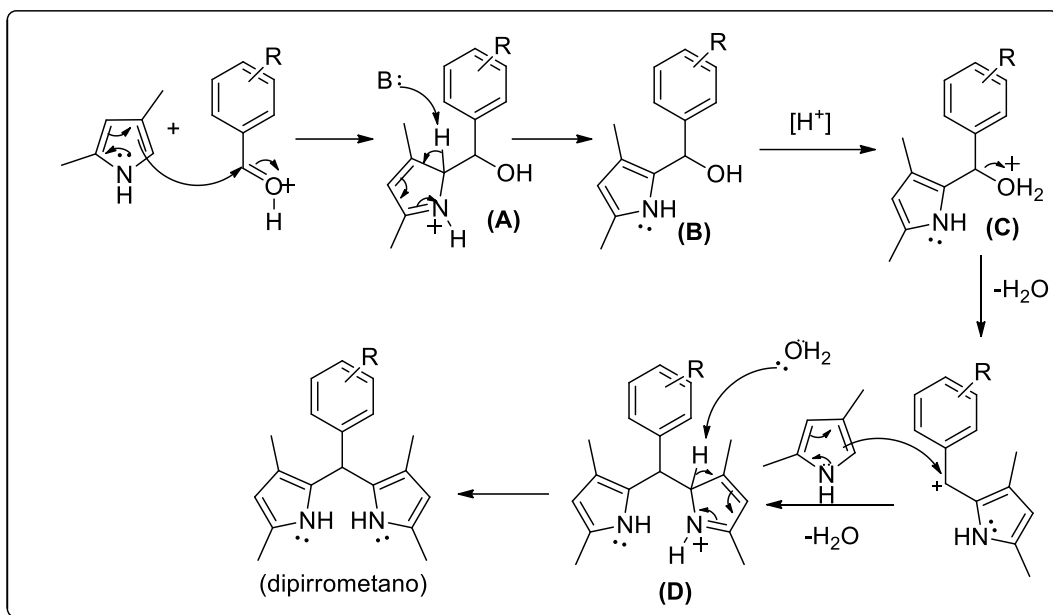
Primeiramente foi realizada a síntese do BODIPY (**52**), em uma reação do tipo *one-pot*, em que o esqueleto da molécula BODIPY foi construído em uma única reação, sem a necessidade de purificações dos intermediários formados. Nesta síntese, o 2,4-dimetilpirrol (**30**) e o 4-hidroxibenzaldeído (**50**) foram tratados com gotas de ácido trifluoroacético (TFA) em THF para formação do dipirrometano (**51**) através de uma reação de condensação. Em seguida, no mesmo meio reagente, adicionou-se o agente oxidante, neste caso o DDQ, para obtenção do dipirrometeno (**74**). Finalmente acrescentou-se Et<sub>2</sub>O.BF<sub>3</sub> e trietilamina à reação, proporcionando a formação de (**52**) com 37% de rendimento após purificação (Esquema 29).<sup>42</sup>



**Esquema 29:** Rota sintética para obtenção do **BODIPY (52)**

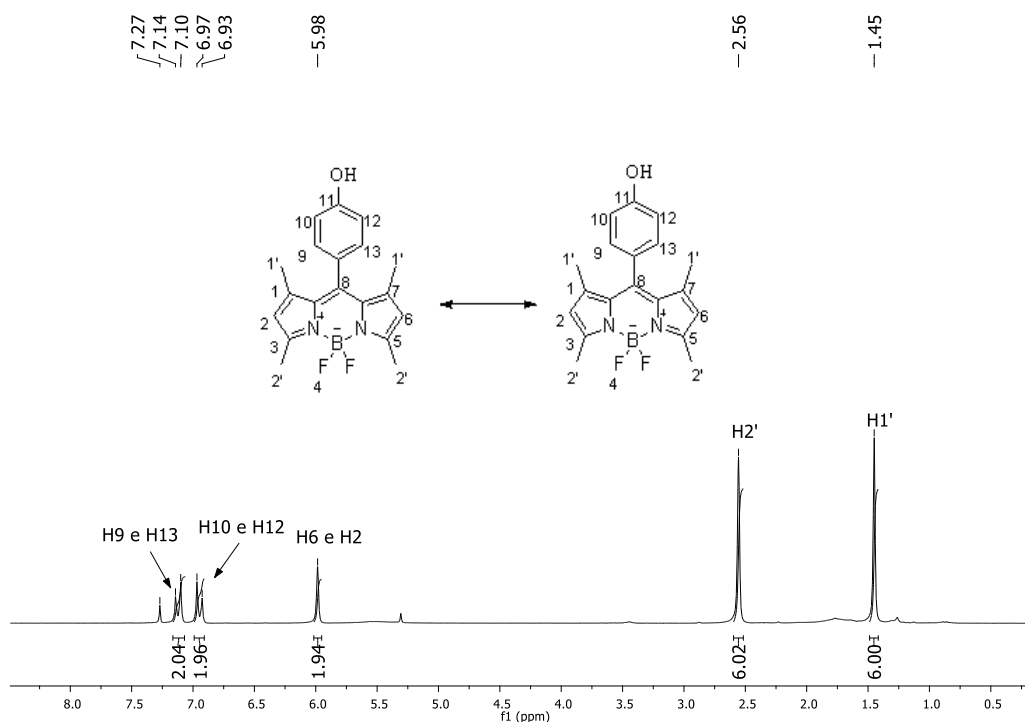
O mecanismo de condensação proposto para obtenção do dipirrometano se inicia com o ataque dos elétrons da dupla ligação do pirrol à carbonila ativada do aldeído, formando o intermediário (**A**) o qual sofre uma reação ácido-base para rearomatização, levando ao álcool (**B**). Este então é protonado devido ao meio ácido, formando o cátion (**C**) e pela a perda de uma molécula de água ocorre a formação do carbocátion benzílico, que é estabilizado por ressonância. Então uma segunda molécula de pirrol ataca o carbocátion benzílico levando ao intermediário (**D**). Nova rearomatização acontece no meio, formando o produto desejado (Esquema 30).

<sup>42</sup>Guo, H., Jing, Y., Yuan, X., Ji, S., Zhao, J., Li, X., & Kan, Y., Highly selective fluorescent OFF-ON thiol probes based on dyads of BODIPY and potent intramolecular electron sink 2, 4-dinitrobenzenesulfonyl subunits. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (10), 3844-3853.



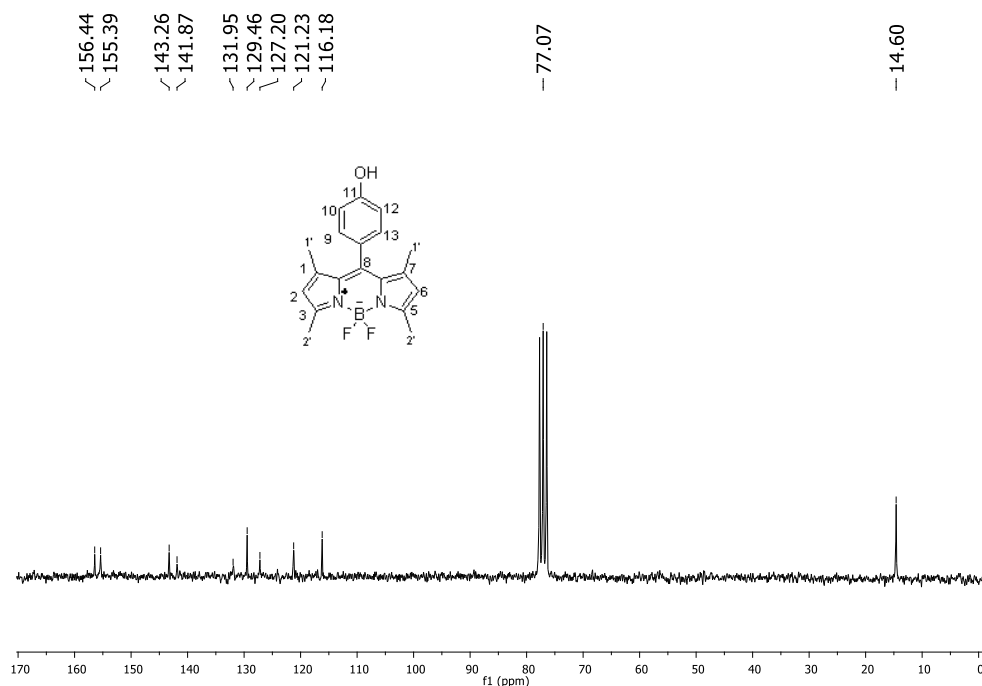
**Esquema 30:** Proposta mecanística para obtenção do dipirrometano

A caracterização do BODIPY (**52**) foi feita por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura.<sup>42</sup> No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , apresentado na Figura 8, observam-se dois simpletos, em  $\delta$  1.45 ppm e em  $\delta$  2.56 ppm, integrados para seis hidrogênios cada um, referentes aos hidrogênios H1' e H2', respectivamente. Há também um simpleto em  $\delta$  5.98 ppm integrado para dois hidrogênios, referentes a H2 e H6. Na região entre  $\delta$  7,2 e  $\delta$  6.8 ppm observam-se dois dupletos ( $^3J = 8$  Hz), integrados para dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios aromáticos.



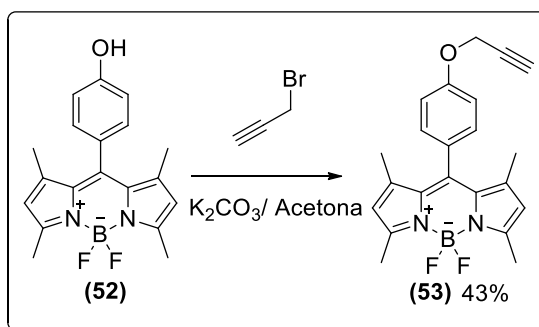
**Figura 8:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do **BODIPY (52)** ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz)

Já no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , apresentado na Figura 9, observa-se em  $\delta$  14.6 ppm o sinal referente aos carbonos das metilas ( $\text{C1}'$  e  $\text{C2}'$ ). Os demais sinais apareceram com valores de deslocamento químico acima de 100 ppm, região característica de carbonos  $\text{sp}^2$  e carbonos aromáticos. Pode-se observar que o número de sinais apresentados no espectro é menor que o número total de carbonos constituintes da molécula, isso podendo ser explicado devido à simetria do composto, que apresenta carbonos quimicamente equivalentes em sua estrutura.



**Figura 9:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do **BODIPY (52)** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

Após sintetizar o **BODIPY (52)**, realizou-se então a reação para inserir o grupo alcino à sua estrutura, via eterificação de Williamson clássica. O **BODIPY (52)** foi então tratado com carbonato de potássio e brometo de propargila em acetona, levando à formação do **BODIPY alcino (53)** com 43% de rendimento, após purificação (Esquema 31).<sup>43</sup>

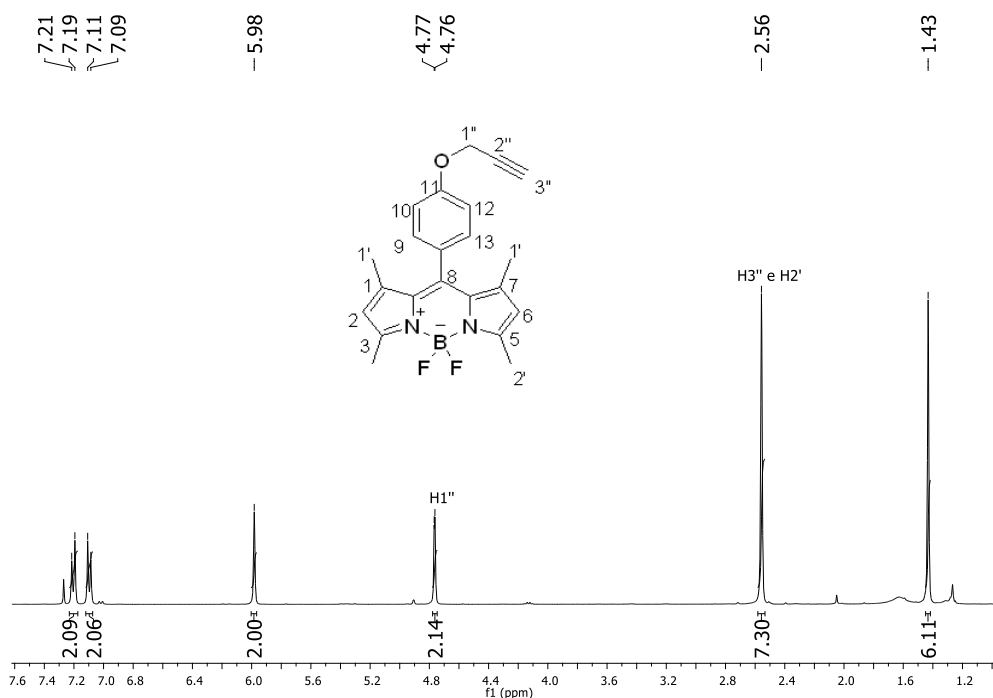


**Esquema 31:** Síntese do **BODIPY (53)**

A caracterização do **BODIPY (53)** foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 10). Em relação ao material de partida, observou-se a presença de um

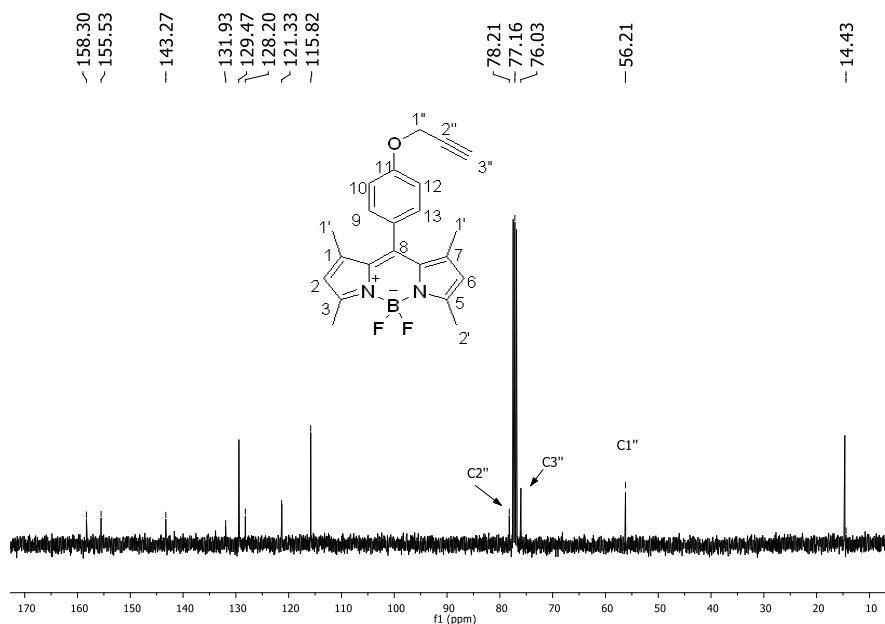
<sup>43</sup>Ke, M. R., Yeung, S. L., Ng, D. K., Fong, W. P., & Lo, P. C., Preparation and in vitro photodynamic activities of folate-conjugated distyryl boron dipyrromethene based photosensitizers. *J. Med. Chem.* **2013**,56 (21), 8475-8483.

duplete em  $\delta$  4.77 ppm, integrado para dois hidrogênios, que foi atribuído ao sinal de H1''. Estes hidrogênios estão acoplado com H3'' com uma constante de acoplamento de  ${}^4J = 2\text{Hz}$ , sendo este pequeno valor da constante devido à distância dos hidrogênios, separados por 4 ligações. Outro sinal que deve ser destacado é o simpleto em  $\delta$  2.56 ppm pois ele aparece integrado agora para 7 hidrogênios, sendo seis hidrogênios referentes aos metílicos H2' e o outro é referente ao hidrogênio do alcino H3'', o que comprova a *O*-alquilação do derivado BODIPY.



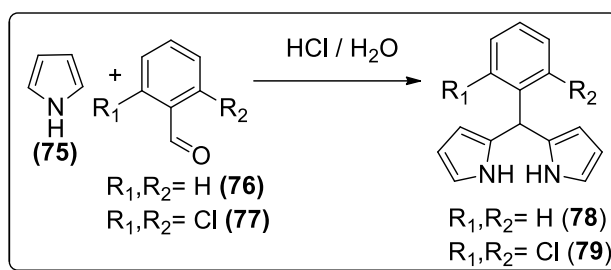
**Figura 10:** Espectro de RMN de  ${}^1\text{H}$  do composto (**53**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

No espectro de RMN de  ${}^{13}\text{C}$  (Figura 11) observa-se, em relação ao material de partida, a presença em  $\delta$  56.2 ppm de um sinal referente ao carbono C1''. Já em  $\delta$  76.0 ppm e  $\delta$  78.2 ppm aparecem sinais referentes aos carbonos do grupo alcino presente na molécula.



**Figura 11:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (**53**) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

Os BODIPYs (**54**) e (**55**) foram obtidos no laboratório do Professor Flávio Emery a partir do pirrol (**75**) e dos aldeídos aromáticos (**76**) e (**77**). Primeiramente foi realizada uma reação de condensação, catalisada por ácido clorídrico e utilizando água como solvente, obtendo-se os dipirrometanos (**78**) e (**79**) (Esquema 32).<sup>44</sup>



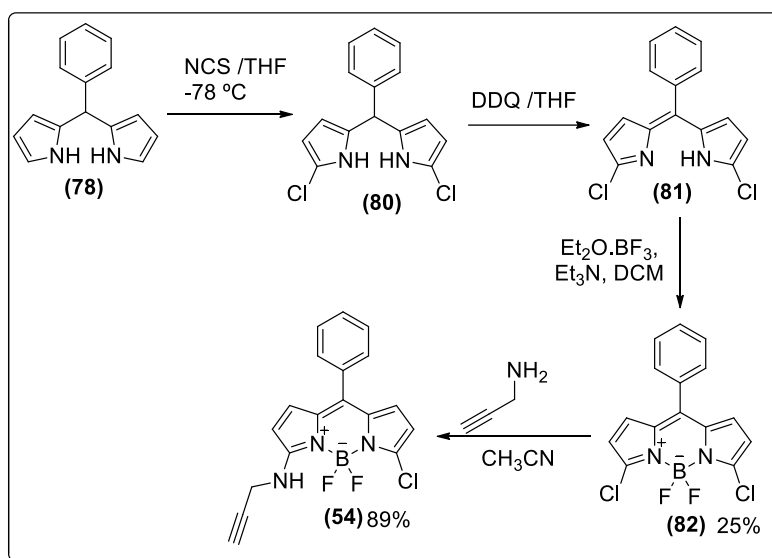
**Esquema 32:** Síntese de dipirrometanos (**78**) e (**79**)

Posteriormente o dipirrometano (**78**) foi tratado com N-clorossuccinimida em THF à -78 °C, a fim de se obter o derivado diclorado (**80**) (Esquema 33). Este, na presença de DDQ, sofreu uma reação de oxidação formando o dipirrometeno (**81**). Sequencialmente (**81**) foi tratado com trietilamina e  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , levando à formação do BODIPY (**82**) com rendimento

<sup>44</sup>T. Rohand, E. Dolusic, T. H. Ngo, W. Maes, W. Dehaen., Efficient synthesis of aryldipyrromethanes in water and their application in the synthesis of corroles and dipyrromethenes. *Arkivoc.* **2007**, *10*, 307-324.



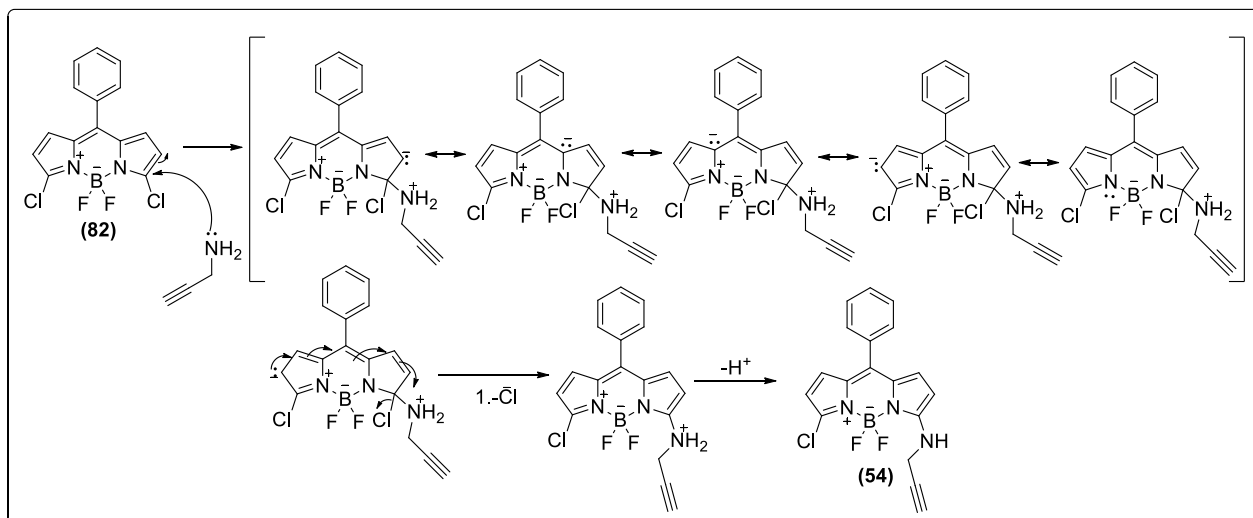
final de 25%. Finalmente, a partir do BODIPY (**82**), utilizando-se propargilamina em acetonitrila, por meio de uma reação de substituição nucleofílica aromática (S<sub>N</sub>Ar), obteve-se o BODIPY (**54**) contendo alcino terminal em sua estrutura, com 89% de rendimento (Esquema 33).<sup>45</sup>



**Esquema 33:** Síntese do BODIPY (**54**)

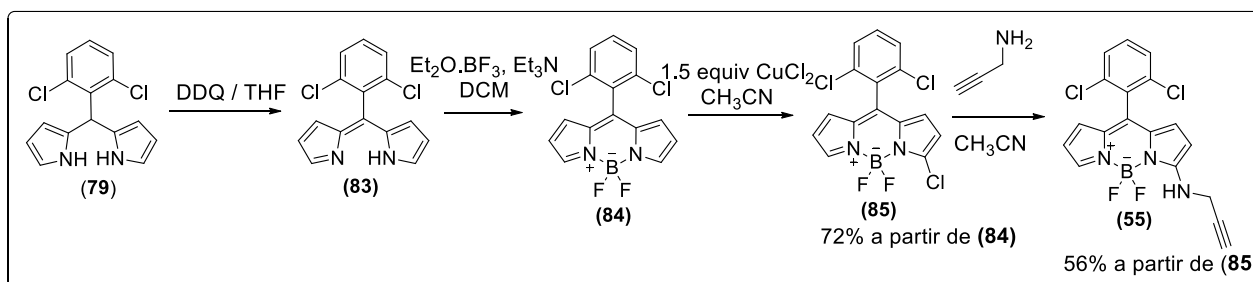
O mecanismo da reação proposto para obtenção do BODIPY alcino (**54**) está representado no Esquema 34. A propargilamina, agindo como nucleófilo, ataca o carbono ligado ao cloro, formando um intermediário carbânion que é altamente estabilizado por ressonância (analogia ao Complexo de Mensenheimer formado durante as reações de Substituição Nucleofílica Aromática), e em seguida o cloro é eliminado, restituindo a aromaticidade do composto.

<sup>45</sup>T. Rohand, M. Baruah, W. Qin, N. Boens, W. Dehaen., Functionalisation of fluorescent BODIPY dyes by nucleophilic substitution. *Chem. Commun.* **2006**, 266, 266-268.



**Esquema 34:** Proposta mecanística para síntese do BODIPY alcino (54)

Na síntese do BODIPY (55), após a obtenção do dipirrometano (79), este foi oxidado a dipirrometeno (83), utilizando DDQ como agente oxidante. Em seguida (83) foi tratado com BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O e trietilamina para formar o BODIPY (84).<sup>46</sup> Posteriormente foi realizada a  $\alpha$ -cloração do BODIPY (84), utilizando-se a metodologia descrita por Zhou e colaboradores,<sup>46</sup> na qual o composto (84) foi tratado com cloreto de cobre (CuCl<sub>2</sub>), utilizando como solvente acetonitrila, para obtenção do derivado monoclorado (85). Finalmente este foi tratado com propargilamina em acetonitrila, levando à formação do BODIPY (55) (Esquema 35).



**Esquema 35:** Rota sintética para obtenção do BODIPY (55)

<sup>46</sup>X. Zhou, C. Yu, Z. Feng, Y. Yu, J. Wang, E. Hao, Y. Wei, X. Mu, L. Jiao., Highly Regioselective  $\alpha$ -Chlorination of the BODIPY Chromophore with Copper(II) Chloride. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4632-4635

### 3.1.3. Síntese e caracterização dos triazóis naftoquinoidais contendo fluoróforos BODIPYs

Após ter sintetizado as azidas derivadas das naftoquinonas e os alcinos derivados dos BODIPYs, foi realizada a conexão destes derivados através da reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I), levando à formação de anéis triazólicos-1,4-dissubstituídos.

A reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por espécies de Cu(I) é uma estratégia de síntese bastante difundida na área da química orgânica sintética, por ser uma metodologia simples que possibilita a conexão de duas moléculas através da formação de anéis triazólicos. Este tipo de metodologia sintética ficou conhecida como reação “click”, conceito introduzido por Sharpless em 2001. Segundo Sharpless, para ser considerada uma química “click”, a reação deve ser rápida, estereoespecífica, gerar subprodutos inofensivos que possam ser retirados do meio reagente sem necessidade de métodos cromatográficos. Além de todas estas características citadas, reações “click” segundo Sharpless, deveriam ser realizadas sem uso de solvente, ou que estes sejam atóxicos e inofensivos.<sup>47,48</sup>

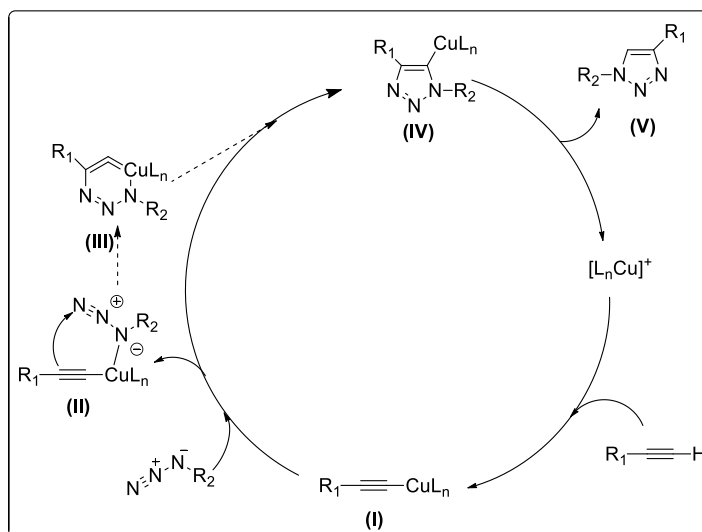
Esta reação foi bastante estudada por Sharpless e colaboradores, e em 2002 eles criaram a primeira proposta mecanística para a reação de cicloadição, que está representado no Esquema 36. Primeiramente ocorre a formação do acetileto de cobre (**I**), através da complexação do Cu(I) com alcino terminal. Em seguida a azida se coordena ao cobre, formando a espécie (**II**), favorecendo o ataque do carbono do acetileto ao nitrogênio eletrofílico da azida formando o intermediário (**III**) que, após sofrer um rearranjo, é convertido em um novo intermediário cíclico de 5 membros (**IV**). Posteriormente ocorre uma eliminação redutiva, originando o composto triazólico (**V**) e liberando o catalisador para o meio reacional<sup>49</sup>

---

<sup>47</sup>de Oliveira Freitas, L. B., Ruela, F. A., Pereira, G. R., Alves, R. B., de Freitas, R. P., & dos Santos, L. J., A reação “click” na síntese de 1, 2, 3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Quim. Nov.* **2011**, *34*(10), 1791-1804.

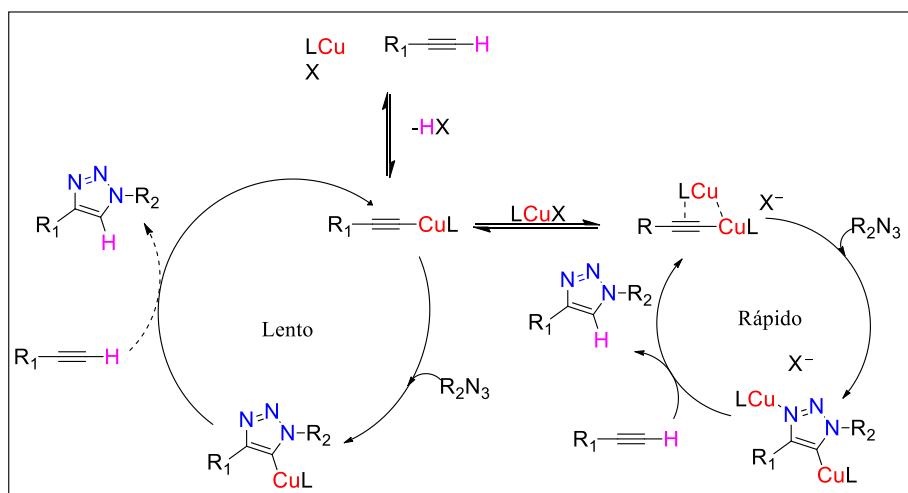
<sup>48</sup> Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Click Chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

<sup>49</sup>Rostovtsev, V. V.; Green, G. L.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; A Stepwise HuisgenCycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int.* **2002**, *41*, 2596-2599.



**Esquema 36:** Mecanismo da cicloadição catalisada por Cu (I) proposto por Sharpless em 2002<sup>48</sup>

Este mecanismo foi estudado ao longo dos anos, sofrendo algumas modificações. Recentemente, em 2015, foi proposto que o mecanismo desta reação ocorre pela união de dois ciclos catalíticos, um lento, que seria a formação do acetileto de cobre, e um, que acontece com a formação de uma espécie dinuclear de cobre, favorecida cineticamente. Neste caso o cobre é eliminado devido à interação com outro alcino, gerando um novo complexo dinuclear (Esquema 37).<sup>50</sup>

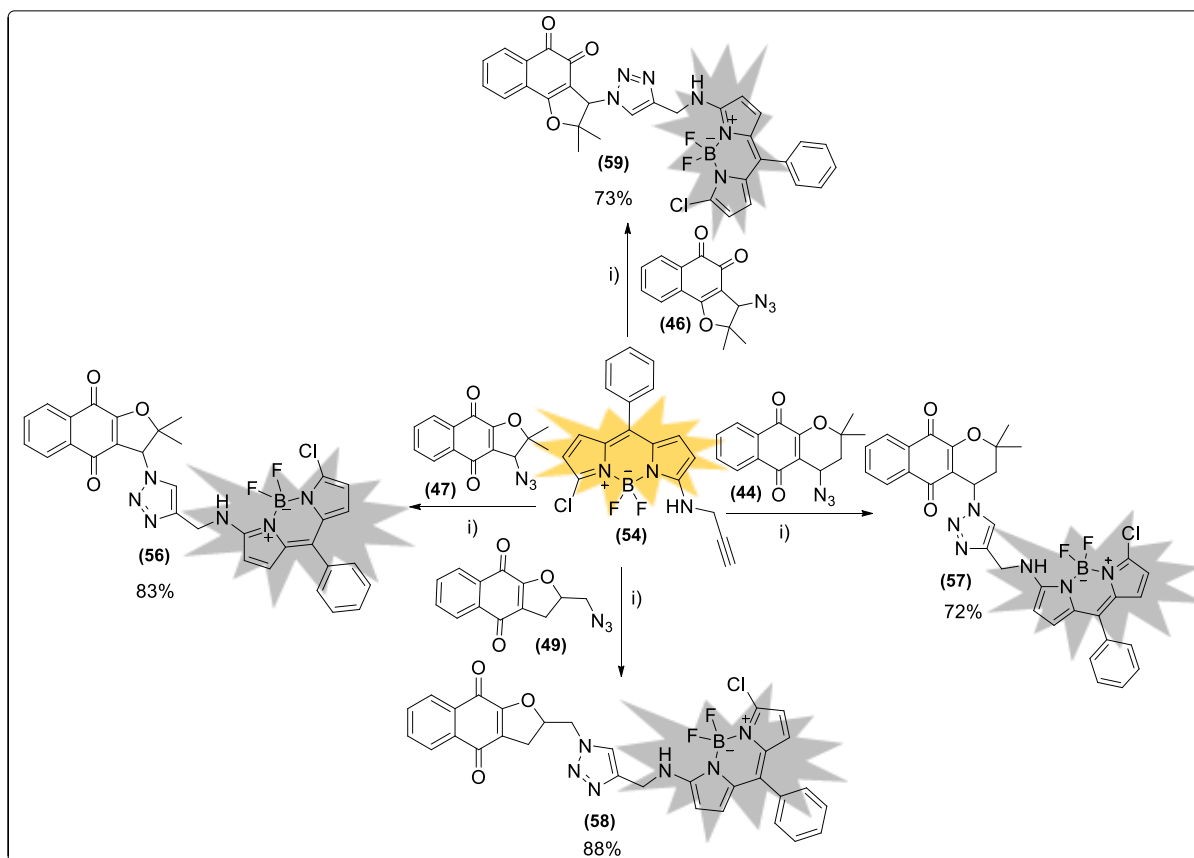


**Esquema 37:** Mecanismo da reação “click” mostrando o ciclo lento (*via* acetileto de cobre) e o rápido (com intermediário dinuclear) (Adaptado da referência 50)

<sup>50</sup> Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G., Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne “click reaction”. *Sci. Adv.* **2015**, *1*,1-5.

Na reação do tipo “click” para acoplamento das naftoquinonas aos compostos BODIPYs, foi utilizado sal de Cu(I), o iodeto de cobre CuI, e acetonitrila como solvente da reação, não sendo necessário a geração de Cu(I) *in situ* por agentes redutores, uma outra forma usual de processar esta reação.<sup>51</sup>

Primeiramente foram sintetizados os triazóis inéditos **56-59** (Esquema 38), utilizando o BODIPY (**54**) como fluoróforo. Esperava-se que os triazóis formados apresentassem propriedades luminescentes devido à presença do BODIPY em sua estrutura, porém nenhum deles apresentou tal característica, ocorrendo o fenômeno de atenuação da luminescência conhecido como “quenching”, inviabilizando futuros estudos de localização subcelular para estes derivados.



**Esquema 38:** Obtenção dos triazóis não luminescentes **56-59** a partir do BODIPY (**54**).

i) CuI/CH<sub>3</sub>CN

<sup>51</sup> Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2952–3015.

Mesmo não sendo possível planejar estudos de marcação subcelular com os triazóis sintetizados, estes foram avaliados frente a diferentes células tumorais, para avaliação de citotoxicidade. Os resultados dos testes mostraram que apenas o triazol (**59**), obtido a partir da 3-azido-*nor*- $\beta$ -lapachona (**46**), foi ativo contra algumas linhagens de células tumorais. Os resultados destes testes serão apresentados e discutidos com mais detalhes no tópico 3.3 (página 65).

Os triazóis **56-59** foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia no IV e espectrometria de massas. Serão discutidos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  apenas dos compostos (**59**) e (**57**), sendo os espectros dos demais triazóis apresentados no Apêndice deste trabalho.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (**59**) (Figura 12) podem-se observar dois simples em  $\delta$  1.17 e  $\delta$  1.77 ppm, integrados para 3 hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios metílicos H1'' e H2''. Em  $\delta$  4.74 ppm há um duplete ( $^3J_{\text{NH}}=4,4$  Hz) integrado para 2H, que pode ser atribuído ao hidrogênios metilênicos H2' e em  $\delta$  6.0 ppm observa-se um simpleto, integrado para 1H, atribuído ao H3. Na região acima de  $\delta$  7.0 ppm aparecem sinais, dupletos e multipletos, referentes ao hidrogênios aromáticos da molécula. Já na região entre  $\delta$  6.0 e  $\delta$  7.0 ppm aparecem sinais referentes aos hidrogênios pirrólicos e ao NH. Estes dados confirmam a junção das duas sub-unidades via formação do núcleo triazólico.

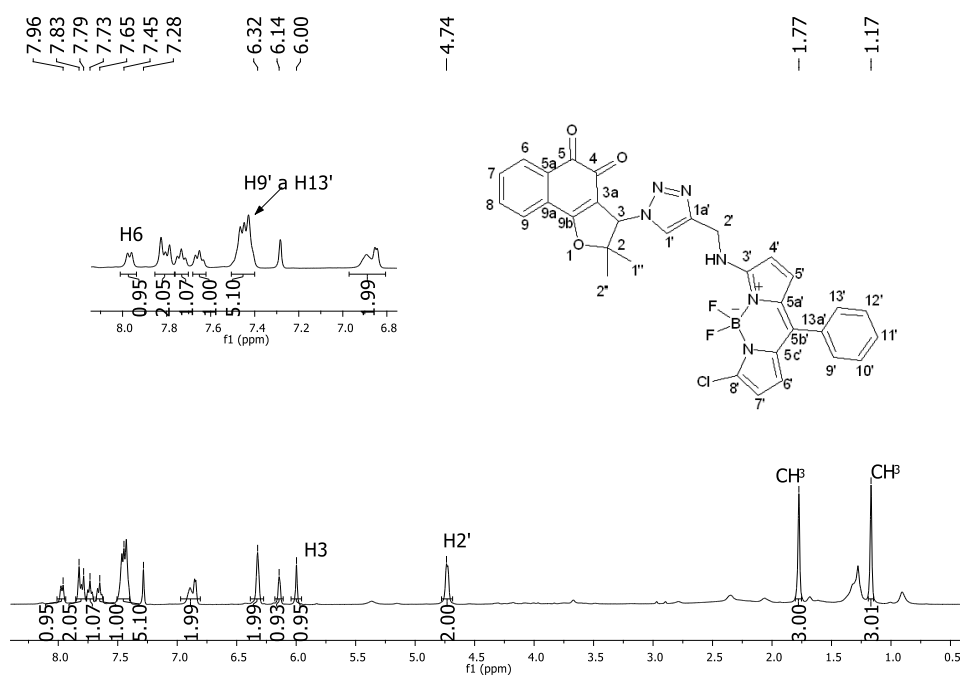
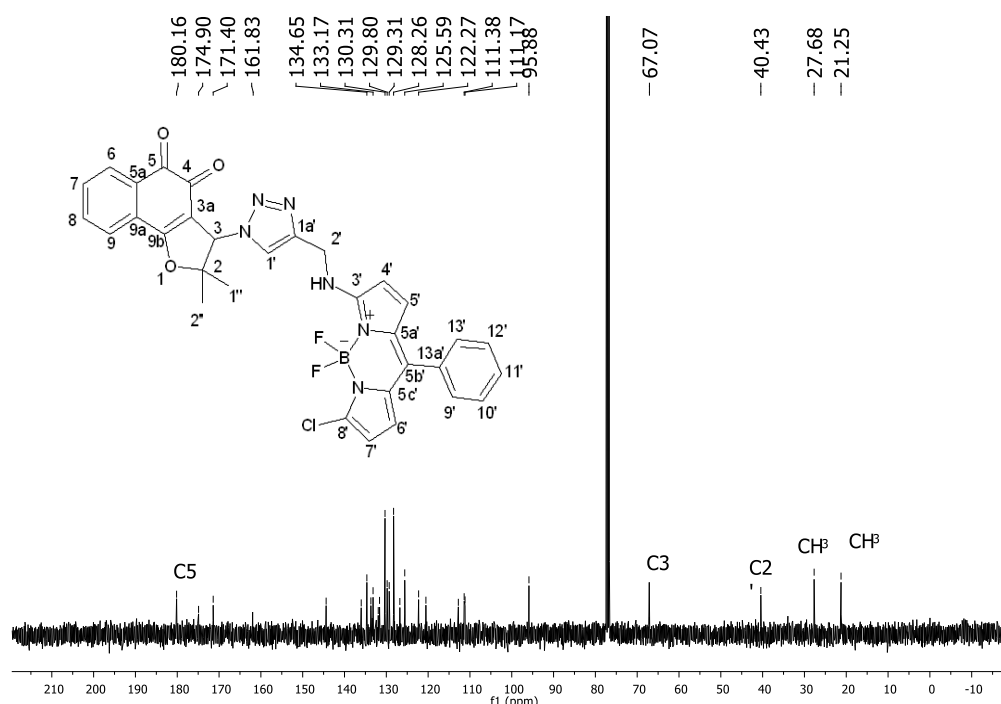


Figura 12: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (**59**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

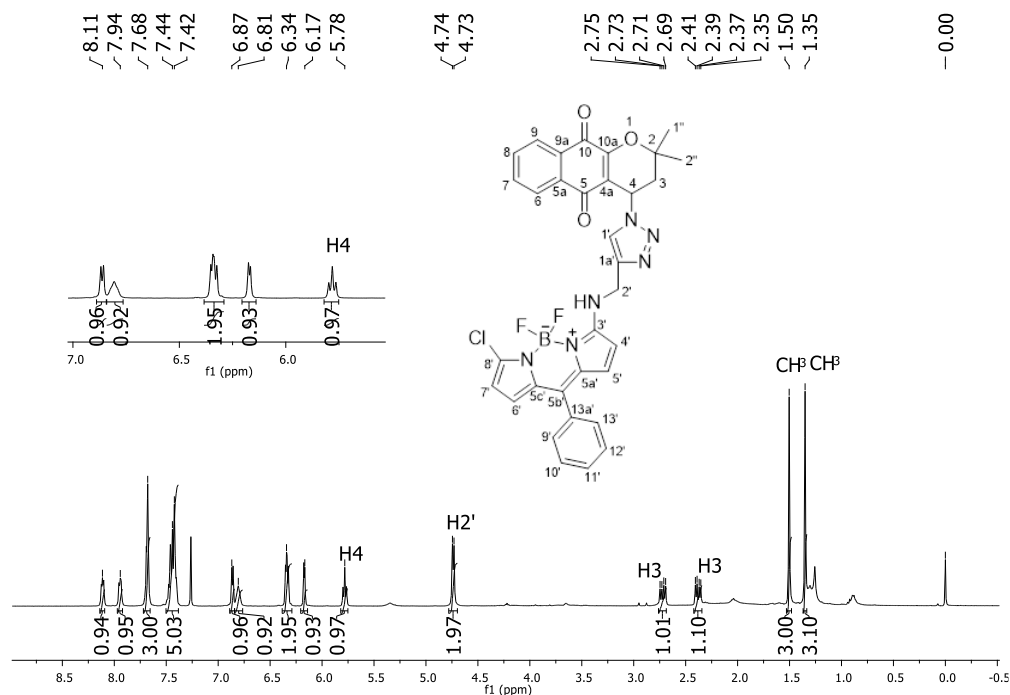
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (**59**) (Figura 13) observa-se em  $\delta$  180.1 ppm um sinal com deslocamento típico para carbono de carbonila de cetona conjugada, sendo o mesmo atribuído à carbonila C5, e o sinal em  $\delta$  174.9 ppm pode ser atribuído a outra carbonila constituinte da molécula (C4). Os sinais em  $\delta$  95.9 ppm e  $\delta$  67.0 ppm podem ser atribuídos aos carbonos C2 e C3, respectivamente. Os carbonos metílicos resultaram em sinais em  $\delta$  21.5 ppm e  $\delta$  27.7 ppm e o carbono metilênico (C2') em  $\delta$  40.4 ppm.



**Figura 13:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (**59**) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (**57**) (Figura 14) observam-se os sinais dos hidrogênios metílicos H1'' e H2'' em  $\delta$  1.35 ppm e  $\delta$  1.50 ppm, sendo os mesmos simples integrados para 3H. Em  $\delta$  2.40 ppm e  $\delta$  2.72 aparecem sinais, na forma de dupletos duplo, ( $^2J = 14.6$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz) referentes aos hidrogênios diastereotópicos H3. O sinal do H4 está representado na forma de um triplo em  $\delta$  5.78, ( $^3J = 6,6$  Hz) sendo que H4 acopla com os dois hidrogênios diastereotópicos H3, o que explica o sinal na forma de um triplo. Os sinais que aparecem acima de  $\delta$  7.26 ppm são referentes aos hidrogênios aromáticos da molécula. Já na região de  $\delta$  6.00 ppm a  $\delta$  7.00 ppm estão os sinais referentes aos hidrogênios dos dois anéis pirrólicos presentes no composto e do hidrogênio ligado ao nitrogênio. Estes dados

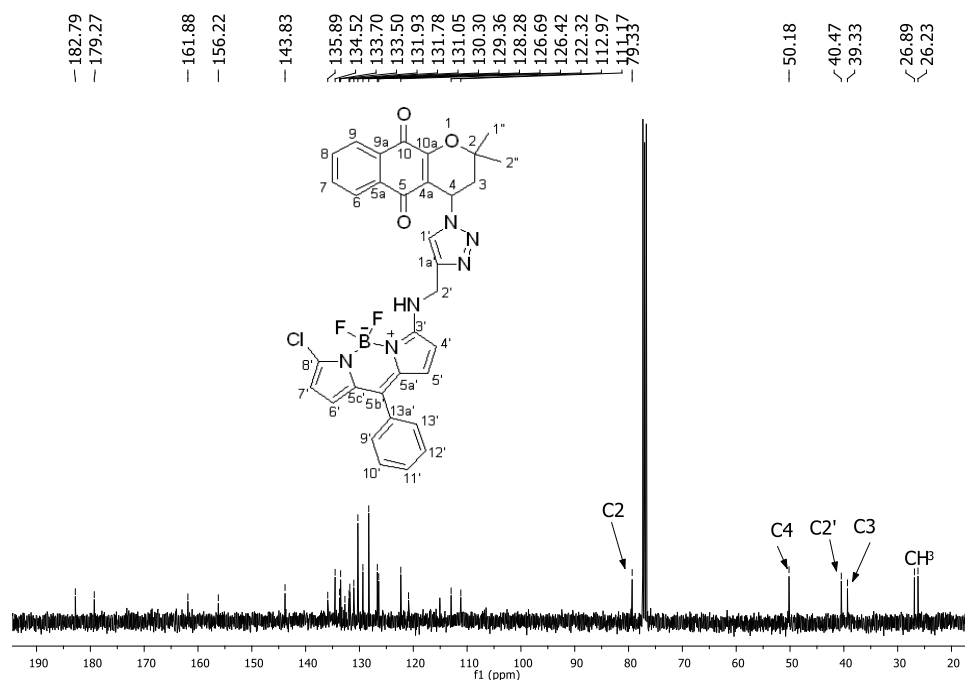
confirmam o acoplamento das duas sub-unidades-naftoquinona e núcleo BODIPY- via formação do núcleo triazólico.



**Figura 14:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto (**57**) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

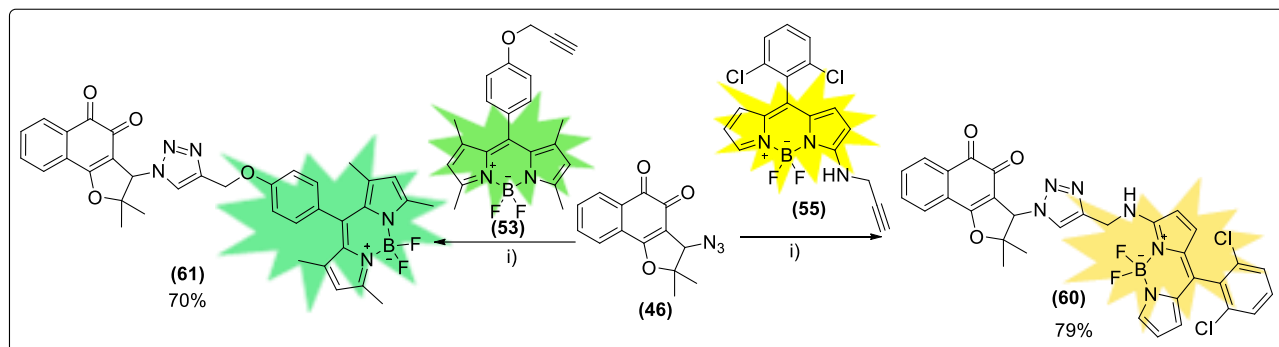
Na Figura 15 está representado o espectro de RMN de <sup>13</sup>C do composto (**57**), no qual podem-se observar os sinais referentes aos carbonos metílicos em  $\delta$  26.2 ppm e  $\delta$  26.9 ppm. Já os carbonos metilênicos C3 e C2' resultam em sinais em  $\delta$  30.3 ppm e  $\delta$  40.5 ppm, respectivamente. O sinal do carbono C4, ligado ao anel triazólico, possui deslocamento químico de 50.2 ppm, e o sinal do carbono quaternário C2, ligado ao oxigênio, aparece em  $\delta$  79.3 ppm. Os sinais em  $\delta$  182.8 ppm e  $\delta$  179.3 ppm, os mais desblindados do espectro, são referentes às duas carbonilas da molécula.





**Figura 15:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **(57)** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

Além dos triazóis **56-59**, foram sintetizados também os triazóis **(60)** e **(61)** (Esquema 39). Considerando que apenas o triazol **(59)**, derivado da 3-azido-nor- $\beta$ -lapachona **(46)**, foi ativo contra linhagens de células tumorais, planejou-se então a síntese desses novos triazóis **(60)** e **(61)** (Esquema 39), a partir desta mesma azida **(46)** e dos BODIPYs **(53)** e **(55)** (Esquema 17, página 23). A expectativa era de que, ao se utilizar novos BODIPYs com restrição conformacional, se pudesse obter compostos que fossem citotóxicos (visto que se estava utilizando uma naftoquinona citotóxica) e luminescentes. Após a síntese observou-se que realmente os produtos **(60)** e **(61)** apresentavam propriedades luminescentes, diferente dos outros triazóis sintetizados, o que tornaria possível a realização de estudos de localização subcelular para estes compostos.



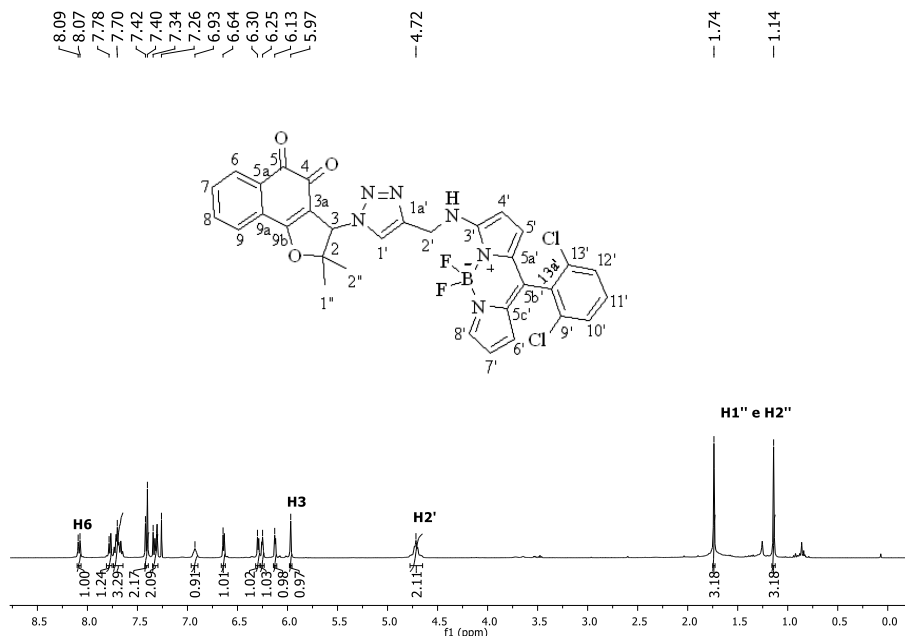
**Esquema 39:** Síntese dos triazóis luminescentes **(60)** e **(61)**. i) CuI/CH<sub>3</sub>CN

A luminescência conferida aos triazóis **(60)** e **(61)** pode ser explicada com base nas propriedades fotofísicas dos BODIPYs **(53)** e **(55)** utilizados. Como citado anteriormente, a presença de grupos volumosos na estrutura deste BODIPYs favorece mecanismos de relaxação radioativos. Consequentemente estes seriam mais luminescentes e apresentariam rendimento quântico maiores, tornando mais difícil a atenuação total da sua luminescência intrínseca após o acoplamento, em suas estruturas, de compostos com propriedades de provocar o fenômeno “quenching” em fluoróforos, como é o caso dos compostos quinoidais.<sup>23,24</sup>

A caracterização dos compostos **(60)** e **(61)** foi realizada através de técnicas de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, experimentos bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC, bem como espectrometria de massas e espectroscopia no infravermelho.

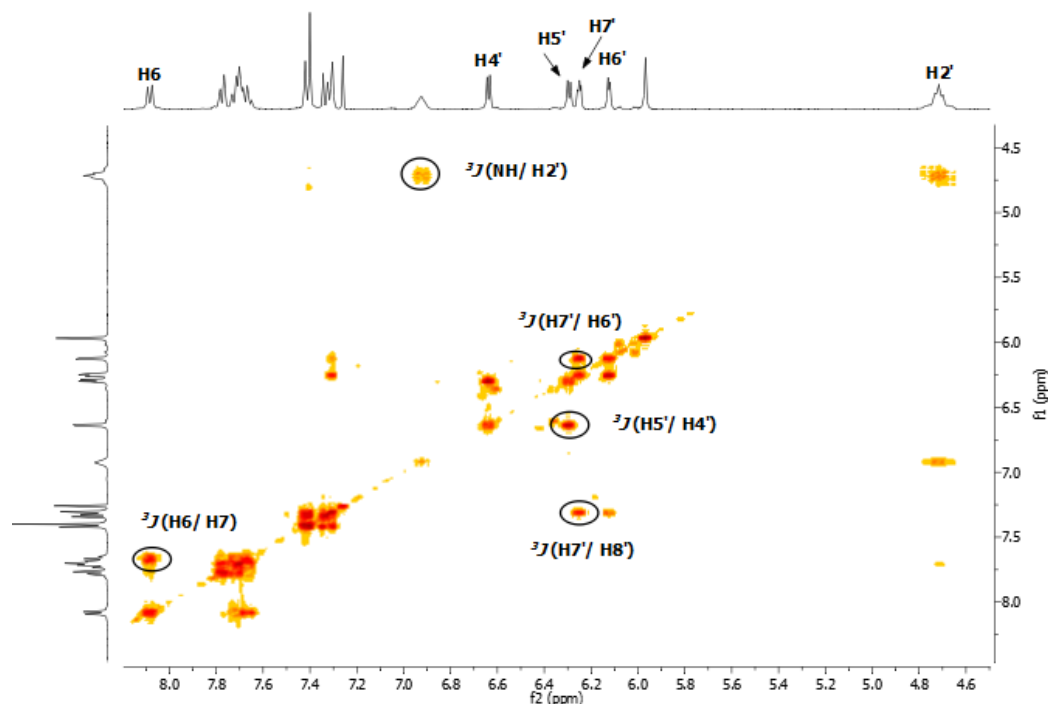
Na Figura 16 está representado o espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **(60)**, no qual pode-se observar em  $\delta$  1.14 ppm e  $\delta$  1.74 ppm dois simpletos, integrados para 3H cada, atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos das metilas H1'' e H2''. O sinal mais desblindado no espectro, em  $\delta$  8.08 ppm, na forma de um duplete (<sup>2</sup>J= 7.6 Hz), pode ser atribuído ao H6, sendo este mais desblindado devido à proximidade à carbonila (C5). Na região dos hidrogênios aromáticos pode-se observar também um duplete em  $\delta$  7.41 ppm, integrado para 2H, referente aos hidrogênios H10' e H12', que são quimicamente equivalentes. Em  $\delta$  4.72 ppm aparece o sinal referente aos hidrogênios metilênicos H2', sendo essa atribuição confirmada pelo mapa de correlação COSY (Figura 17), onde observa-se a correlação deste sinal com o sinal NH, e também através do mapa de correlação HSQC (Figura 19) em que nota-se a correlação do mesmo sinal com o sinal em  $\delta$  40.5 ppm, referente ao carbono CH<sub>2</sub>.

Pode-se observar também o sinal simples em  $\delta$  5.97 ppm, integrado para 1H, referente ao hidrogênio H3.



**Figura 16:** Espectro de RMN de H do composto (**60**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

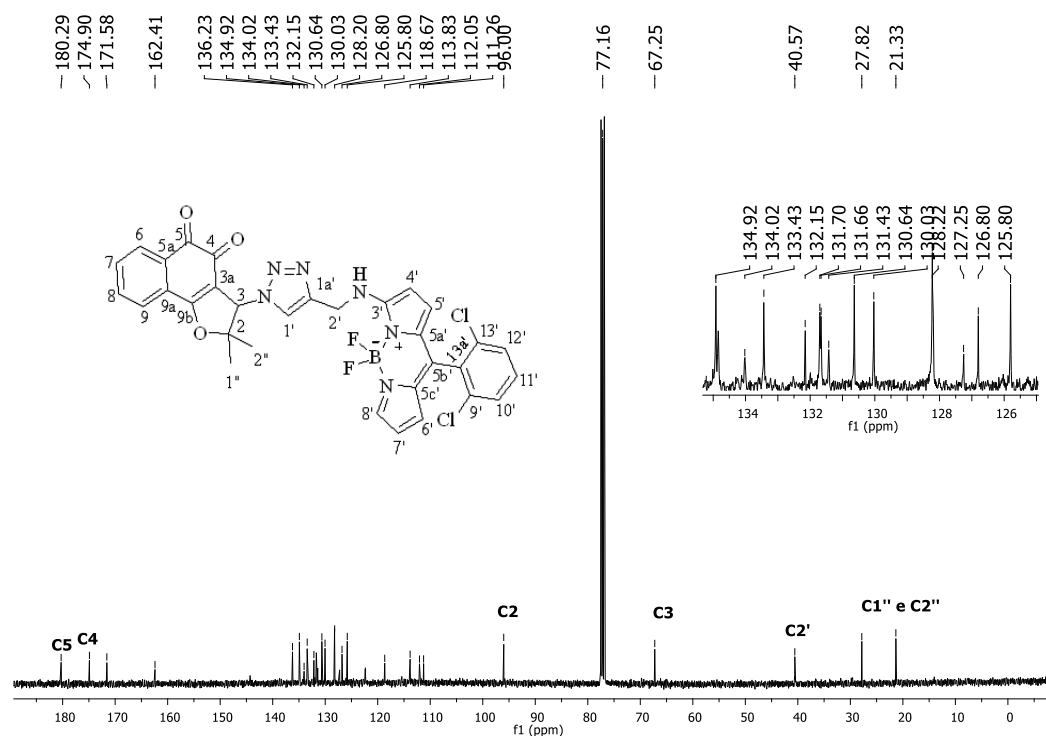
Os sinais referentes aos hidrogênios dos dois anéis pirrólicos, que fazem parte da molécula, podem ser observados na região de deslocamento químico entre 6 ppm e 7 ppm. O sinal de H8', devido ao fato do mesmo estar ligado a um carbono do tipo imina, aparece na região acima de 7 ppm, junto com os hidrogênios aromáticos. Através do mapa de correlação COSY (Figura 17), pode-se observar as correlações entre estes hidrogênios, o que facilitou a atribuição dos mesmos. Nota-se também uma correlação entre os sinais em  $\delta$  6.65 ppm e  $\delta$  6.31 ppm, e ambos os sinais apresentam apenas esta correlação logo, pela estrutura da molécula estes só podem ser atribuídos aos hidrogênios H4' e H5' respectivamente, sendo H4' mais desblindado por estar mais próximo do NH. É possível observar também as correlações do sinal tripleto ( $^3J = 3.6$  Hz) em  $\delta$  6.25 ppm com o sinal duplete ( $^3J = 3.6$  Hz), em  $\delta$  6.13 ppm e com o sinal de deslocamento químico acima de 7.00 ppm, H8'. A partir destas correlações pode-se atribuir o sinal em  $\delta$  6.25 ppm ao hidrogênio H7', que acopla com H8' e H6', e o sinal em  $\delta$  6.13 ppm ao hidrogênio H6'.



**Figura 17:** Mapa de correlação COSY do composto (**60**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

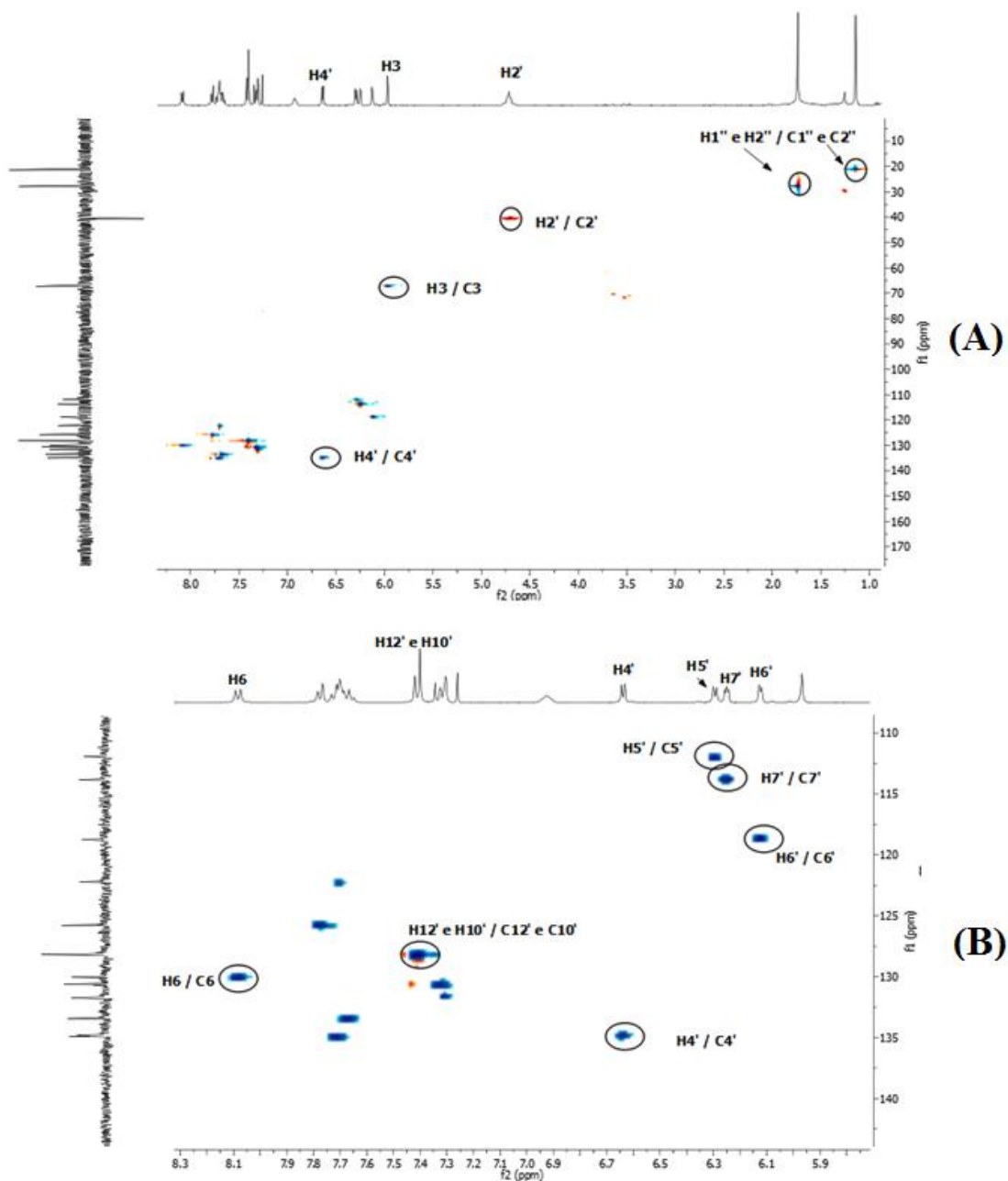
Os hidrogênios H7, H8 e H1' do anel triazólico apresentam deslocamento químico muito próximo, aparecendo como um multipletto na região entre  $\delta$  7.73ppm e  $\delta$  7.65 ppm. No mapa de correlação COSY (Figura 17) observou-se a correlação do sinal do hidrogênio H6 com o multipletto.

A partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (**60**) e já sendo conhecido alguns sinais característicos dos carbonos presentes na molécula, atribuições de alguns sinais foram realizadas. Os sinais dos carbonos metílicos C1'' e C2'' apresentam deslocamento químico em 21.3 ppm e 27.8 ppm. Observa-se também em  $\delta$  40.5 ppm e  $\delta$  67.2 ppm os sinais referentes aos carbonos C2' e C3, respectivamente. Estas atribuições podem ser confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (Figura 19). O sinal em  $\delta$  96.0 ppm pode ser atribuído ao carbono C2. Já os sinais mais desblindados, em  $\delta$  180.3 ppm e  $\delta$  174.9 ppm, são referentes aos carbonos das carbonilas C5 e C4 respectivamente. Tais atribuições podem ser confirmadas pelo mapa de correlação HMBC (Figura 20) no qual se observa a correlação do hidrogênio H6 com o sinal em  $\delta$  180.3 ppm a ausência de correlação para o sinal em  $\delta$  174.9 ppm, o que confirma a atribuição deste ao carbono C4, já que a carbonila C4 não é vizinha de hidrogênio algum, como pode ser visto na estrutura do composto.



**Figura 18:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do composto (60) (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

Tendo atribuído os sinais dos hidrogênios, utilizou-se a expansão do mapa de correlação HSQC (Figura 19 B), para atribuir outros sinais de carbonos hidrogenados. Observa-se, por exemplo, a correlação do hidrogênio H6' com um sinal de carbono em  $\delta$ 118.8 ppm, correspondente ao C6'. Além disso os sinais dos hidrogênios H5' e H7' mostraram correlação com sinais em  $\delta$  113.8 ppm (C5') e  $\delta$  112.0 ppm (C7'), respectivamente. Observou-se uma correlação do sinal do hidrogênio H4' com um sinal de carbono na região de 134.9 ppm, porém nesta região de deslocamento químico observou-se dois sinais de carbono muito próximos, quase se sobrepondo, com isso não foi possível afirmar com certeza qual sinal é referente ao carbono C4'. O sinal duplete dos hidrogênios H10' e H12' correlaciona-se com um sinal de carbono em  $\delta$  128.2 ppm, referente aos carbonos C10' e C12' e o sinal do hidrogênio H6 apresentou correlação com o sinal em  $\delta$  130.0 ppm.

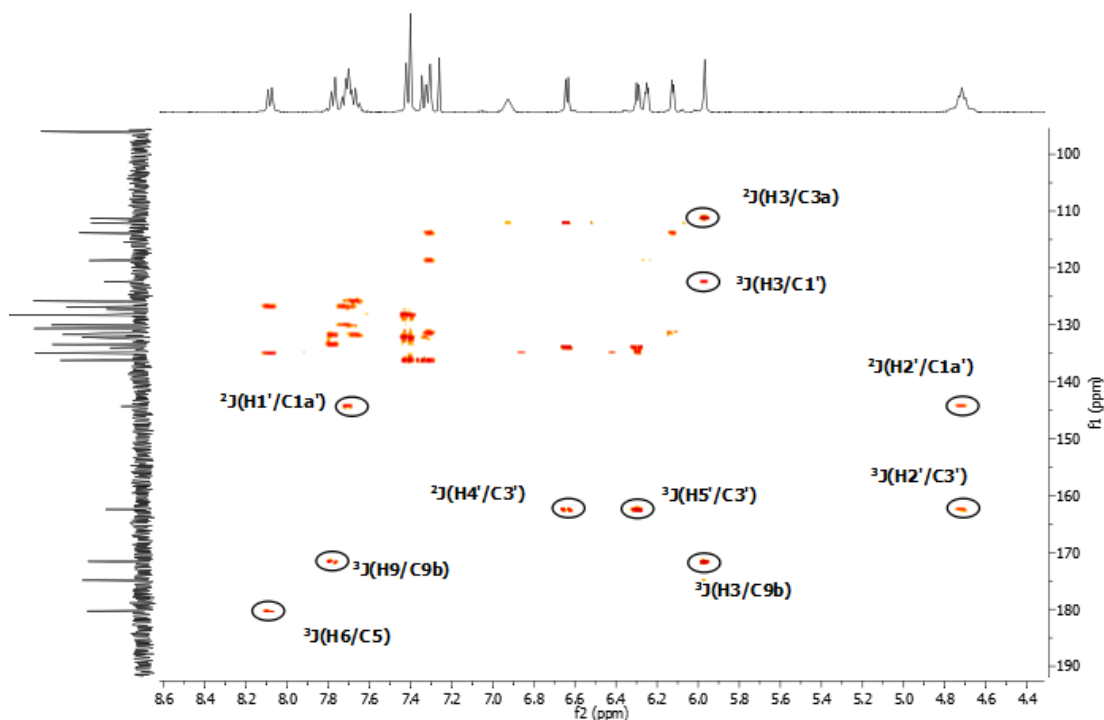


**Figura 19:** (A): Mapa de correlação HSQC do composto (60). (B): Expansão do mapa de correlação HSQC do composto (60) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

No mapa de correlação HMBC (Figura 20) foi possível obter mais informações. Observa-se, por exemplo, que o sinal de carbono em  $\delta$  144.6 ppm apresentou correlações com o sinal dos hidrogênios  $\text{H}2'$  e com o sinal multiplete na região  $\delta$  7.73 ppm a  $\delta$  7.65 ppm. Com base nessas correlações, conclui-se que este sinal é referente ao carbono não hidrogenado do anel triazólico  $\text{C}1\text{a}'$ . Os sinais dos hidrogênios  $\text{H}2'$ ,  $\text{H}5'$  e  $\text{H}4'$  mostraram correlações com o

sinal de carbono em  $\delta$  166.3 ppm, o que torna possível atribuir este sinal ao carbono C3'. Outras correlações apresentadas são a do sinal em  $\delta$  171.3 ppm com os sinais dos hidrogênios H3 e H9, correspondente ao carbono C9b. Além desta correlação, o sinal do hidrogênio H3 apresentou mais duas correlações com os sinais em  $\delta$  111.5 ppm (referente a carbono não hydrogenado) e  $\delta$  122.5 ppm (carbono hydrogenado). Assim, o sinal do carbono não hydrogenado pode ser atribuído ao C3a e o carbono hydrogenado refere-se ao carbono C1' do anel triazolico. No mapa de correlação HSQC observou-se também a correlação do sinal do carbono C1' com o sinal de hidrogênio na região do multiplete entre  $\delta$  7.73 ppm a  $\delta$  7.65 ppm, região que apresenta sinal referente ao H1'.

Os espectros de Massas e na região do Infravermelho para o composto (60) encontram-se no Apêndice deste trabalho.

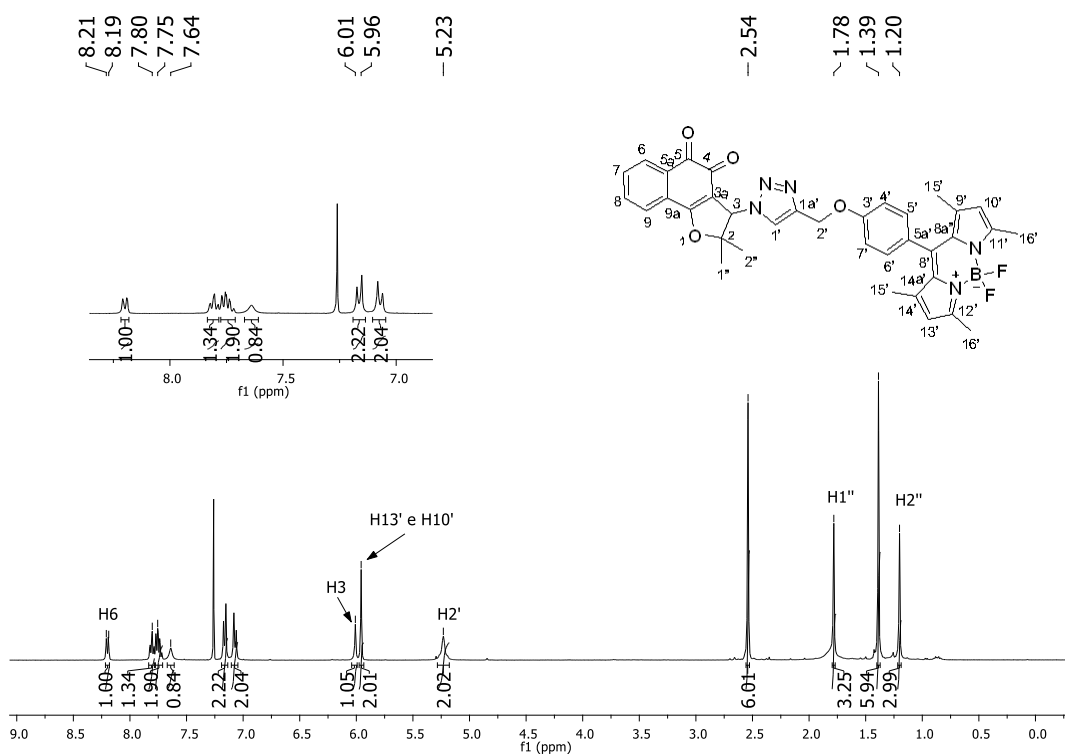


**Figura 20:** Mapa de correlação HMBC do composto (60) (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz).

Como foi dito anteriormente o composto (61) também foi caracterizado utilizando-se técnicas de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e técnicas bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto (61) (Figura 21) observam-se dois simpletos, integrados para 3H, em  $\delta$  1.20 ppm e  $\delta$  1.78 ppm, referentes aos hidrogênios metílicos H1'' e H2''. Pode-se observar em  $\delta$  5.23 um sinal na forma de um simpleto largo, integrado para

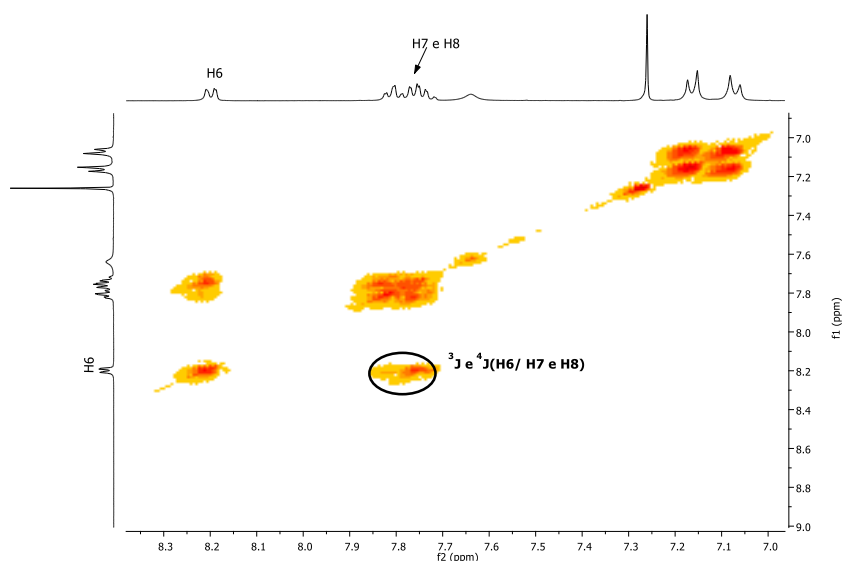
2H, que pode ser atribuído aos hidrogênios metilênicos H2'. Em  $\delta$  5.96 ppm e  $\delta$  6.01 ppm aparecem dois sinais simples, integrados para 2H e 1H, referentes aos hidrogênios H13' e H10' do anel pirrólico e ao H3, respectivamente. Na região aromática o sinal na forma de duplete em  $\delta$  8.20 ppm ( $^3J = 7.2\text{Hz}$ ) integrado para 1H, pode ser atribuído ao H6, sendo mais desblindado devido à proximidade ao carbono da carbonila. Pode-se observar também um simpleto em  $\delta$  7.64, integrado para 1H, que pode ser atribuído ao hidrogênio H1' do anel triazólico.



**Figura 21:** Espectro de RMN de H do composto (61) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

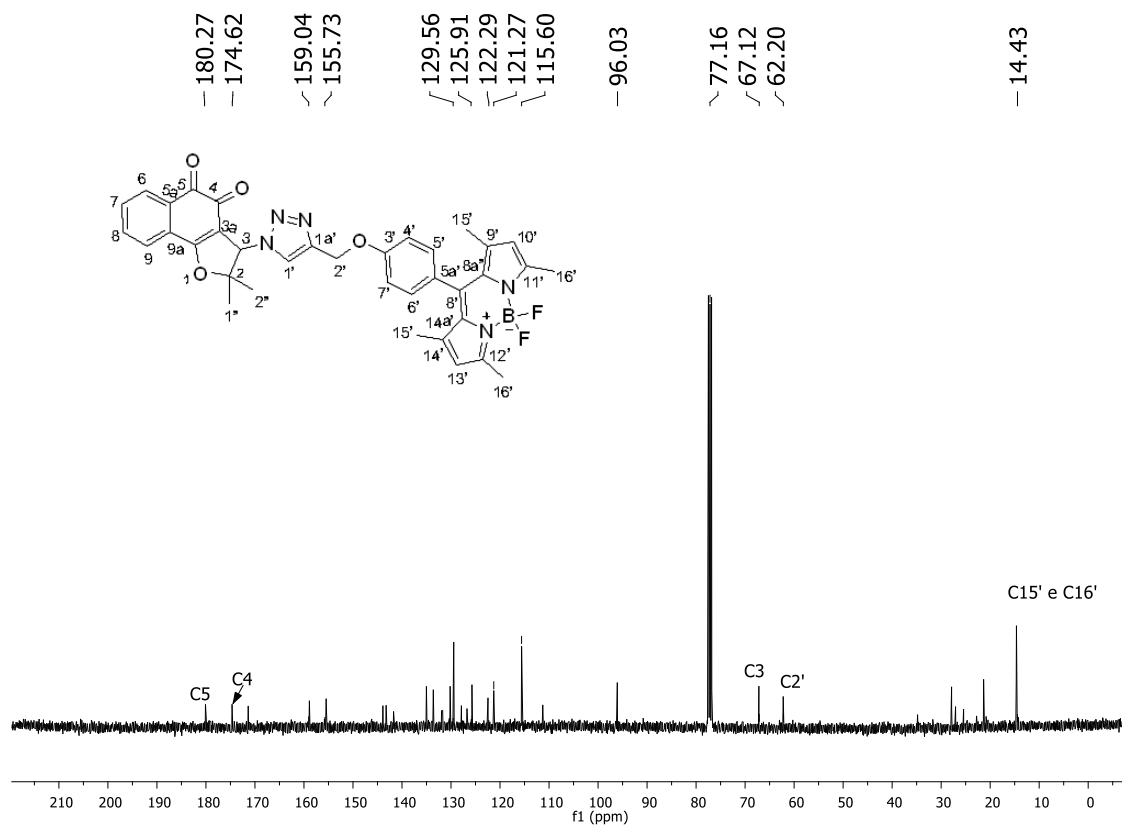
No mapa de correlação COSY do composto (61) (Figura 22) pode-se observar a correlação entre H6 e o sinal multiplete entre  $\delta$  7.79 ppm e 7.73 ppm, integrado para 2H, o qual pode então ser atribuído aos hidrogênios H7 e H8, devido à estrutura do composto.





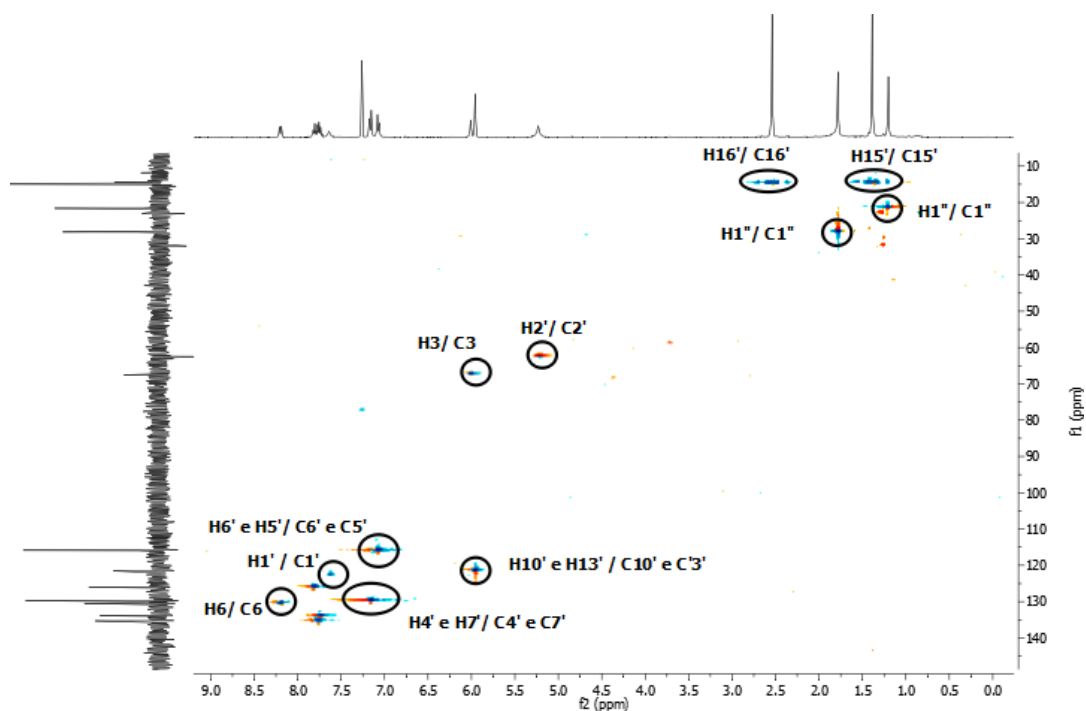
**Figura 22:** Mapa de correlação COSY do composto (**61**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (**61**) (Figura 23) podem-se observar os sinais em  $\delta$  180.3 ppm e  $\delta$  174.7 ppm, atribuídos aos carbonos das carbonilas presentes na molécula, C5 e C4 respectivamente. A atribuição destes sinais foi confirmada pelo mapa de correlação HMBC (Figura 25) no qual se observa o sinal em  $\delta$  180.3 ppm se correlacionando apenas com o sinal do H6, o que confirma, com base na estrutura da molécula, a atribuição. Já o sinal em  $\delta$  174.7 ppm não apresenta correlação com nenhum hidrogênio, um dado que corrobora com a atribuição, pois o carbono da carbonila C4 não é vizinho de nenhum hidrogênio. Os sinais em  $\delta$  67.1 ppm e  $\delta$  62.2 ppm podem ser atribuídos aos carbonos C3 e C2' respectivamente, sendo estas atribuições confirmadas pelo mapa de correlação HSQC (Figura 24). Em  $\delta$  14.4 ppm observa-se o sinal referente aos dois carbonos metálicos ligados aos anéis pirrólicos, C15' e C16', atribuição confirmada através do mapa de correlação HSQC, no qual nota-se a correlação dos sinais dos hidrogênios H15' e H16', integrados para 6H cada, com o sinal do carbono em  $\delta$  14.4 ppm.



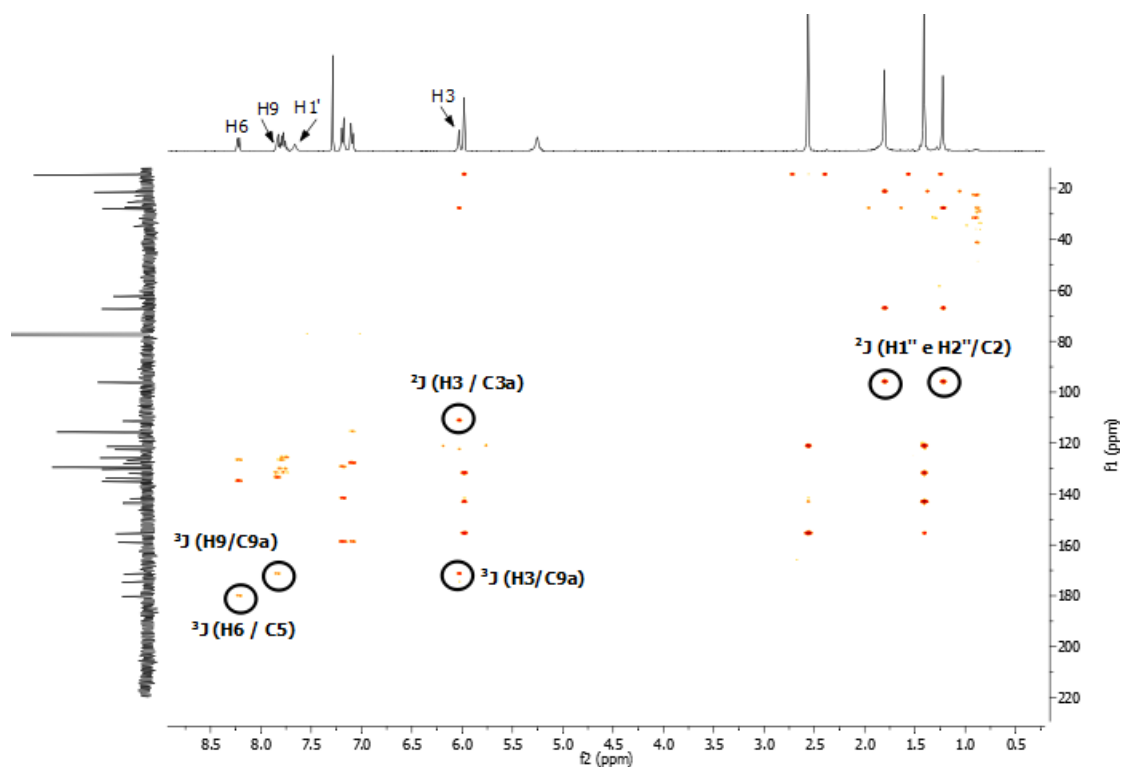
**Figura 23:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (**61**) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

Pode-se observar no mapa de correlação HSQC (Figura 24) a correlação do hidrogênio triazólico H1' com o sinal em  $\delta$  121.3 ppm. Nota-se também a correlação de H6 com o sinal em  $\delta$  130.2 ppm, sendo então possível atribuir este sinal ao C6. Os carbonos C7' e C4' apresentam sinal com deslocamento químico em  $\delta$  129.4 ppm e os carbonos C5' e C6' possuem deslocamento químico de 115.6 ppm. Estas atribuições foram feitas através do mapa de correlação HSQC, no qual pode-se observar as correlações dos sinais de H7' e H4' com o sinal em  $\delta$  129.4 ppm e dos sinais de H5' e H6' com o sinal em  $\delta$  115.6 ppm.



**Figura 24:** Mapa de correlação HSQC do composto (**61**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

No mapa de correlação HMBC (Figura 25) observa-se a correlação dos sinais dos hidrogênios H9 e H6 com o mesmo sinal de carbono em  $\delta$  171.4 ppm, sendo então este sinal atribuído ao carbono C9a, uma vez que este é vizinho de ambos os hidrogênios e possui um alto valor de deslocamento químico devido, principalmente, ao fato de estar ligado ao átomo de oxigênio. Os sinais dos hidrogênios metílicos H1'' e H2'' estão se correlacionando com o sinal do carbono em  $\delta$  96.0 ppm, que pode então ser atribuído ao carbono não hidrogenado C2. Observa-se também a correlação do sinal de H3 com o sinal de carbono em  $\delta$  12.2 ppm, o qual pode ser atribuído ao carbono C3a.



**Figura 25:** Mapa de correlação HMBC do composto (**61**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

Os dados apresentados em todas as análises confirmam, inequivocamente, o acoplamento das sub-unidades naftoquinonais e núcleo BODIPY- via formação do núcleo triazólico nos derivados luminescentes.

## 3.2. Estudos Fotofísicos

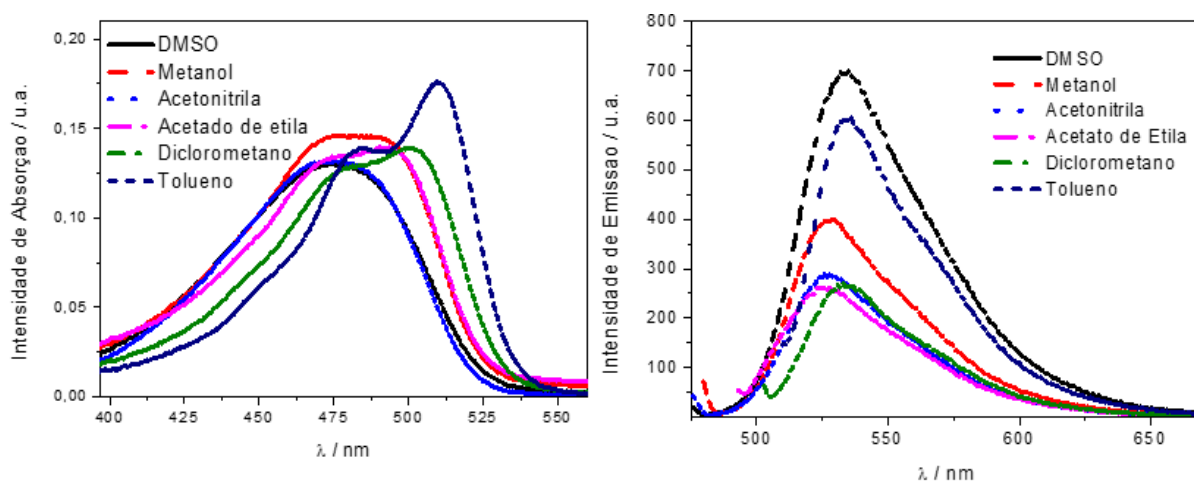
Os compostos luminescentes (**60**) e (**61**) tiveram suas propriedades fotofísicas analisadas, através de técnicas de espectrofotometria no UV-vis e espectrofotometria de fluorescência. Foram realizados o estudo de solvatocromismo e obtidos os rendimentos quânticos dos compostos em questão.

### 3.2.1. Solvatocromismo

Solvatocromismo é o estudo da mudança de bandas de absorção e emissão de uma substância utilizando diferentes solventes. Para os compostos (**60**) e (**61**) foram utilizados seis solventes com diferentes polaridades: tolueno, diclorometano, acetonitrila, acetato de etila, metanol e dimetilsulfóxido. Os solventes escolhidos abrangem uma grande faixa de

polaridade, sendo um ponto importante para o estudo. O efeito dos solventes sobre o comportamento fotofísico de uma substância depende de vários fatores como polaridade, viscosidade, rigidez da vizinhança, transferência de prótons, mudanças conformacionais no fluoróforo, entre outros. Todavia esses fatores muitas vezes não atuam separadamente, não sendo possível determinar qual fator é o dominante.<sup>52</sup>

Na Figura 26 abaixo estão representados os espectros de absorção e emissão, em diferentes solventes, do composto (60). Pode-se observar que os máximos de absorção variaram entre 475 a 510 nm, região do UV-visível. Em tolueno, solvente com menor polaridade utilizado, observou-se o maior comprimento de onda para o máximo de absorção, havendo um efeito batocrômico, deslocamento para maiores comprimentos de onda. Já os máximos de emissão são observados na região de 525 nm a 540 nm, com emissão entre 500 a 625 nm, na região que compreende do verde ao vermelho. Observa-se também que o composto (60) apresentou maior intensidade de emissão em DMSO e, devido à esta característica observada, DMSO foi o solvente escolhido para obtenção do rendimento quântico de (60).

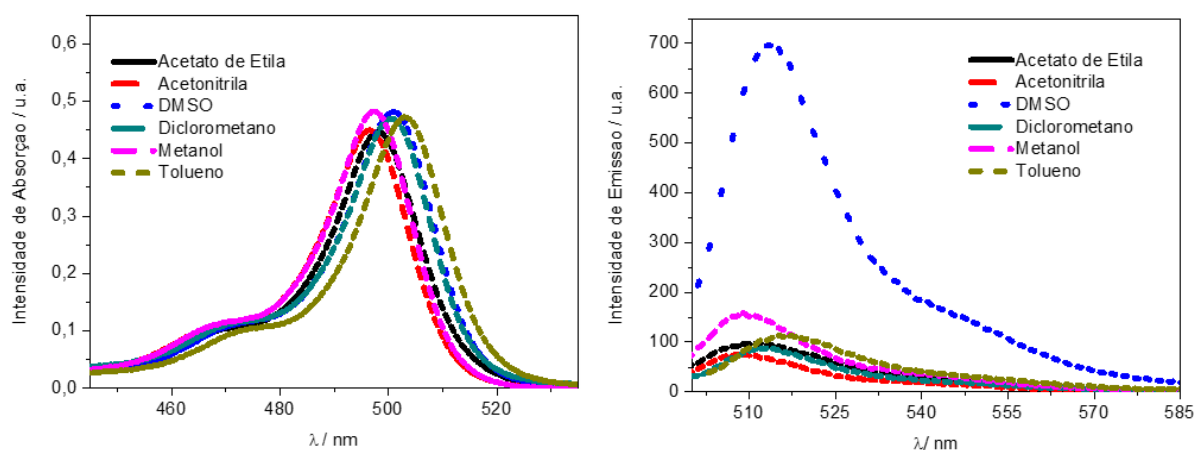


**Figura 26:** Espectros de absorção e emissão em diferentes solventes do composto (60)

Os espectros de absorção e emissão do composto (61) estão representados na Figura 27. Pode-se observar que os espectros de absorção apresentam-se de forma regular para todos os solventes utilizados, havendo pequenos deslocamentos nos máximos de absorção, que compreende os valores de comprimento de onda de 496 nm a 505 nm. No espectro de emissão

<sup>52</sup>Reichardt, C., Welton, T., *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. John Wiley & Sons, 2011

observa-se que o composto **(61)** apresentou uma intensidade de emissão muito maior em DMSO, quando comparado com os demais solventes utilizados. Este dado foi levado em consideração para escolha do DMSO também como solvente na obtenção do rendimento quântico de **(61)**. Os máximos de emissão apresentam valores de  $\lambda$  entre 508 nm e 517 nm, e o composto emite na região do verde, entre 500 a 570 nm.

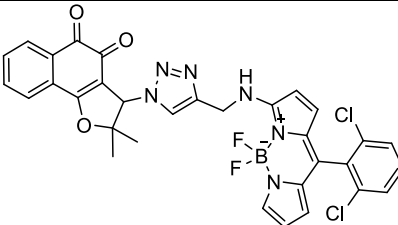
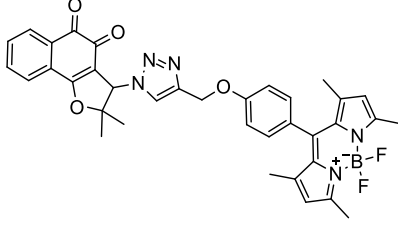


**Figura 27:** Espectros de absorção e emissão em diferentes solventes do composto **(61)**

Através da análise dos espectros de absorção e emissão dos compostos **(60)** e **(61)**, em diferentes solventes, não foi possível estabelecer um padrão de comportamento em função da variação da polaridade dos solventes analisados, com relação a intensidade de absorção e emissão, ou em relação ao deslocamento do comprimento de onda dos máximos de absorção e emissão.

Com os valores de máximos de absorção e máximo de emissão determinados, foi possível calcular o deslocamento de Stokes (diferença entre o  $\lambda$  máximo de emissão e o  $\lambda$  máximo de absorção), para os compostos **(60)** e **(61)** em cada solvente estudado, sendo os valores obtidos dispostos na Tabela 1. Como o processo de emissão de energia começa no estado energético singlete excitado  $S_1$ , a energia emitida é sempre menor que a energia absorvida. Parte da energia emitida é perdida pela relaxação vibracional e conversão interna, o que gera o desvio de Stokes.

**Tabela 1:** Dados do solvatochromismo: máximos de absorção e emissão e deslocamento de Stokes, para os compostos **(60)** e **(61)**

Composto	Solvente	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max emi}}$ (nm)	Deslocamento de Stokes (nm)
 <p><b>(60)</b></p>	Acetato de Etila	498	508	10
	Acetonitrila	497	508	11
	DMSO	498	513	15
	Diclorometano	501	513	12
	Metanol	498	510	12
	Tolueno	508	514	6
 <p><b>(61)</b></p>	Acetato de Etila	498	510	12
	Acetonitrila	496	508	12
	DMSO	500	513	13
	Diclorometano	500	513	13
	Metanol	497	509	12
	Tolueno	503	517	9

Os valores de deslocamento de Stokes para os compostos **(60)** e **(61)** foram relativamente baixos, variando entre 6 e 15 nm. Em tolueno o valor de deslocamento de Stokes foi o menor observado, e em DMSO foi o maior valor observado, para ambos os compostos. Este comportamento mostra que maiores deslocamento de Stokes ocorrem em solventes polares, devido ao fato que tais solventes favorecerem a dissipação de energia por processo não radioativos, ocorrendo então maior diferença entre a energia absorvida e emitida.

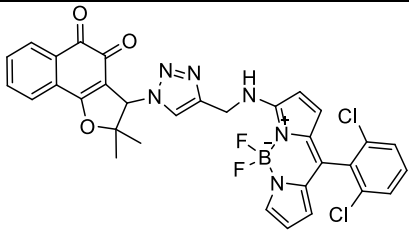
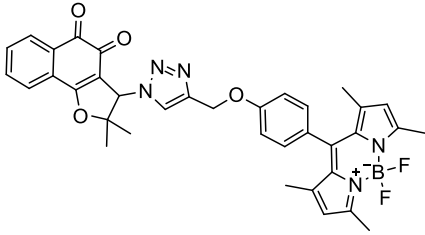
A partir dos valores de intensidade máxima de absorção e de emissão, é possível, utilizando a equação (1), obter os valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) de absorção e o coeficiente de emissão molar dos compostos **(60)** e **(61)** nos diferentes solventes utilizados.

$$A = \epsilon \cdot C \cdot B \quad (\text{Equação 01})$$

A equação 01 representa a lei de Lambert Beer, onde A representa a absorbância,  $\epsilon$  a absorvidade molar, B o caminho ótico e C a concentração da solução em molL<sup>-1</sup>. Para os compostos **(60)** e **(61)** os experimentos foram realizados utilizando cubetas de 1 cm, caminho

ótico, e soluções de concentrações  $5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Os valores de  $\epsilon_{\text{abs}}$  e  $\epsilon_{\text{em}}$ , obtidos em diferentes solventes estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Coeficientes de absorção e emissão molar dos compostos (60) e (61) em diferentes solventes

Composto	Solvente	$\epsilon_{\text{abs}}/\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (log $\epsilon_{\text{abs}}$ )	$\epsilon_{\text{em}}/\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (log $\epsilon_{\text{em}}$ )
 <b>(60)</b>	Acetato de Etila	27800 (4,44)	$5,25 \times 10^7$ (7,72)
	Acetonitrila	26400 (4,42)	$5,68 \times 10^7$ (7,75)
	DMSO	26000 (4,41)	$13,88 \times 10^7$ (8,14)
	Diclorometano	27800 (4,44)	$5,26 \times 10^7$ (7,72)
	Metanol	29000 (4,46)	$7,94 \times 10^7$ (7,90)
	Tolueno	35200 (4,54)	$12,0 \times 10^7$ (8,08)
 <b>(61)</b>	Acetato de Etila	89200 (4,95)	$1,94 \times 10^7$ (7,28)
	Acetonitrila	89800 (4,95)	$1,59 \times 10^7$ (7,17)
	DMSO	96400 (4,98)	$1,39 \times 10^8$ (8,14)
	Diclorometano	94000 (4,97)	$1,78 \times 10^7$ (7,25)
	Metanol	96400 (4,98)	$3,18 \times 10^7$ (7,50)
	Tolueno	94400 (4,97)	$2,24 \times 10^7$ (7,35)

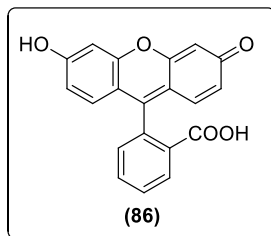
O coeficiente de absorvidade molar,  $\epsilon_{\text{abs}}$ , e o coeficiente de emissão molar,  $\epsilon_{\text{em}}$ , são propriedades da substância em um determinado comprimento de onda e determinado solvente. Os valores de  $\epsilon_{\text{abs}}$  e  $\epsilon_{\text{em}}$ , representam a capacidade do composto de absorver e emitir energia em determinadas condições. Observa-se, a partir dos dados obtidos, que o composto (60) apresentou o maior  $\epsilon_{\text{abs}}$  em tolueno e o maior  $\epsilon_{\text{em}}$  em DMSO, com pequenas variações entre os demais solventes. Já o composto (61) apresentou uma diferença muito expressiva no valor de  $\epsilon_{\text{em}}$  em DMSO, um valor maior quando comparado aos demais solventes, que pode estar relacionado com a maior intensidade de emissão de (61) neste solvente.

### 3.2.2. Rendimento Quântico

Rendimento quântico, ou eficiência quântica de um fluoróforo, é a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos, e é representado pela letra grega  $\Phi_{\text{F}}$ .



Substâncias com altos rendimentos quânticos, com valores próximos de uma unidade, como a fluoresceína (**86**) (Figura 28), apresentam uma emissão visivelmente brilhante.<sup>53</sup>



**Figura 28:** Estrutura da fluoresceína

O método mais utilizado para determinação do rendimento quântico de fluorescência de um fluoróforo foi desenvolvido por Williams et al,<sup>54</sup> e consiste em um procedimento comparativo, utilizando uma substância padrão com o valor de  $\Phi_F$  conhecido, e que absorva e emita em comprimentos de ondas próximos ao do composto que se deseja determinar o valor de  $\Phi_F$ .<sup>55</sup>

Para obter os valores de  $\Phi_F$  dos compostos (**60**) e (**61**), foi utilizada como padrão a fluoresceína (**86**), que apresenta máximo de emissão entre 500 e 600 nm e o valor de  $\Phi_F = 0,79$ .<sup>56</sup> Foram preparadas soluções em diferentes concentrações da fluoresceína, utilizando como solvente uma solução de NaOH 0,1 M. Soluções em diferentes concentrações dos compostos (**60**) e (**61**) também foram preparadas, utilizando como solvente DMSO.

Com as soluções preparadas, das amostras e da referência, realizou-se então as leituras de absorção e emissão, obtendo-se os respectivos espectros. Durante toda a análise, o comprimento de onda de excitação bem como as fendas de excitação e emissão foram mantidos constantes para cada um dos compostos e sua referência.

Após obter os espectros de absorção e emissão, foram construídos gráficos que correlacionam a área do espectro de emissão com o máximo de absorção, para os compostos e para a referência. Utilizando a regressão linear das retas, obteve-se os valores das inclinações, necessários para obtenção do rendimento quântico, através da equação 02.

<sup>53</sup>Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Princípios de análise instrumental. *Bookman*. **2002**, 5, 326.

<sup>54</sup>Williams, A. T. R.; Winfield, S. A.; Miller J. N., Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst*. **1983**, 108, 1067-1071.

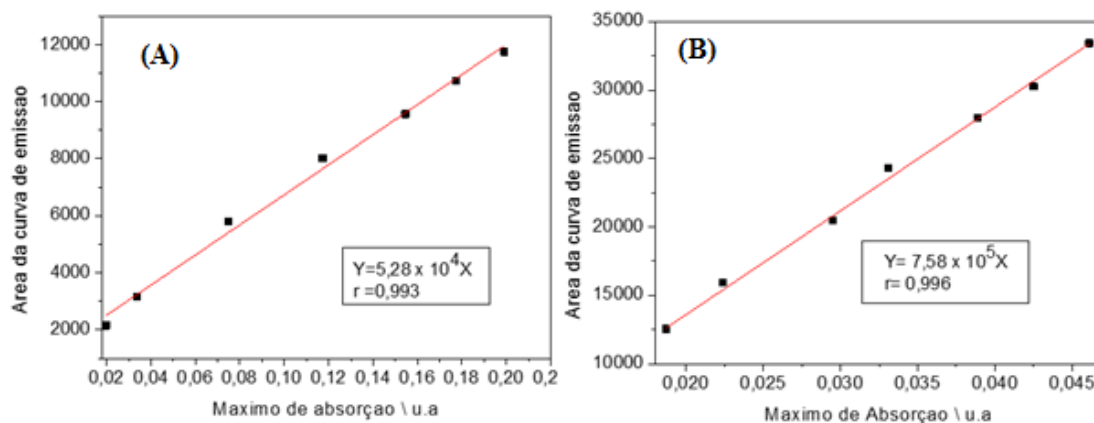
<sup>55</sup>Owen, T. *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*. **2000** Agilent Technologies.

<sup>56</sup>Umberger, J. Q.; LaMer, V. K.; The kinetics of diffusion controlled molecular and ionic reactions in solution as determined by measurements of the quenching of fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67, 1099–1109

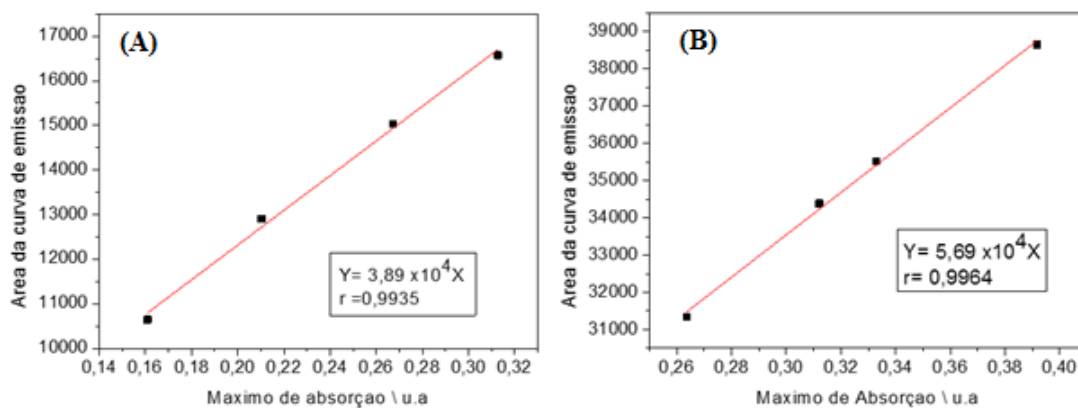
$$\Phi_{FA} = \Phi_{FR}(m_A|m_R)(\eta_A|\eta_R)^2 \quad (\text{Equação 02})$$

Na equação 02,  $\Phi_{FA}$  é o rendimento quântico da amostra que se deseja obter,  $\Phi_{FR}$  é o rendimento quântico da referência, neste caso a fluoresceína,  $m_A$  é o valor da inclinação da reta da amostra,  $m_R$  é o valor da inclinação da reta da referência e  $\eta$  é o índice de refração dos solventes utilizados na preparação das soluções,  $\eta_A$  da amostra (DMSO) e  $\eta_R$  da referência (solução de NaOH 0,1M). Os valores de  $\eta_A$  e  $\eta_R$  foram obtidos utilizando um refratômetro Reichert Abbe Mark II, sendo encontrado os valores de 1,47 para o DMSO e 1,33 para solução de NaOH 0,1M.

Os gráficos construídos para os compostos (60) e (61), bem como para referência, estão representados nas Figuras 29 e 30, respectivamente.



**Figura 29:** Relação entre o máximo de absorção versus a área sob espectro de emissão do composto (60), (A), e do padrão fluoresceína, (B).



**Figura 30:** Relação entre o máximo de absorção versus a área sob espectro de emissão do composto (61), (A), e do padrão fluoresceína, (B).

Com os valores das inclinações das retas (m), o rendimento quântico da fluorescência, os índices de refração das soluções e utilizando a equação 02, foi possível obter os valores de rendimento quântico de fluorescência para os compostos (60) e (61), representados a seguir:

✓ Composto (60):  $\Phi_F=0,07$

✓ Composto (61):  $\Phi_F = 0,66$

O composto (60) forneceu um valor de  $\Phi_F$  relativamente baixo, comparado com o padrão, contudo o composto (61) apresentou um rendimento quântico próximo a valores reportados na literatura.<sup>57</sup> Mesmo o composto (60) tendo apresentado um baixo valor de rendimento quântico de fluorescência, isso não inviabilizou estudos de localização subcelular deste, pois baixos valores de rendimento quântico não impossibilitam a realização desse tipo de estudo.

Os estudos de atividade citotóxica e localização subcelular para o composto (61) ainda estão sendo realizados, por isso não foram apresentados e discutidos neste trabalho.

### 3.3. Atividade Citotóxica

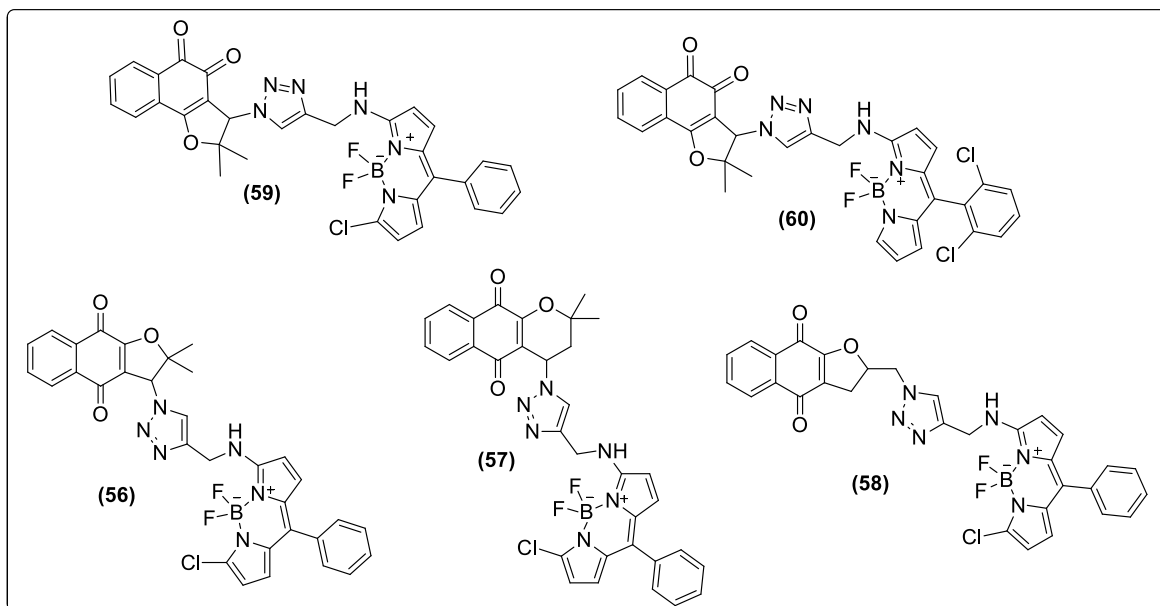
#### 3.3.1. Ensaio MTT

Os testes de atividade citotóxica dos triazóis 56-60 (Esquema 40) foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Bruno Calvalcanti, da Universidade Federal do Ceará, a fim de avaliar a atividade citotóxica dos mesmos frente a células tumorais e normais. Os compostos foram avaliados *in vitro*, baseado no ensaio MTT.<sup>58</sup>

---

<sup>57</sup>Melhuish, W. H. J. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent in concentration of the fluorescent solute. *Phys. Chem.* **1961**,65, 229–235

<sup>58</sup>Mosmann, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55–63.



**Esquema 40:** Compostos avaliados frente à linhagens de células tumorais e células normais

Os triazóis **56-59** foram testados frente a três tipos de células tumorais: PC3 (próstata), SF295 (glioblastoma) e HCT-116 (côlon), e frente a um tipo de célula normal: L929 (fibroblasto murino). Foram realizados também experimentos que avaliam a contribuição de EROs (espécies reativas de oxigênio) para a citotoxicidade dos triazóis testados. Nestes experimentos as células foram co-tratadas com GSH-OEt (15 mM), o éster etílico da glutatona (GSH). Os experimentos preliminares realizados demonstraram que o GSH-OEt não foi citotóxico para as células, e fornecia uma proteção mais eficaz do que a GSH na mesma concentração.

A GSH não é facilmente transportada para maioria das células, e devido a isso nos ensaios MTT utilizou-se a GSH-OEt, mais lipofílica e facilmente absorvida pela célula, que quando chega ao meio celular é hidrolisada à GSH.<sup>59</sup> A glutatona é um tripeptídeo linear, presente nas células animais e vegetais, que desempenha um importante papel como antioxidante, protegendo-as de radicais livres.

<sup>59</sup>Baglolle, C. J., Bushinsky, S. M., Garcia, T. M., Kode, A., Rahman, I., Sime, P. J., and Phipps, R. P. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: Implications for emphysema. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2006**, *291*, 19–29.

Os resultados dos testes de citotoxicidade, expressos em  $CI_{50}\mu\text{M}/24\text{h}$  (concentração que inibe 50% do crescimento das células tumorais) para os triazois **56-59**, na presença e ausência de GSH-OEt, estão dispostos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Resultados dos testes de citotoxicidade dos compostos **56-59**, depois de 24h de exposição celular na presença e ausência de glutatona reduzida.

Composto	GSH-OEt <sup>a</sup>	Tipo de células testadas			
		PC3 (Próstata)	SF295 (Glioblastoma)	HCT-116 (Cólon)	L929 (fibroblastos murinos)
<b>(59)</b>	+	15.83 ± 1.15 $\mu\text{M}$	9.81 ± 0.10 $\mu\text{M}$	14.25 ± 2.10 $\mu\text{M}$	12.41 ± 1.75 $\mu\text{M}$
	-	4.47 ± 0.73 $\mu\text{M}$	1.96 ± 0.21 $\mu\text{M}$	5.28 ± 0.55 $\mu\text{M}$	5.91 ± 0.10 $\mu\text{M}$
<b>(56)</b>	+	>40.92 $\mu\text{M}$	>40.92 $\mu\text{M}$	>40.92 $\mu\text{M}$	>40.92 $\mu\text{M}$
	-	>40.01 $\mu\text{M}$	>40.01 $\mu\text{M}$	>40.01 $\mu\text{M}$	>40.01 $\mu\text{M}$
<b>(57)</b>	+	>21.90 $\mu\text{M}$	>21.90 $\mu\text{M}$	>21.90 $\mu\text{M}$	>21.90 $\mu\text{M}$
	-	>39.19 $\mu\text{M}$	>39.19 $\mu\text{M}$	>39.19 $\mu\text{M}$	>39.19 $\mu\text{M}$
<b>(58)</b>	+	>39.19 $\mu\text{M}$	>39.19 $\mu\text{M}$	>39.19 $\mu\text{M}$	>39.19 $\mu\text{M}$
	-	>40.92 $\mu\text{M}$	>40.92 $\mu\text{M}$	>40.92 $\mu\text{M}$	>40.92 $\mu\text{M}$

<sup>a</sup> Éster etílico da glutatona reduzida (15 mM)

A atividade de um composto pode ser classificada de acordo com os valores de  $CI_{50}$  obtidos em testes: elevada atividade ( $CI_{50} < 2 \mu\text{M}$ ), atividade moderada ( $2 \mu\text{M} < CI_{50} < 10 \mu\text{M}$ ) e inativos ( $CI_{50} > 10 \mu\text{M}$ ).

Os compostos **(56)**, **(57)** e **(58)** foram inativos frente às células tumorais testadas, tanto na presença e ausência de GSH-OEt. Já o composto **(59)**, derivado da nor- $\beta$ -lapachona **(14)**, apresentou atividade elevada ( $CI_{50} = 1.96 \mu\text{M}$ ) para linhagem de células tumorais SF295 e atividade moderada frente às demais células testadas. Pode-se observar que, na presença de GSH-OEt, a atividade do composto **(59)** foi bastante atenuada, tornando-se o mesmo inativo frente às linhagens PC3, HCT-116 e L929 (célula normal) e moderada ( $CI_{50} = 9.81 \mu\text{M}$ ) frente à linhagem SF295. Estes resultados podem ser explicados devido ao fato de que a maior quantidade de glutatona reduzida presente no meio intracelular forneceu uma maior proteção para as células utilizadas, quando estas foram tratadas com os compostos testados. Como já dito anteriormente, a glutatona age como um antioxidante, fornecendo proteção à células frente aos radicais livres que possivelmente estão sendo gerados pelo composto **(59)** no meio intracelular.

O composto (**60**) foi testado frente a 17 linhagens de células, referentes a células de 7 tipos de câncer diferentes (próstata, leucemia, cólon, mama, glioblastoma, melanoma e pulmão) e contra células normais do tipo PBMC (células mononucleares de sangue periférico). Os testes foram realizados empregando o ensaio MTT e a doxorrubicina (**7**) como controle positivo. Na Tabela 4 estão dispostos os resultados de  $CI_{50}\mu M$  (CI 95%) para o composto (**60**), comparados com o controle positivo.

**Tabela 4:** Atividade citotóxica do composto (**60**), expressa em  $CI_{50}\mu M/72h$  (CI 95%)

Próstata		Leucemia			
PC3	DU-145	HL-60	K562	MOLT-4	Jurkat
0.74	0.77	0.39	0.50	0.34	0.37
(0.63-0.72)	(0.72-0.80)	(0.36-0.42)	(0.44-0.54)	(0.28-0.37)	(0.33-0.44)
*0.05	*0.09	*0.03	*0.06	*0.04	*0.02
(0.01-0.06)	(0.04-0.12)	(0.01-0.07)	(0.02-0.11)	(0.03-0.05)	(0.01-0.03)
Cólon			Mama		
HCT-116	HCT-8	SW620	MX-1	HS578t	MDA-MB231
1.04	0.98	0.95	1.71	1.79	2.02
(0.89-1.24)	(0.91-1.04)	(0.89-1.01)	(1.62-1.79)	(1.67-1.89)	(1.88-2.14)
*0.21	*0.37	*0.39	*0.42	*0.48	*0.44
(0.16-0.25)	(0.31-0.42)	(0.33-0.47)	(0.39-0.45)	(0.41-0.56)	(0.40-0.49)
Glioblastoma		Melanoma		Pulmão	Normal
SF295	SF268	MDA-MB435	UACC62	NCI-H460	PBMC
2.17	2.11	1.79	1.97	1.89	3.26
(1.92-2.55)	(1.97-2.15)	(1.70-1.91)	(1.89-2.06)	(1.77-1.99)	(3.00-3.50)
*0.47	*0.51	*0.85	*0.62	*0.74	*0.55
(0.44-0.50)	(0.49D-0.53)	(0.79-0.92)	(0.57-0.66)	(0.71-0.78)	0.41-0.58

\*Controle positivo, doxorrubicina

Os resultados dos testes apontaram que o composto (**60**) mostrou-se ativo frente a todas as células tumorais testadas, apresentando os menores valores de  $CI_{50}$  frente às células de câncer próstata e leucemia, com elevada atividade. Observou-se que, frente às células tumorais de mama, glioblastoma, melanoma e pulmão o composto (**60**) mostrou atividade moderada, com valores de  $CI_{50}$  entre 1.71 - 2.17  $\mu M$ . Observou-se também que o composto (**60**) foi menos tóxico frente a células normais, PBMC, quando comparado com o controle positivo, a doxorrubicina.

Com estes resultados, conclui-se que apenas os triazóis (**59**) e (**60**) testados apresentaram atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais, sendo ambos derivados da nor- $\beta$ -lapachona (**14**).

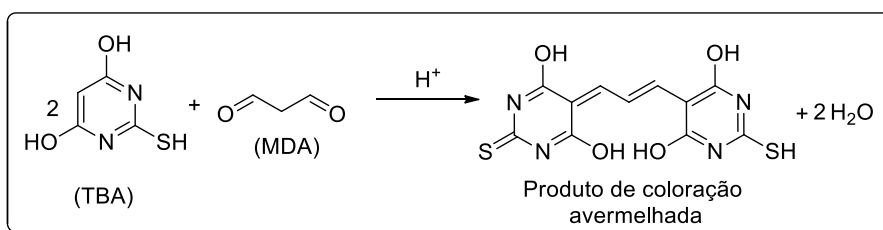
### 3.3.2. Dosagem de tióis intracelulares e peroxidação lipídica – Ensaio

#### TBARS

Após os testes de citotoxicidade MTT, que mede o  $CI_{50}$  dos compostos frente a células tumorais e normais, e sendo apenas os compostos (59) e (60) ativos, foram realizados testes que avaliam o estresse oxidativo nas células expostas a estes compostos.

O desequilíbrio no consumo e na formação de espécies reativas de oxigênio no meio celular causa muitos danos às células, como a peroxidação lipídica, um processo que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, comprometendo o metabolismo celular.<sup>60</sup> Neste processo da peroxidação lipídica ocorrem várias reações e transformações dentro da célula, com formação de produtos citotóxicos, como por exemplo, o malonaldeído (MDA).

O malonaldeído é um dialdeído reativo, considerado um biomarcador do estresse oxidativo. Através da determinação da quantidade desse composto no meio celular é possível avaliar a peroxidação lipídica em uma célula que está sob estresse oxidativo, utilizando o método de doseamento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conhecido como TBARS. Este método se baseia na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico, no qual o produto final formado produz uma coloração avermelhada na solução (Esquema 41). Medidas espectrofotométricas desta solução fornecem valores de concentração de MDA no meio.<sup>61</sup>



**Esquema 41:** Reação do teste de TBARS entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído (MDA), formando o composto colorido (Adaptado da referência 62)<sup>62</sup>

<sup>60</sup>Ferreira, A. L.A.; Matsubara, I.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Assoc. Med. Bras.* **1997**, *43*, 61-68.

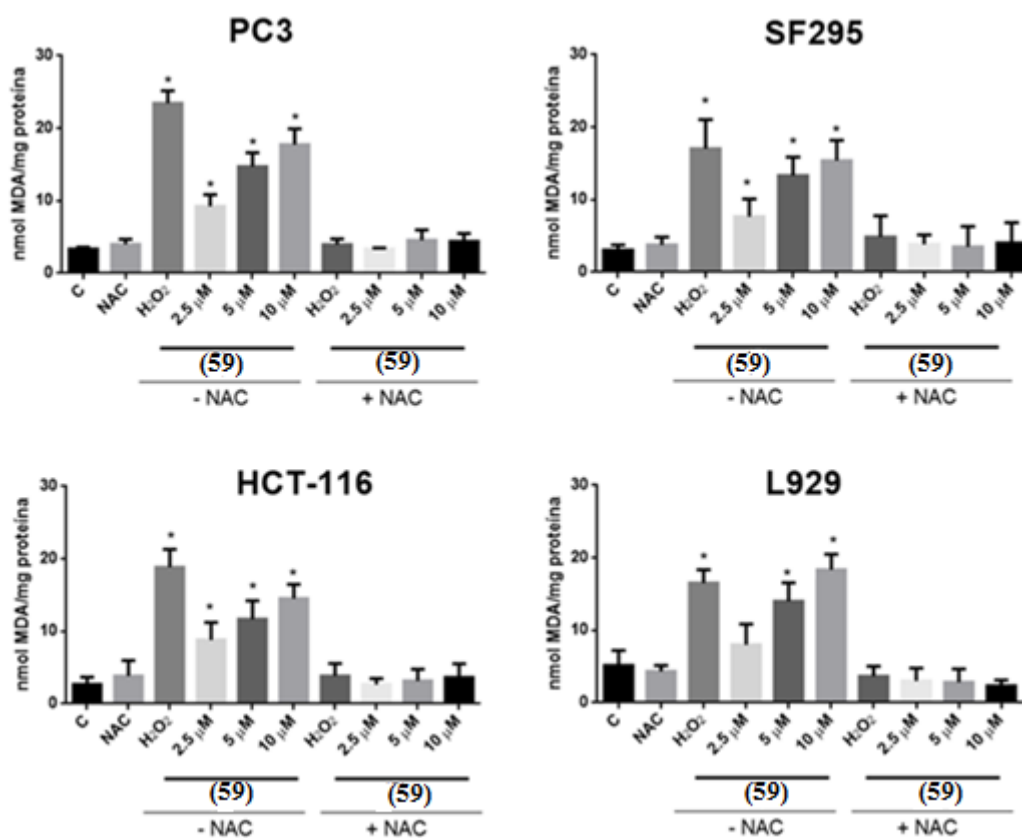
<sup>61</sup> Draper, H. H.; Hadely, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 421-431.

<sup>62</sup>Osawa, C. C., Felício, P.E., Gonçalves, L. A. G. "Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos." *Quím. Nov.* **2005**, *28.4*, 655 - 663.



Outro método que avalia danos causados pelo estresse oxidativo na célula é a dosagem de GSH (glutathiona reduzida), de GSSG (glutathiona oxidada) e a determinação da razão de GSH/GSSG. Dentro da célula, devido ao seu metabolismo, processos de oxi-redução acontecem à todo momento, havendo formação e consumo de espécies reativas de oxigênio; quando ocorre inativação de algum agente oxidante, há formação de GSSG e redução na taxa de GSH no meio celular. Em situações em que o meio celular encontra-se em perfeito funcionamento, ocorre a recuperação da glutathiona reduzida (GSH). Todavia, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá um desbalanço entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, caracterizando o estresse oxidativo.<sup>60</sup>

Para o composto (59), os testes de TBARS e a dosagem de GSH e GSSG foram realizados frente às mesmas linhagens de células utilizadas no ensaio MTT. Na Figura 31 estão representados os gráficos que mostram a quantidade de MDA nas células tratadas com o composto (59), na presença e ausência do antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC), utilizando como controle positivo o peróxido de hidrogênio.



**Figura 31:** Concentração de MDA nas células tratadas, por 24h, com o composto (59) na presença e ausência de NAC.





Pode-se observar, analisando os gráficos representados na Figura 31, que a quantidade de MDA produzida quando as células foram tratadas com solução de 10 $\mu$ m do composto (**59**) sem a presença de NAC, é bem próxima da quantidade produzida quando as mesmas células são expostas ao controle positivo, e que, mesmo na menor concentração analisada, o composto (**59**) resultou em concentrações superiores de MDA nas células aos valores de concentração para o controle negativo (solução de 0,1% de DMSO). Já na presença de NAC, as concentrações de MDA nas células foram bem inferiores quando comparadas com o teste realizado na ausência de NAC, tanto para o composto (**59**) quanto para o controle positivo.

Nota-se também que o composto (**59**) ocasionou a peroxidação lipídica em linhagens de células normais, L929, resultando em concentrações consideráveis de MDA.

Na Tabela 5 estão dispostos os dados referentes às dosagens de GSH e GSSG, bem como a razão entre os dois, em células tratadas com o composto (**59**).

**Tabela 5:** Dosagem de tióis nas células tratadas com o composto (59), na presença e ausência de NAC

Linhagens de células	Substâncias	Tratamentos	Tióis intracelulares ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)			
			Total	GSH	GSSG	GSH/GSSG
PC3	Controle <sup>a</sup>	0.1% DMSO	4.23 $\pm$ 0.75	3.04 $\pm$ 0.51	1.11 $\pm$ 0.12	2.69 $\pm$ 0.21
	NAC <sup>b</sup>	5 mM	4.74 $\pm$ 0.50	3.53 $\pm$ 0.33	1.18 $\pm$ 0.21	2.87 $\pm$ 0.55
	(59)	5 $\mu\text{M}$	3.53 $\pm$ 0.81*	1.35 $\pm$ 0.10*	2.16 $\pm$ 0.15*	0.37 $\pm$ 0.11*
	(59)+NAC <sup>c</sup>	5 $\mu\text{M}$	4.26 $\pm$ 0.55	3.13 $\pm$ 0.22	1.07 $\pm$ 0.15	2.88 $\pm$ 0.33
SF295	Controle <sup>a</sup>	0.1% DMSO	4.51 $\pm$ 0.83	3.16 $\pm$ 0.21	1.31 $\pm$ 0.55	2.34 $\pm$ 0.56
	NAC <sup>b</sup>	5 mM	4.86 $\pm$ 0.71	3.81 $\pm$ 0.55	1.02 $\pm$ 0.10	3.61 $\pm$ 0.81
	(59)	5 $\mu\text{M}$	3.44 $\pm$ 0.10*	1.31 $\pm$ 0.16*	2.09 $\pm$ 0.21*	0.39 $\pm$ 0.20*
	(59) +NAC <sup>c</sup>	5 $\mu\text{M}$	4.72 $\pm$ 0.22	3.47 $\pm$ 0.55	1.21 $\pm$ 0.10	2.82 $\pm$ 0.10
HCT-116	Controle <sup>a</sup>	0.1% DMSO	5.02 $\pm$ 0.91	3.74 $\pm$ 0.55	1.19 $\pm$ 0.37	3.09 $\pm$ 0.33
	NAC <sup>b</sup>	5 mM	5.38 $\pm$ 0.45	4.09 $\pm$ 0.61	1.23 $\pm$ 0.33	3.26 $\pm$ 0.21
	(59)	5 $\mu\text{M}$	3.81 $\pm$ 0.56*	1.78 $\pm$ 0.25*	2.01 $\pm$ 0.22*	0.56 $\pm$ 0.10*
	(59) +NAC <sup>c</sup>	5 $\mu\text{M}$	5.12 $\pm$ 0.11	3.71 $\pm$ 0.25	1.38 $\pm$ 0.33	2.63 $\pm$ 0.22
L929	Controle <sup>a</sup>	0.1% DMSO	4.87 $\pm$ 0.25	3.76 $\pm$ 0.51	1.05 $\pm$ 0.33	3.55 $\pm$ 0.51
	NAC <sup>b</sup>	5 mM	5.43 $\pm$ 0.81	3.89 $\pm$ 0.75	1.52 $\pm$ 0.10	2.52 $\pm$ 0.33
	(59)	5 $\mu\text{M}$	3.50 $\pm$ 0.15*	1.15 $\pm$ 0.21*	2.27 $\pm$ 0.33*	0.33 $\pm$ 0.10*
	(59) +NAC <sup>c</sup>	5 $\mu\text{M}$	5.21 $\pm$ 0.33	3.89 $\pm$ 0.21	1.24 $\pm$ 0.25	3.08 $\pm$ 0.50

<sup>a</sup>Controle negativo (0.1 % DMSO); <sup>b</sup> NAC (N-acetilcisteína); <sup>c</sup> células pré-expostas por 24h com NAC (5 mM) e depois tratadas com o composto (59). \*  $p < 0,05$  comparado como o controle por ANOVA, seguido pelo teste Tukey.

A partir dos dados dispostos na Tabela 5, observa-se que as concentrações de GSH nas células tratadas apenas com o composto (59) apresentaram uma diminuição apreciável quando comparadas com as concentrações frente ao controle negativo. Já a concentração de GSSG aumentou. Nota-se também pelos valores da razão GSH/GSSG, que o menor valor obtido foi para o tratamento das células com apenas o composto (59), podendo-se concluir que quando menor esse valor, maior é a magnitude do estresse oxidativo na célula.

Com estes dados apresentados, conclui-se que a citotoxicidade do composto (59) pode estar relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo e peroxidação lipídica na célula.

Os testes de TBARS e dosagem de GSH para o composto (60) foram realizados com a linhagem de células do tipo MX1, célula tumoral de mama. Os dados referentes a estes testes estão dispostos na Tabela 6.

**Tabela 6:** Efeito do composto (60) sobre a glutatona reduzida (GSH) e na peroxidação lipídica, após 24h de exposição

Tratamento	Concentração	GSH ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) Mean $\pm$ S.E.M	MDA equivalents (nmol/mg protein) Mean $\pm$ S.E.M.
NC <sup>a</sup>	-	6.80 $\pm$ 0.51	3.72 $\pm$ 1.15
PC <sup>b</sup>	50 $\mu\text{M}$	2.04 $\pm$ 0.30*	26.07 $\pm$ 3.15*
Composto (60)	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~7.58 $\mu\text{M}$ )	4.52 $\pm$ 0.33*	9.25 $\pm$ 2.07*
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~15.16 $\mu\text{M}$ )	3.10 $\pm$ 0.56*	15.83 $\pm$ 2.51*

<sup>a</sup> Controle negativo (0,1% DMSO); <sup>b</sup> Controle positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); \* p < 0,05 comparado como o controle por ANOVA, seguido pelo teste Tukey

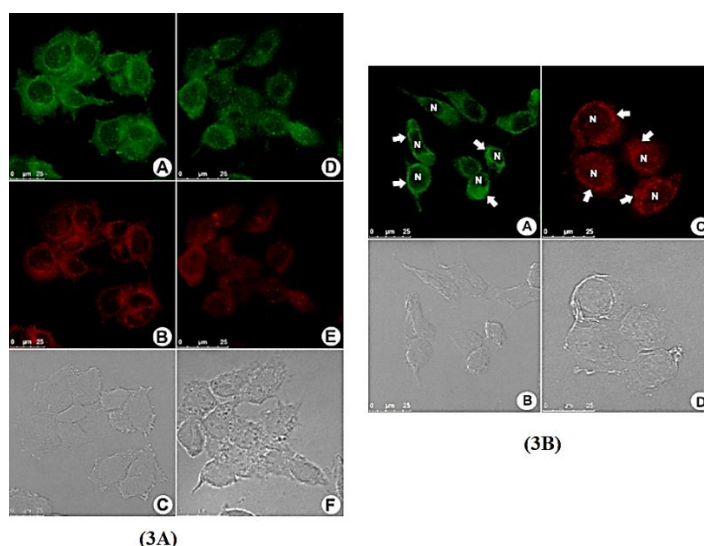
Observa-se com base nos dados que o composto (60) acarretou a diminuição de GSH no meio celular, e que a quantidade de MDA presente na célula tratada com (60) é considerável. Com isso pode-se concluir que os danos causados pelo composto (60) nessa linhagem de célula pode estar relacionado com geração de EROs, ocasionando o estresse oxidativo bem como peroxidação lipídica.



Os testes realizados com células vivas mostram emissões de fluorescência do composto (**60**) mais intensas do que as obtidas com células fixadas (Figura 32), o que sugere que a atividade do composto (**60**) frente às células tumorais pode estar relacionada com reações ocorridas na mitocôndria, gerando produtos mais fluorescentes quando comparados à (**60**).

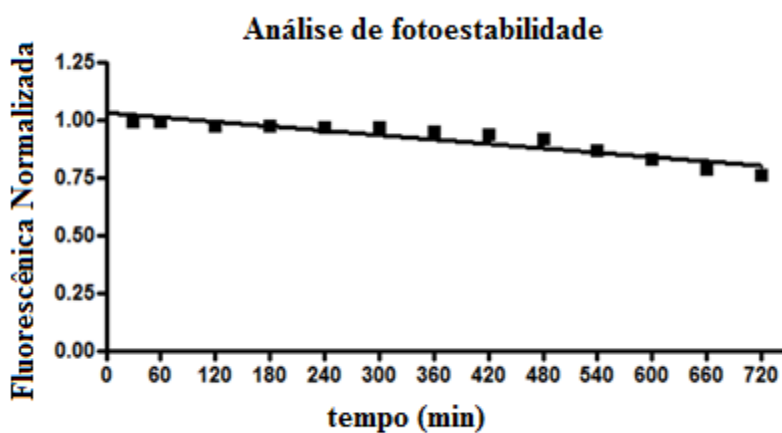
Foram realizados testes com o marcador comercial de mitocôndrias, o Mitotracker™, para confirmar o padrão de marcação do composto (**60**), utilizando linhagens de células MCF-7. Como pode ser notado na Figura 33, o padrão de marcação do composto (**60**) é bem semelhante ao padrão de marcação obtidos no ensaio de coloração com o Mitotracker™. Pode-se observar que ambos os marcadores mostram-se acumulados perto dos núcleos celulares e ligeiramente distribuídos no citoplasma da célula, o que representa uma distribuição típica de mitocôndrias neste modelo celular. As setas mostradas na Figura 30 3b, indicam a região de acumulação dos marcadores, (**60**) e Mitotracker, ambos na região do citoplasma das células.

Estes resultados mostraram que o composto (**60**), quando incubado com as células tumorais testadas, localiza-se na mitocôndria das mesmas, e que provavelmente sua atividade frente a tais células tumorais está relacionada com reações, ocasionadas por (**60**), na região da mitocôndria.



**Figura 33:** **3A:** Células MCF-7 incubadas com o composto (**60**). As imagens A e B, D e E mostram células vivas e fixadas respectivamente. As imagens C e F mostram aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase. **3B:** Células MCF-7 incubadas com (**60**) e Mitotracker™. As imagens A e C mostram o padrão de fluorescência das células incubadas com (**60**) e Mitotracker™, respectivamente. As imagens B e D mostram aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase. (barra de escala 25 μm)

Experimentos que analisam a fotoestabilidade de um fluoróforo foram realizados para o composto (**60**), como o fotobranqueamento, que é o fenômeno de destruição irreversível do fluoróforo excitado após exposição a uma fonte de luz intensa, ocasionando a perda de intensidade da luz de emissão, e diminuição do brilho de fluorescência.<sup>21</sup> Os resultados deste experimento mostraram que este fenômeno não foi detectado nas condições operacionais normais durante o processo de aquisição das imagens. A emissão de fluorescência foi estável durante as 12h de análise fotodegradativa, o que pode ser observado na Figura 34.



**Figura 34:** Ensaio de fotobranqueamento.

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Seis compostos inéditos naftoquinoidais contendo fluoróforos do tipo BODIPY foram sintetizados com sucesso, utilizando a reação do tipo “click” como metodologia sintética para conexão dos núcleos naftoquinoidais ao fluoróforos do tipo BODIPY. A caracterização destes compostos foi realizada por técnicas de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas.

Os compostos **56-60** foram submetidos a testes *in vitro* frente a diferentes linhagens de células tumorais, sendo que apenas os compostos (**59**) e (**60**) foram considerados ativos contra as linhagens de células testadas.

Os compostos inéditos (**60**) e (**61**) apresentaram características luminescentes devido à presença dos fluoróforos BODIPYs (**53**) e (**55**) em suas estruturas, e tiveram suas propriedades fotofísicas estudadas (solvatocromismo, coeficientes de absorção e emissão molar, deslocamentos de Stokes e rendimento quântico). Estes compostos são os primeiros derivados naftoquinoidais luminescentes obtidos e reportados na literatura.

Testes de localização subcelular com linhagens de células tumorais foram realizados para o composto (**60**). Os resultados mostraram que este composto se localizava na região da mitocôndria das células, com distribuição no citoplasma. Observou-se também que o composto (**60**) apresentou-se mais fluorescente em células vivas do que em células fixadas, o que pode sugerir que a atividade citotóxica deste composto está relacionada com reações, ocasionadas por (**60**), na região da mitocôndria.

Como perspectivas futuras desse trabalho, tem-se a realização de testes de atividade citotóxica e testes de localização subcelular para o composto luminescente (**61**), a fim de obter mais informações que possam colaborar e acrescentar em estudos de mecanismo de ação desta classe de compostos.





## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1. Materiais e equipamentos**

A determinação estrutural dos compostos sintetizados foi realizada através de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectrometria de massas e espectroscopia no infravermelho (IV). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos mediante a utilização de espectrômetro Bruker AVANCE DRX200 e Bruker AVANCE DPX400. Os valores de deslocamentos químicos foram listados em partes por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) dadas em hertz (Hz).

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro PerkinElmer FT-IR de feixe duplo em pastilhas de KBr anidro. Os valores para as absorções estão expressos em número de onda, utilizando-se como unidade o centímetro recíproco ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os dados de absorção e emissão foram obtidos no Espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 100 e no Espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, respectivamente, utilizando cubetas de quartzo com quatro faces polidas de 10 mm de caminho ótico e volume 3,5 mL.

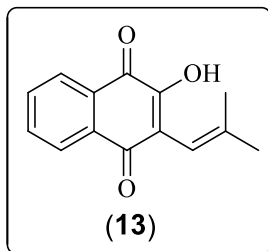
A medida do ponto de fusão foi realizada no equipamento Fisher-Johns utilizando lâminas de vidro arredondadas. As reações foram acompanhadas por CCD (cromatografia em camada delgada) de 4,0 cm de comprimento por 2,5 cm de largura de sílica gel (F254 – Merck) e utilizou-se como fase móvel um sistema de AcOEt: Hex em várias proporções. As placas CCD foram reveladas usando lâmpada ultravioleta com  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . Os compostos foram purificados via cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (Merck, 230-400 mesh - Merck) em suspensão com hexano e a fase móvel um sistema com misturas gradientes de acetato de etila e hexano.

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



## 5.2. Síntese das substâncias descritas na literatura

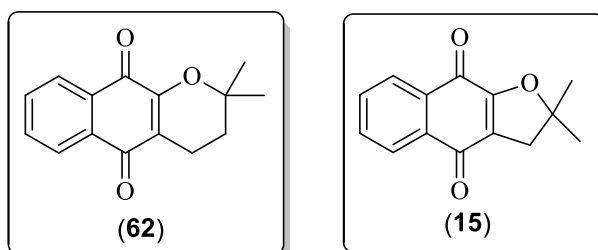
### 2-hidroxi-3-[2-metilprop-1-en-1-il] naftaleno-1,4-diona (13)<sup>39</sup> (*nor-lapachol*)



Foram adicionados lausona (**45**) (1,74 g, 10 mmol),  $\beta$ -alanina (250 mg, 2,8 mmol) e 100 mL de tolueno em um balão de fundo redondo de 500 mL contendo pedaços de porcelana. Em seguida adicionou-se ao balão uma mistura de isobutiraldeído (1,44 g, 20 mmol) e ácido acético glacial (150 mg, 2,5 mmol).

Neste sistema foram adaptados o sistema Dean- Stark e uma manta aquecedora, e a reação prosseguiu sob refluxo por uma hora. O aparato Dean- Stark coletou a água formada na reação e, após confirmação por CCD de que os reagentes já haviam sido consumidos, a reação foi encerrada. Posteriormente realizou-se a purificação utilizando extração ácido-base em funil de separação, com 250 mL de solução saturada de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). A fase aquosa de coloração roxa foi neutralizada com ácido fosfórico concentrado ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), promovendo a precipitação de um sólido alaranjado, produto da reação, que foi filtrado a vácuo, lavado com água e seco no dessecador, obtendo-se 2,19 g de *nor-lapachol* (**13**) com 96% de rendimento. O produto foi comparado por CCD com amostra autêntica de *nor-lapachol* e foi utilizado para a próxima etapa da sequência de síntese.

### $\alpha$ -Lapachona (**62**) e *nor*- $\alpha$ -Lapachona (**15**)<sup>14</sup>



À 730 mg (3 mmol) de lapachol (**9**), adicionaram-se 28 mL de HCl e 7 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . A mistura ficou sob agitação magnética à 60 °C por 4h quando observou-se, por CCD, que todo material de partida havia sido consumido.

A mistura foi vertida em um béquer contendo gelo, levando à precipitação da  $\alpha$ -lapachona (**62**), sólido amarelo, que foi filtrado sob pressão reduzida. O sólido foi seco em dessecador e em seguida purificado em coluna cromatográfica utilizando-se como fase móvel a mistura de solventes hexano: acetato de etila, aumentando a polaridade gradualmente, obtendo-se 581 mg (80 % de rendimento) de um sólido amarelo.

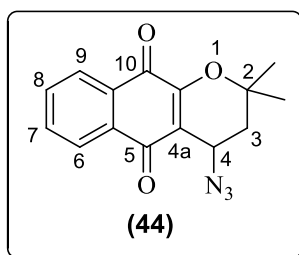
O mesmo procedimento foi realizado para se obter a nor- $\alpha$ -lapachona (**15**), a partir de 684 mg (3 mmol) de nor-lapachol (**13**). Após 4h de reação, a mistura foi extraída com acetato de etila (3 X 15 mL) em um funil de separação, a fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o solvente evaporado. O material bruto foi purificado em coluna cromatográfica utilizando-se como fase móvel a mistura de solventes hexano: acetato de etila, aumentando a polaridade da solução gradualmente, obtendo-se no final 547 mg (80% de rendimento) de um sólido amarelo.

Os produtos (**62**) e (**15**) foram comparados por CCD com amostra autêntica dos mesmos e foram utilizados para as próximas etapas da sequência de síntese.

#### **4-azido- $\alpha$ -Lapachona (44) e 3-azido-nor- $\alpha$ -Lapachona (47)<sup>12</sup>**

Em um balão de fundo redondo de 50 mL adicionaram-se 626 mg de  $\alpha$ -lapachona (**62**) (2,6 mmol) e 10 mL de CCl<sub>4</sub>. A mistura ficou sob aquecimento até atingir a temperatura de aproximadamente 75 °C. Em seguida adicionaram-se ao meio reacional 465 mg de NBS (3,12 mmol) e uma ponta de espátula de peróxido de benzoíla. A reação ficou sob refluxo, sem agitação, por 7h. Após este tempo, filtrou-se a mistura em um balão gelado, em seguida evaporou-se o CCl<sub>4</sub> obtendo um sólido amarelado. Este foi solubilizado em 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e foram adicionados 507 mg de NaN<sub>3</sub> (7,8 mmol). A mistura ficou sob agitação magnética por 24h e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD.

Após 24h encerrou-se a reação, extraiu-se a mistura em um funil de separação, com acetato de etila (3 x 15 mL) e 15 mL de água destilada. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente foi evaporado e o material bruto foi purificado em coluna cromatográfica utilizando como eluente a mistura de solventes (hexano: acetato de etila) aumentando a polaridade gradualmente, obtendo 589 mg (84 % de rendimento) de um sólido amarelo.

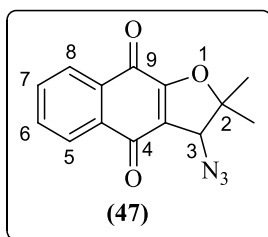


**IV (pastilha KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 2935 (C-H sp<sup>3</sup>), 2118 (N=N), 1681 (C=O)

**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm)** (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 8,16 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>9,8</sub> = 7,6 Hz e <sup>4</sup>J<sub>9,7</sub> = 1,2 Hz, H9), 8,13 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 7,6 Hz e <sup>4</sup>J<sub>6,8</sub> = 1,2 Hz, H6), 7,77 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,9</sub> = 7,6 Hz e <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 7,6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>8,6</sub> = 1,2 Hz, H8), 7,72 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 7,6 Hz e <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 7,6 Hz, H7), 4,90 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub> = 3,2 Hz e <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub> = 5,6 Hz, H4), 2,16 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 3,2 Hz e <sup>2</sup>J<sub>3,3</sub> = 14,8 Hz, H3), 2,04 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 5,6 Hz e <sup>2</sup>J<sub>3,3</sub> = 14,8 Hz, H3), 1,57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,52 ((s, 3H, CH<sub>3</sub>)).

**RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (δ, atribuição):** 184,5 (C5 ou C10), 180,5 (C5 ou C10), 155,8 (C10a), 135,1 (C7 ou C8), 134,0 (C7 ou C8), 132,5 e 131,7 (C5a e C9a), 127,2 e 127,07 (C9 e C6), 117,7 (C4a), 79,2 (C2), 50,4 (C4), 38,5 (C3), 29,6 (CH<sub>3</sub>), 26,1 (CH<sub>3</sub>).

O mesmo procedimento foi realizado para obter a azida da nor- $\alpha$ -lapachona (**47**), partindo de 228 mg (1 mmol) de nor- $\alpha$ -lapachona (**15**), obtendo no final 242 mg (90% de rendimento) de um sólido amarelo.

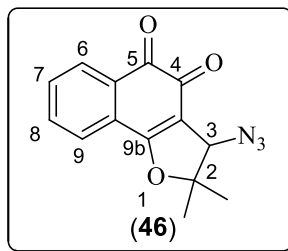


**IV (pastilha KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 2992 (C-H sp<sup>3</sup>), 2101(N=N), 1698 (C=O).

**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm)** (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 8,14 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 8 Hz, H8 e H5), 7,79 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 8 Hz, H6), 7,73 (tm 1H, <sup>3</sup>J = 8 Hz, H7), 4,85 (s, 1H, H3), 1,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (δ, atribuição):** 181,9 (C9); 178,2 (C4); 160,1 (9b), 134,7; 133,3; 132,8; 131,6; 126,6; 126,4; 120,8; 90,0 (C2); 68,39 (C3); 27,1 (CH<sub>3</sub>); 21,8 (CH<sub>3</sub>).

### 3-azido-nor- $\beta$ -Lapachona (46)<sup>40</sup>



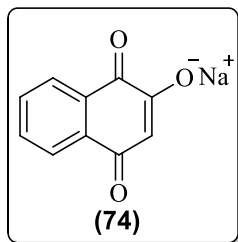
Em um balão de fundo redondo (100 mL) adicionaram-se 456 mg de *nor*-lapachol (**13**) (2 mmol) e 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A mistura foi resfriada a 0 °C, em seguida adicionou-se 1 mL de Br<sub>2</sub>, a reação ficou sob agitação a 0 °C por 5 minutos. Posteriormente o Br<sub>2</sub> bem como o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram evaporados sob pressão reduzida. Após retirar todo o Br<sub>2</sub> do meio reacional, solubilizou a mistura bruta em 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, transferiu-se para um balão de 50 mL e adicionaram-se 390 mg de NaN<sub>3</sub> (6 mmol). A reação ficou sob agitação por 24 h. Em seguida extraiu-se a com acetato de etila (3 x 15 mL) e 15 mL de água destilada em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente foi evaporado e a mistura bruta foi purificada em coluna cromatográfica, utilizando-se como eluente mistura de solventes (hexano: acetato de etila), obtendo-se 484 mg (90 % de rendimento) de um sólido alaranjado.

**IV (pastilha KBr):** 2956 (C-H sp<sup>3</sup>), 2118 (N=N), 1665 (C=O).

**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 8,15 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 8 Hz, H6); 7,73 – 7,66 (m, 3H, H7, H8 e H9); 4,79 (s, 1H, H3); 1,71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

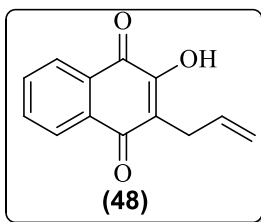
**RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** ( $\delta$ , atribuição): 180,5 (C5); 175,3 (C4); 170,2 (C9b); 134,7; 132,9; 131,3; 129,7; 126,9; 125,3; 113,7; 95,6 (C2); 67,5 (C3); 27,2 (CH<sub>3</sub>); 22,11 (CH<sub>3</sub>).

### 1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-olato de Sódio (74)<sup>14</sup>



Em um balão de fundo redondo (250 mL), adicionaram-se 5 g de lausona (29 mmol), reagente comercial, 50 mL de etanol e 1,4 g de NaOH (35 mmol) solubilizado em 10 mL de etanol. A mistura ficou sob agitação magnética por 1h, observando a mudança de aspecto da mistura que passou de uma solução laranja para uma suspensão contendo um sólido vermelho. O sólido vermelho foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico, e então seco na estufa a 70 °C, obtendo-se rendimento quantitativo.

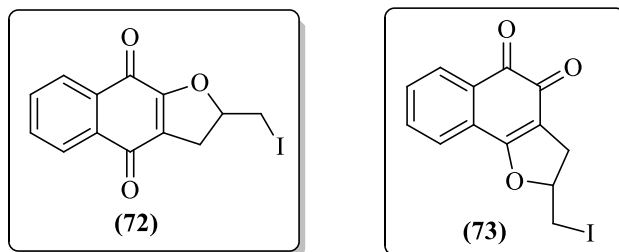
### 2-alil-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona (48)<sup>14</sup>



Em um balão de fundo redondo (250 ml), adicionaram-se 3 g de lausonato de sódio (74) (15 mmol) e 30 mL de brometo de alila. A solução ficou sob agitação por 1h, quando então adicionaram-se 70 mL de água destilada. A mistura continuou sob agitação por mais 24h, observando-se mudança de coloração do precipitado, de vermelho para amarelo.

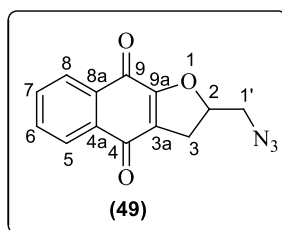
A reação foi encerrada após as 24 h, à mistura acrescentaram-se 30 ml de água destilada, em seguida realizou-se a extração líquido-líquido com acetato de etila (3 x 25 mL) em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente foi evaporado e a mistura bruta foi purificada em coluna cromatográfica utilizando como eluente a mistura de solventes (hexano: acetato de etila), obtendo-se 1,47 g (46% de rendimento) de um sólido amarelo. O produto foi comparado por CCD com amostra autêntica de (48) e foi utilizado para a próxima etapa da sequência de síntese.

**2-(iodometil)-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (72) e 2-(iodometil)-2,3-dihidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona (73)<sup>14</sup>**



Em um balão de fundo redondo (250 mL), adicionaram-se 500 mg de (48) (2,34 mmol) e 35 mL de uma solução de diclorometano contendo 800 mg de I<sub>2</sub> e 1 mL de piridina. A reação permaneceu sob agitação por 3h, e então evaporou-se o DCM e a piridina sob pressão reduzida no rota-evaporador. Em seguida adicionaram-se à mistura, 20 mL de solução saturada de NaCl, extraiu-se com acetato de etila (3 X 15 mL), a fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub>. O sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica utilizando como eluente a mistura de solventes (hexano: acetato de etila). Primeiro foi retirado da coluna cromatográfica o composto (72), sólido amarelo com 30 % de rendimento (238 mg), usando-se como eluente uma mistura de 9% de acetato de etila e 91% de hexano. Em seguida o composto (73) foi retirado da coluna usando-se como eluente uma mistura de 15% de acetato de etila e 85% de hexano, neste caso obteve-se um sólido vermelho 45 % de rendimento (358 mg). Os produtos (72) e (73) foram comparados por CCD com amostras autêntica de (72) e (73). O composto (72) foi utilizado para a próxima etapa da sequência de síntese.

**2-(azidometil)-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (49)<sup>64</sup>**



<sup>64</sup> Da Cruz, G., H., E.; Silvers, A., M.; Jardim, M., A., G.; Resende, M., J.; Cavalcanti, C., B.; Bomfim, S., I.; Pessoa, C.; Simone, A., C.; Botteselle, V., C.; Braga, L., A.; Nair, K., D.; Namboothiri, N., N., I.; Boothman, A., D.; Da Silva Junior, N., E. Synthesis and antitumor activity of selenium-containing quinone-based triazoles possessing two redox centres, and their mechanistic insights, *Eurp. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 1-16

Em um balão de fundo redondo (50 mL), adicionaram-se 340 mg de **(72)** (1 mmol) e 20 mL de DMF e após solubilização total, 100 mg de NaN<sub>3</sub> (1,5 mmol) foram adicionados. A mistura foi mantida sob agitação por 24h. Após este tempo encerrou-se a reação, adicionando 20 ml de água destilada à mistura que foi então extraída em funil de separação, com acetato de etila (3 x 15 mL), A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub>, o solvente evaporado e o sólido impuro obtido foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando como eluente mistura de solventes (hexano: acetato de etila), obtendo 111 mg (43 % de rendimento) de um sólido amarelo.

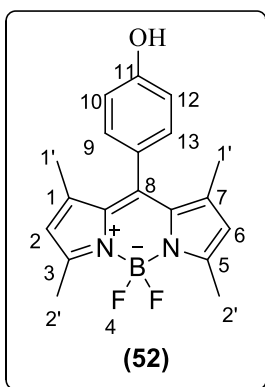
**Temperatura de Fusão:** 125 – 127 °C

**IV (pastilha KBr):** 2956 (C-H sp<sup>3</sup>), 2100 (N=N), 1672 (C=O).

**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 8,10 – 8,07 (m, 2H, H8 e H5); 7,75 – 7,68 (m, 2H, H7 e H6); 5,22 – 5,15 (m, 1H, H2); 3,77 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>1',2</sub> = 4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1',1'</sub> = 13,6 Hz, H1'); 3,58 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>1',2</sub> = 4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1',1'</sub> = 13,6 Hz, H1'); 3,32 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>3a,3b</sub> = 12 Hz, H3); 3,10 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>3a,3b</sub> = 12 Hz, H3).

**RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** (δ, atribuição): 182,8 (C9); 178,0 (C4); 160,4 (C9a); 135,0 (C8 ou C5); 133,9 (C8 ou C5); 133,7; 132,2; 127,17 (C7 ou C6); 126,8 (C7 ou C6); 124,9; 84,4 (C2); 54,6 (C1'); 30,9 (C3).

***meso*-(4-hidroxifenil)-*α*-(3,5-dimetil)-*β*-(1,7-dimetil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (**52**)<sup>42</sup>**



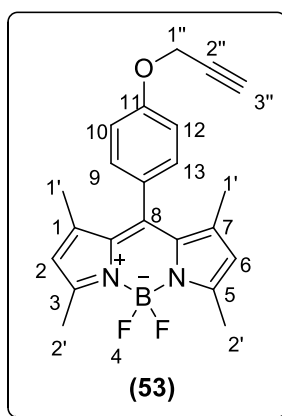
Em um balão de fundo redondo (500 mL), adicionaram-se 366 mg de 4-hidroxibenzaldeído (3 mmol), 70 mL de tetraidrofurano (THF) seco, 0,7 mL de 2,4-dimetilpirrol (6,6 mmol) e 15 gotas de TFA. A solução permaneceu sob agitação e atmosfera inerte por 14h, observando-se mudança de cor da mistura de laranja para vermelho escuro.

Após as 14h adicionou-se à mistura reacional uma solução de DDQ (680 mg, 3 mmol) em 100 mL THF, observando-se uma mudança de cor de vermelho para marrom escuro. A solução ficou sob agitação por mais 5h. Em seguida acrescentaram-se lentamente 9 mL de Et<sub>3</sub>N à solução, que ficou sob agitação por 30 minutos e então adicionaram-se 9 mL de BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub>. A solução permaneceu sob agitação e atmosfera inerte por mais 18h. Após as 18h o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, o sólido obtido foi solubilizado em 100 mL de diclorometano e a solução foi extraída em um funil de separação, com 100 mL de uma solução aquosa 5% de NaHCO<sub>3</sub> e com água destilada (2 x 100 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO<sub>4</sub> e o solvente evaporado. O material bruto foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se hexano: acetato de etila como fase móvel, aumentando a polaridade gradualmente, obtendo-se 380 mg (37% de rendimento) de um sólido vermelho.

**RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 7,12 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8 Hz, H9 e H13); 6,95 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8 Hz, H10 e H12); 5,98 (s, 2H, H2 e H6); 2,56 (s, 6H, H2'); 1,45 (s, 6H, H1').

**RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** (δ, atribuição): 156,5; 155,4; 143,3; 141,9; 131,9; 129,5 (C9 e C13); 127,2; 121,2 (C2 e C6); 116,2 (C10 e C12); 14,6 (C1' e C2').

**meso-(4-prop-2-inil-1-oxifenil)-α-(3,5-dimetil)-β-(1,7-dimetil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (53)**<sup>43</sup>



Em um balão de fundo redondo (50 mL), adicionaram-se 34 mg (0,1 mmol) de (52), 20 mL de acetona (seca), 0,47 mL de brometo de propargila e 41,4 mg (0,3 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A reação permaneceu sob agitação e refluxo por 7h e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD. Após as 7h o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, o sólido





obtido foi solubilizado em diclorometano (30 mL) e a fase orgânica foi lavada, em um funil de separação, com água destilada (3x 25mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o diclorometano foi evaporado e o material bruto foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se como eluente a mistura de solventes hexano : acetato de etila, aumentando a polaridade gradualmente. Obteve-se 17 mg (43 % de rendimento) de um sólido rosa.

**RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 7,20 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, H9 e H13); 7,10 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, H10 e H12); 5,98 (s, 2H, H2 e H6); 4,76 (d, 2H, <sup>4</sup>J<sub>1'',3''</sub> = 2 Hz, H1''); 2,56 (s, 7H, H2' e H3'); 1,43 (s, 6H, H1').

**RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** (δ, atribuição): 158,1; 155,4; 143,1; 131,8; 129,7 (C9 e C13), 128,0; 121,2 (C2 e C6); 115,7 (C10 e C12); 78,0 (C2''); 75,9 (C3''); 55,9 (C1''); 14,6 (C1' e C2').

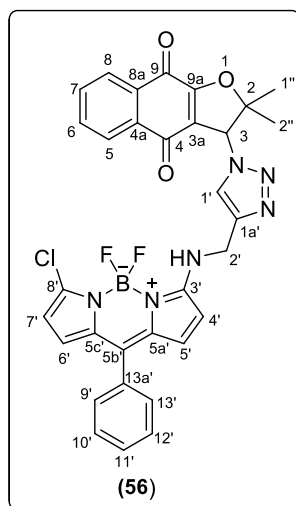
### 5.3. Procedimento geral para síntese dos triazóis inéditos 56-61

Em um balão de fundo redondo (50 mL) adicionou-se a azida correspondente (1,5 equivalente), o BODIPY-alcino (1 equivalente) e 20 mL de acetonitrila. Após solubilização total dos reagentes, adicionou-se iodeto de cobre (CuI 10 mol %). A mistura reacional ficou sob agitação e atmosfera inerte até total consumo do alcino, sendo o desenvolvimento da reação acompanhado por CCD. Após o término da reação o solvente foi evaporado e o sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase estacionária sílica e fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila, aumentando a polaridade gradualmente.



UFMG

**7-cloro-3-(((1-(2,2-dimetil-4,9-dioxo-2,3,4,9-tetrahidronafto[2,3-b]furan-3-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-5,5-difluoro-10-fenil-5H-dipirrólo[1,2-c:2',1'f][1,3,2]diazaborin-4-ium-5-ídeo (56)**



**Tempo de reação:** 18h

**Aspecto:** Sólido marrom

**Rendimento:** 83%

**Temperatura de Fusão:** 173 – 175 °C

**IV (pastilha KBr):** 2923 (C-H sp<sup>3</sup>), 1615 (C=O).

**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 8,16 a 8,14 (m, 1H, H8); 8,05 a 8,03 (m, 1H, H5); 7,75 a 7,73 (m, 2H, H7 e H6); 7,59 (s, 1H, H1'); 7,48 a 7,44 (m, 5H, H9' a H13'); 6,86 (d, 1H, J<sub>7',6'</sub>=4 Hz, H7'); 6,82 (sl, 1H, NH); 6,35 (d, 1H, J<sub>4',5'</sub>=4 Hz, H4'); 6,29 (d, 1H, J<sub>5',6'</sub>=4 Hz, H5'); 6,18 (d, 1H, J<sub>6',7'</sub>=4 Hz H6'); 6,00 (s; 1H; H3); 1,74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,16 (s, 3H; CH<sub>3</sub>).

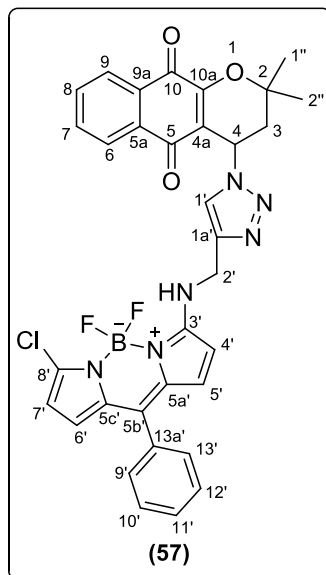
**RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** (δ, atribuição): 180,9 (C4); 179,8 (C9); 177,8 (C9a); 144,6; 135,9; 134,8; 135,9; 134,8; 133,6; 133,5; 131,9; 131,7; 130,5; 130,3; 129,3; 128,2; 127,2; 126,8; 126,5; 121,9; 121,1; 118,1; 94,3(C2); 67,8 (C3); 40,4 (C2'); 27,5 e 21,0 (C1'' e C2'').

**EI/HRMS:(m/z)** [M+Na]<sup>+</sup>encontrada: 647,1551; massa calculada [C<sub>32</sub>H<sub>24</sub>BClF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Na]<sup>+</sup>: 647,1557.



UFMG

**7-cloro-3-(((1-(2,2-dimetil-5,10-dioxo-3,4,5,10-tetrahidro-2H-benzo[g]cromen-4-il)-1H  
1,2,3-triazol-4-il)methyl)amino)-5,5-difluoro-10-fenil-5H-dipirrólo[1,2-  
c:2',1'f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-ídeo (57)**



**Tempo de reação:** 18h

**Aspecto:** Sólido marrom

**Rendimento:** 72%

**Temperatura de Fusão:** 171 – 173 °C

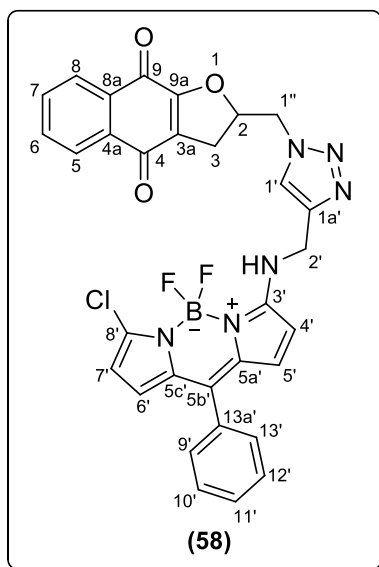
**IV (pastilha KBr):** 2923 (C-H  $sp^3$ ), 1623 (C=O).

**RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm)** (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 8,12 a 8,10 (m, 1H, H9); 7,95 a 7,93 (m, 1H, H6); 7,69 a 7,67 (m, 3H, H7, H8, H1'); 7,47 a 7,42 (m, 3H, H9', H10', H11', H12', H13'); 6,87 (d, 1H,  $J_{7',6'}=4.4$  Hz, H7'); 6,81 (sl, 1H, NH); 6,35 a 6,32 (m, 2H, H6' e H5'); 6,17 (d, 1H,  $J_{4',5'}=3,6$  Hz, H4'); 5,78 (t, 1H,  $J_{4,3}=6,6$  Hz, H4); 4,74 (d, 2H,  $J_{2',NH}=6$  Hz, H2'); 2,72 (dd, 1H,  $J_{3a,3b}=14.6$  Hz,  $J_{3a,4}=6.8$  Hz, H3a); 2,40 (dd, 1H,  $J_{3b,3a}=14.6$  Hz,  $J_{3b,4}=6.8$  Hz, H3b); 1,50 (s, 3H,  $CH_3$ ); 1,35 (s, 3H,  $CH_3$ ).

**RMN de  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ) ( $\delta$ , atribuição):** 182,8 (C10); 179,3 (C5); 161,9 (C10a); 156,2; 143,8; 135,9; 134,5; 133,7; 133,5; 132,7; 131,9; 131,8; 131,1; 131,30; 129,4; 128,3; 126,7; 126,4; 122,3; 120,9; 115,1; 112,9; 111,2; 79,3 (C2); 50,2 (C4); 40,5 (C2'); 39,33 (C3); 26,9 ( $CH_3$ ); 26,2 ( $CH_3$ ).

**EI/HRMS:** ( $m/z$ ) [ $M+Na$ ] $^+$  encontrada: 661,1704; massa calculada [ $C_{33}H_{26}BClF_2N_6NaO_3$ ] $^+$ : 661,1714.

**7-cloro-3-(((1-((4,9-dioxo-2,3,4,9-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-yl)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)metil)amino)-5,5-difluoro-10-fenil-5H-dipirrólo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-ídeo (58)**



**Tempo de reação:** 18h

**Aspecto:** Sólido marrom

**Rendimento:** 88%

**Temperatura de Fusão:** 165 -168 °C

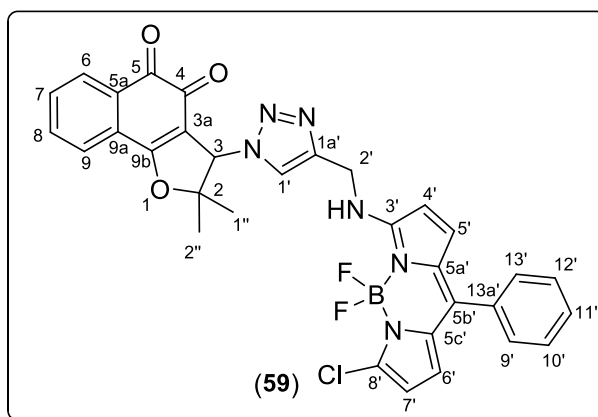
**IV (pastilha KBr):** 2931 (C-H sp<sup>3</sup>), 1623 (C=O).

**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 7,94 (d, 1H, J<sub>8,7</sub>= 7,6 Hz, H8); 7,91 (d, 1H, J<sub>5,6</sub>=7,6 Hz; H5); 7,84 (s, 1H; H1'); 7,61 (t, 1H, J<sub>7,8</sub>= 7,6 Hz, J<sub>7,6</sub>=7,2 Hz, H7); 7,55 (t, 1H, J<sub>6,5</sub>=7,6 Hz, J<sub>6,7</sub>=7,2 Hz, H6) 7,48 a 7,45 (m, 5H, H9' a H13'); 7,09 (sl, 1H, NH); 6,85 (d, 1H, J<sub>7',6'</sub>= 4,8 Hz, H7'); 6,41 (d, 1H, J<sub>6',7'</sub>= 4,8 Hz, H6'); 6,33 (d, 1H, J<sub>5',4'</sub>= 4 Hz, H5'); 6,16 (d, 1H, J<sub>4',5'</sub>= 4 Hz, H4'); 5,40 (m, 1H, H2); 4,82 (d, 2H, J<sub>1'',2''</sub>=5,2 Hz, H1''); 4,78 (d, 2H, J<sub>2',NH</sub>= 6,4 Hz, H2'); 3,41 a 3,34 (m, 1H, H3a); 3,04 a 2,97 (m, 1H, H3b).

**RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** (δ, atribuição):181,7 (C9); 177,3 (C4); 161,9 (C9a); 159,1; 144,7; 135,9; 134,2; 133,7; 133,4; 133,1; 132,6; 132,2; 131,9; 131,3; 130,3; 129,8; 129,3; 128,3; 126,2; 125,2; 124,2; 123,7; 120,4; 112,8; 111,4; 83,2 (C2); 53,0 (C2); 40,0 (C2'); 30,2 (C3).

**EI/HRMS:(m/z)** [M+Na]<sup>+</sup>encontrada: 633,1386; massa calculada [C<sub>31</sub>H<sub>22</sub>BClF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>: 633,1401.

**7-cloro-3-(((1-(2,2-dimetil-4,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidronafto[1,2-b]furan-3-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-5,5-difluoro-10-fenil-5H-dipirrólo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-ídeo (59)**



**Tempo de reação:** 48h

**Aspecto:** Sólido marrom

**Rendimento:** 73%

**Temperatura de Fusão:** 190 – 193 °C

**IV (pastilha KBr):** 2929 (C-H  $sp^3$ ), 1610 (C=O).

**RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm)** (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 7,96 (d, 1H,  $J_{6,7}=7,2$ Hz, H6); 7,83 a 7,79 (m, 2H, H9 e H1'); 7,73 (t, 1H,  $J_{8,9}$  e  $J_{8,7}=7,2$ Hz, H8); 7,65 (t, 1H  $J_{7,8}$  e  $J_{7,6}=7,2$ Hz, H7); 7,46 a 7,42 (m, 5H, H9' a H13'); 6,89 (sl, 1H, NH); 6,84 (d, 1H,  $J_{7,6'}=4$  Hz, H7'); 6,34 (sl, 2H, H4' e H5'); 6,14 (sl, 1H, H6'); 6,00 (sl, 1H, H3); 4,74 (d, 1H,  $J_{2',NH}=4,4$  Hz); 1,77 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,17 (s, 3H,  $CH_3$ ).

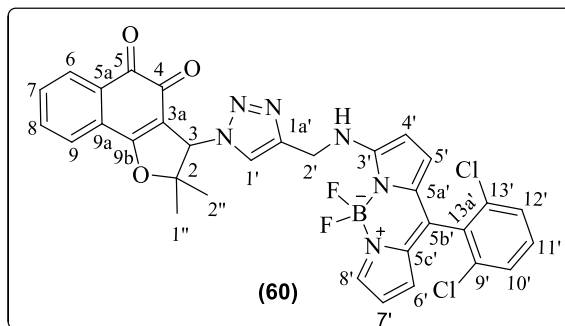
**RMN de  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ) ( $\delta$ , atribuição):** 180,2 (C5); 174,9 (C4); 171,4 (C9b); 161,8; 144,3; 136,0 (C7'); 134,6 (C8); 133,7; 133,2 (C7); 132,4; 131,9; 131,6; 130,3 (C10' e C12'); 120,8; 129,3; 128,3 (C9' e C13'); 126,8; 125,6 (C9); 122,3 (C1'); 120,5; 112,8 (C6'); 111,4; 95,9 (C2); 67,1 (C3); 40,4 (C2'); 27,68 e 21,25 (C2'' e C1'').

**EI/HRMS:** ( $m/z$ )  $[M+Na]^+$  encontrada: 647,1521; massa calculada  $[C_{32}H_{24}BCIF_2N_6O_3Na]^+$  : 647,1557.



UFMG

**10-(2,6-diclorofenil)-7-(((1-(2,2-dimetil-4,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidronafto[1,2-b]furan-3-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-5,5-difluoro-5H-dipirrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-ídeo (60)**



**Tempo de reação:** 20h

**Aspecto:** Sólido vinho

**Rendimento:** 79%

**Temperatura de Fusão:** 179 – 183 °C

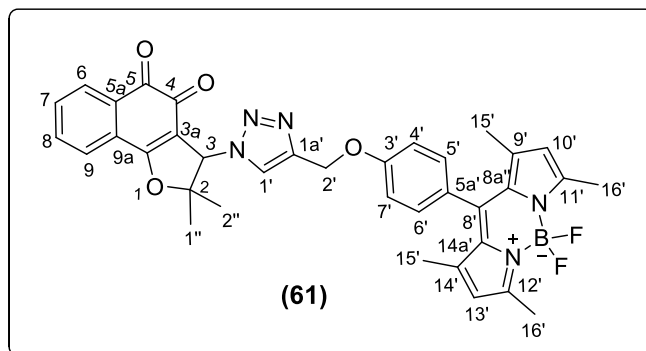
**IV (pastilha KBr):** 2980 (C-H  $sp^3$ ), 1614 (C=O).

**RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm)** (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 8,09 (d, 1H,  $^3J_{6,7} = 7,6$  Hz, H6); 7,79 (d, 1H,  $J_{9,8} = 7,2$  Hz, H9); 7,74 (m, 1H, H7); 7,69 a 7,65 (m, 2H, H8 e H1'); 7,42 (m, 2H, H10' e H12'); 7,34 (d, 1H,  $J = 8$  Hz, H11'); 7,31 (sl 1H, H8'), 6,96 (sl, 1H, NH); 6,65 (d 1H,  $J = 4,4$  Hz, H4'); 6,33 (d, 1H,  $J = 4,4$  Hz, H5'); 6,25 (t, 1H,  $^3J_{7',8'} = ^3J_{7',6'} = 3,6$  Hz H7'); 6,13 (d, 1H,  $^3J_{6',7'} = 3,6$  Hz H6'); 5,98 (s, 1H, H3); 4,71 (sl, 2H, H2'); 1,76 (s, 3H,  $CH_3$ ); 1,16 (s, 3H,  $CH_3$ ).

**RMN de  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ) ( $\delta$ , atribuição):** 180,3 (C5); 174,8 (C4); 171,5 (C9b); 162,4 (C3'); 144,6 (C1a'); 136,1; 136,0; 134,8 (C7); 134,7 (C4'); 133,9; 133,3 (C8); 132,0; 131,6; 131,5 (C6'); 131,3; 130,5 (C11'); 129,9 (C6); 128,1 (C12' e C10'); 127,0; 126,7; 125,7 (C9); 121,2 (C1'), 118,7 (C6'); 113,7 (C7'); 112,0 (C5'); 111,2 (C3a); 95,9 (C2); 67,2 (C3); 40,2 (C2'); 25,7 ( $CH_3$ ); 21,2 ( $CH_3$ ).

**EI/HRMS:** (m/z)  $[M+Na]^+$  encontrada: 681,1141; massa calculada  $[C_{32}H_{23}BCl_2F_2N_6NaO_3]^+$ : 681,1168.

**10-(4-((1-(2,2-dimetil-4,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidronafto[1,2-b]furan-3-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-dipirrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborin-4-ium-5-ídeo (61)**



**Tempo de reação:** 48h

**Aspecto:** Sólido vinho

**Rendimento:** 70%

**Temperatura de Fusão:** 176 – 179,5 °C

**IV (pastilha KBr):** 2929 (C-H sp<sup>3</sup>), 1655 (C=O)

**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuições): 8,21 (d, 1H, J<sub>6,7</sub> = 7,2Hz, H6); 7,83 (t, 1H, J = 7,2 Hz, H9); 7,79 a 7,73 (m, 2H, H7 e H8); 7,64 (s, 1H, H1'); 7,18 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H6' e H5'); 7,09 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H7' e H4'); 6,03 (s, 1H, H3); 5,98 (s, 2H, H10' e H13'); 5,24 (d, 2H, J = 4 Hz, H2'); 2,56 (s, 6H, H15' ou H16'); 1,80 (s, 3H, H1'); 1,41 (s, 6H, H15' ou H14'); 1,22 (s, 3H, H2').

**RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** (δ, atribuição): 180,1 (C5); 174,6 (C4); 171,4 (C9a); 158,9; 155,5; 143,9; 143,2; 141,7; 135,0; 133,6; 131,9; 131,7; 130,2 (C6); 129,4 (C4' e C7'); 127,9; 126,7; 125,7; 122,5; 121,3 (C1'); 115,6 (C6' e C5'); 111,2 (C3a); 96,0 (C2); 67,2 (C3); 62,3 (C2'); 27,8 (C1''); 21,34 (C2''); 14,6 (C15' e C16').

**EI/HRMS:** (m/z) [M+Na]<sup>+</sup>encontrada: 670,2401; massa calculada [C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 670,2413.

## 5.4. Estudo Fotofísico

### 5.4.1. Solvatocromismo

Os estudos de solvatocromismo dos compostos **(60)** e **(61)** foram realizados utilizando 6 diferentes solventes: DMSO, metanol, acetonitrila, acetato de etila, diclorometano e tolueno. Primeiramente foram preparadas soluções iniciais dos compostos em diclorometano, de concentração  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Posteriormente, com auxílio de uma pipeta volumétrica automática transferiu-se  $100 \mu\text{L}$  destas soluções para balões volumétricos de 10 mL. Após o solvente ter evaporado completou-se o volume para 10 mL com os solventes citados acima, obtendo-se soluções com concentrações de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Foram realizadas as leituras de absorção e emissão (a amostra foi excitada no comprimento de onda referente ao máximo de absorção) das soluções nos 6 diferentes solventes, obtendo-se seus respectivos espectros de absorção e emissão.

### 5.4.2. Rendimento quântico

Preparou-se inicialmente uma solução de  $6 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de fluoresceína em NaOH  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , que foi usada como referência. Para aquisição dos espectros de absorção e emissão deste composto foram preparadas 7 soluções em diferentes concentrações a partir da solução inicial de  $6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . A partir destas 7 soluções foram obtidos os espectros de absorção e emissão para a fluoresceína.

Para os compostos **(60)** e **(61)** foram preparadas 6 soluções em DMSO com diferentes concentrações. Para cada composto, foram transferidos volumes de  $100 \mu\text{L}$ ,  $90 \mu\text{L}$ ,  $80 \mu\text{L}$ ,  $60 \mu\text{L}$ ,  $40 \mu\text{L}$  e  $20 \mu\text{L}$ , da solução de  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em diclorometano, para balões volumétricos de 10 mL. Após o solvente ter evaporado completou-se os volumes com DMSO. Foram realizadas leituras de absorção e emissão das soluções preparadas, obtendo seus respectivos espectros de absorção e emissão.

Com os dados obtidos a partir dos espectros de emissão e absorção, tanto do composto de referência e dos compostos **(60)** e **(61)**, foram construídos gráficos relacionando o máximo de absorção com a área do espectro de emissão.



## 5.5. Atividade antitumoral

### 5.5.1. Teste MTT <sup>65</sup>

#### *Testes com os triazóis (56-59)*

Os triazóis **56-59**, foram testados frente a 4 tipos de linhagens de células, PC3 (próstata), SF295 (Glioblastoma) e HCT-116 (cólon) e SF295 (célula normal-fibroblastos murinos), que foram obtidas a partir do Instituto Nacional de Câncer, NCI. Todas as linhagens de células foram mantidas em meio RPMI 1640, e os meios de culturas foram suplementados com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

O crescimento celular foi quantificado através da capacidade de células vivas reduzirem o corante MTT amarelo em um produto formazano púrpura. Para os experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (0,7 x 10<sup>5</sup> a 0,3 x 10<sup>6</sup> células / poço, para células cancerosas e 0,5 x 10<sup>5</sup> células / poço para fibroblastos de murino), e os compostos testados (0,04-40,92 µM) dissolvidos em DMSO (0,1%), foram então adicionados a cada poço, seguido de incubação durante 24 h.

Em algumas experiências, a contribuição de EROs para a citotoxicidade dos compostos testados foi avaliada por células co-tratadas com GSH-OEt (15 mM). Experiências preliminares demonstraram que o éster etílico de GSH não foi citotóxico e fornecia uma proteção mais eficaz do que a GSH na mesma concentração (15 mM). A GSH não é facilmente transportada para a maioria das células. Assim, nos ensaios MTT, utilizou-se éster etílico de GSH, que é mais lipofílica, facilmente absorvido pelas células e hidrolisado de GSH por esterases inespecíficas celulares.<sup>66</sup>

Em seguida as placas foram centrifugadas e o meio substituído por meio fresco (150 µL) contendo 0,5 mg / ml de MTT. Três horas após, o produto de formazano de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO, e a absorvância foi medida utilizando um leitor multiplacas (Contagem Spectra, Packard, Ontário, Canadá). O efeito da droga foi quantificada como a percentagem da absorvância do corante reduzido controle a 595 nm. As experiências foram realizadas em triplicada e repetidas pelo menos três vezes.

<sup>65</sup> T. J. Mosmann, *Immunol. Methods*. **1983**, 65, 55-63

<sup>66</sup> Baglolle, C. J., Bushinsky, S. M., Garcia, T. M., Kode, A., Rahman, I., Sime, P. J., and Phipps, R. P. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: Implications for emphysema. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2006**, 291, 19–29.

### **Teste MTT com o triazol (60)**

O composto (60), foi testado frente a 17 tipos de linhagens de células, sendo referentes a 7 tipos de câncer: próstata, leucemia, cólon, mama, glioblastoma, melanona e pulmão, e contra células normais do tipo PBMC (células mononucleares de sangue periférico).

O crescimento das células tumorais foram quantificadas pela capacidade das células vivas em reduzir o corante amarelo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) a um produto de formazano púrpura. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (0,1 x 10<sup>6</sup> células / ml) e o composto (61) dissolvido em DMSO. Em seguida adicionou-se a cada placa poço o composto (61) numa concentração final de 200 µM. O grupo de controle recebeu a mesma quantidade de veículo. Após 60 minutos de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio fresco contendo MTT (0,5 mg / mL). Depois de três horas, o produto de formazano de MTT foi dissolvido em 150 mL de DMSO e a absorbância foi medida a 595 nm (DTX-880, Beckman Coulter®). A concentração final de DMSO no meio de cultura foi mantida constante, abaixo de 0,1% (v / v). Todos os tratamentos com as células foram realizadas com três repetições

### **5.5.2. Análise do conteúdo de glutathiona reduzida**

A glutathiona total (GSH a GSSG) foi determinada por experimentos espectrofotométricos, analisando o 5-tio-2-nitrobenzoato de metilo (TNB), que foi produzido a partir de DTNB, de acordo com Akerboom e Sies (1981) com pequenas modificações.<sup>67</sup>

As células foram expostas com aos compostos (59) e (60) testados (5 µM) durante 24 h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS gelado e ressuspensas em fosfato de sódio 0,1 (5 mM de EDTA, pH 8,0), e sonicadas para se obter o homogeneizado celular. Um volume igual de 2 M HClO<sub>4</sub>-4mM EDTA foi adicionado ao extrato de células, e as proteínas precipitadas foram sedimentadas por centrifugação a 8000 x g durante 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi neutralizado com KOH 2 M, e o resíduo insolúvel foi removido por centrifugação sob as mesmas condições. Para a determinação espectrofotométrica, 910 µL de extrato celular sobrenadante ou da solução de glutathiona padrão, no mesmo tampão de

---

<sup>67</sup> Akerboom, T., and Sies, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth. in enzym.* **1981**, 77, 373–382.



UFMG

fosfato-EDTA, foram misturados com 50 uL de 4 mg / mL NADPH em 0,5% (w / v) de NaHCO<sub>3</sub>, 20 mL de 6 U / mL de glutatona redutase em tampão de fosfato-EDTA, e 20 pL de 1,5 mg / ml de DTNB em 0,5% de NaHCO<sub>3</sub>. O aumento na absorvância foi medida a 412 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.<sup>68</sup> O teor total de glutatona foi determinado como µg de proteína / mg. Para a determinação da GSSG, 4-vinilpiridina foi adicionado a uma concentração final de 0,1% (v / v), e, em seguida, incubadas durante 1 h à temperatura ambiente. Nesta concentração, 4-vinilpiridina é capaz de reagir com todos GSH sem interferir com a determinação de GSSG. GSH foi determinada com base no total de glutatona e GSSG resultados da concentração.

A fim de avaliar a contribuição de EROs no teor de glutatona, as células foram pré-tratadas durante 24 h com NAC (5 mM), e depois de terem sido expostos ao composto de ensaio durante 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experiências independentes

### 5.5.3. Teste TBARS<sup>69</sup>

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da reação de ácido tiobarbitúrico (TBA) com malondialdeído (MDA). Os ensaios foram realizados de acordo com Salgo Pryor, com modificações. As células foram incubadas com os compostos (59) e (60) (5 e 10 µg / ml) durante 24 h e, em seguida, lisadas com Tris-HCl a 15 durante 1 h. Dois mL de de uma solução de ácido tricloroacético (0,4 mg / mL) e HCl (0,25 M) foram adicionados ao lisado, que foi então incubado com 7 mg de TBA / mL durante 15 min a 100 °C. A mistura foi centrifugada a 900 g durante 15 min. Como TBA reage com outros produtos de peroxidação lipídica, em adição ao MDA, os resultados são expressos em termos de espécies reactivas tiobarbitúrico (TBARS), que são determinados por absorvância a 532 nm. O hidrolisado 1,1,3,3-tetrametoxipropano foi usado como o padrão. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

---

<sup>68</sup> Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**,193, 265–275.

<sup>69</sup> M. G. Salgo, W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 333, 482-488

## 5.6. Testes de Marcação

### 5.6.1. Cultura das células

Foram utilizadas 4 tipos de células para os testes de marcação subcelular do composto, (60) MCF-7, MDA-MB231, T47-D (linhagens de células de câncer de mama) e PANC-1 (câncer de pâncreas). As linhagens das células foram mantidas em meio de cultura apropriado, recomendado pela ATCC (American Type Culture Collection), contendo 10% de soro fetal bovino, 100 UI mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina a 37 °C, sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

### 5.6.2. Ensaio de fluorescência

Primeiramente as células foram semeadas em lâminas de vidros de 13 mm, na parte inferior de uma placa contendo 24 cavidades. As células foram aderidas às lamina durante a noite, e então lavou-se três vezes com meio isento de soro para remoção das células que não foram aderidas. Após atingir a confluência, as células foram separadas em duas amostras (vivas e fixadas).

As amostras vivas foram incubadas durante 30 min com o composto (60) (1 µM) a 37 °C, e então lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e fixadas em formaldeído a 3,7% durante 30 min. Posteriormente as amostras foram lavadas novamente com PBS 1X (pH 7.4) à temperatura ambiente e então as lâminas foram montadas sobre lâminas de vidros usando Prolongar Antifade Gold (Invitrogen, OR, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

O controle negativo foi realizado com a incubação das amostras em 0,01 % de DMSO, que foi usado como diluente. As amostras foram analisadas utilizando o aparelho Leica Confocal Microscopy TCS SP5, em um comprimento de onda de 488 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicadas.

### 5.6.3. Teste de co-coloração do composto (60) e Mitotracker

A fim de confirmar as evidências da acumulação do composto (60) na região das mitocôndrias, foi realizado o ensaio de co-coloração de C17-29 e do Mitotracker<sup>TM</sup>, marcador comercial para mitocôndrias (ThermoFisher Scientific, Nova Iorque, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.



$3 \times 10^5$  células MCF-7 (células de adenocarcinoma da mama humano) foram semeadas em lâminas de 13 mm de vidro redondas, sobre o fundo de uma placa de 24 cavidades. Deixou-se aderir durante a noite e lavou-se três vezes com meio isento de soro para a remoção de células não aderentes. Depois de atingir a confluência, as amostras foram incubadas em  $1 \mu\text{M}$  de 7 ou 100 nM de Mitotracker<sup>TM</sup>, durante 30 minutos, a 37 °C. As amostras foram lavadas três vezes em PBS (tampão de fosfato salino), pH 7,4 a 37 °C e as células foram fixadas em solução de formaldeído à 3,7%, durante 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas novamente com PBS 1X (pH 7.4) à temperatura ambiente e então as lâminas foram montadas sobre lâminas de vidros usando Prolongar Antifade Gold (Invitrogen, OR, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

O controle negativo foi realizado por incubação de amostras em 0,01% de DMSO, solvente utilizado para solubilizar (**60**). As amostras foram analisadas utilizando o aparelho Leica Confocal Microscopy TCS SP5. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foram feitos em três repetições independentes.

#### **5.6.4. Ensaio de Fotobranqueamento**

O composto (**60**) ( $1 \mu\text{M}$ ) foi colocado em uma placa de 96 poços. As medidas de fluorescência foram registradas a cada 5 minutos em um período total de 12 h, (Ex / Em = 480 / 520-560 nm) sob uma fonte de luz de halogênio de tungstênio. Os valores foram representados como médias ( $n = 3$ ) e equipados de uma regressão não linear de decaimento exponencial de uma fase utilizando GraphPad Prism 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, EUA).



## **APÊNDICE**

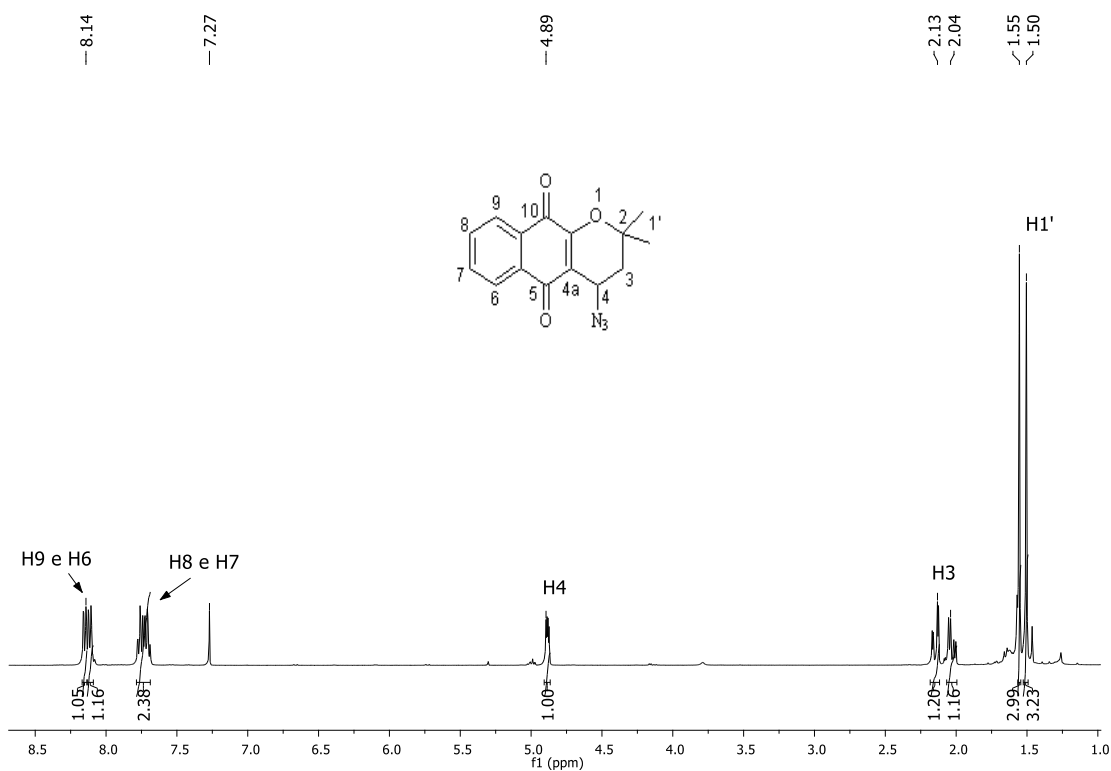


Figura 35: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (44) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

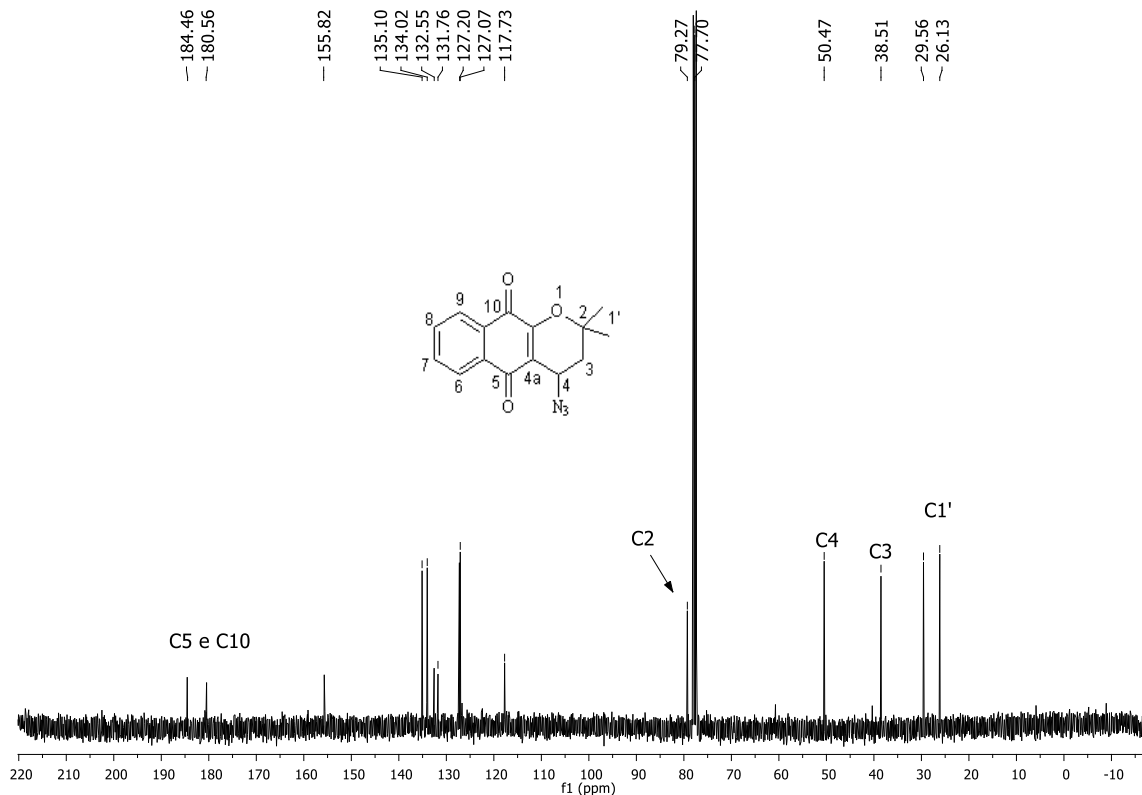
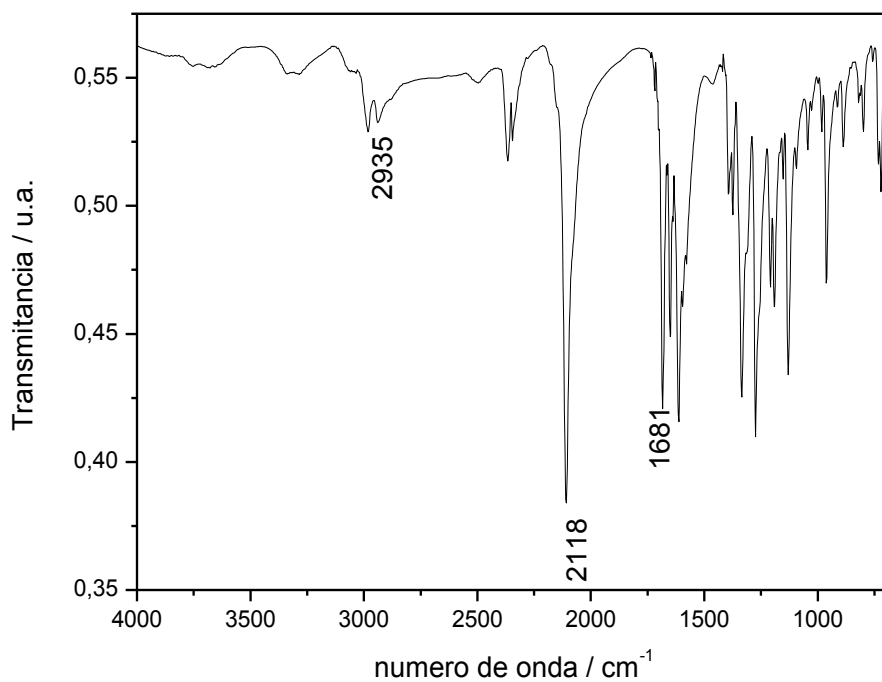
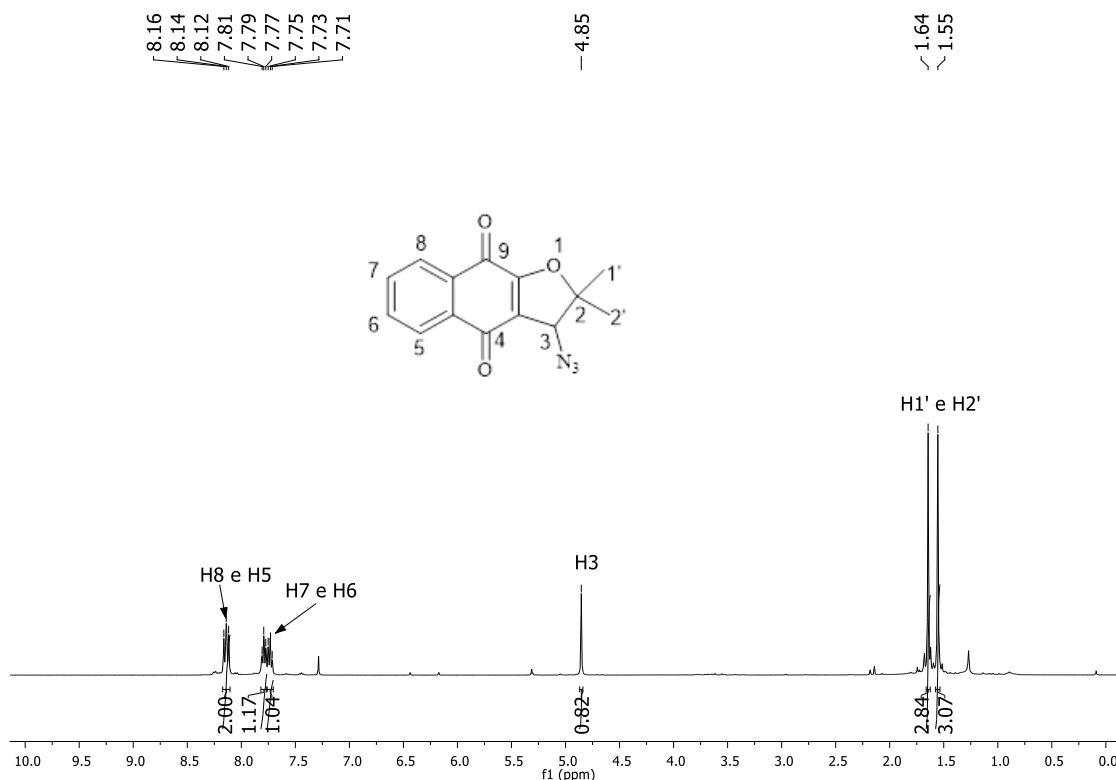


Figura 36: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (44) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

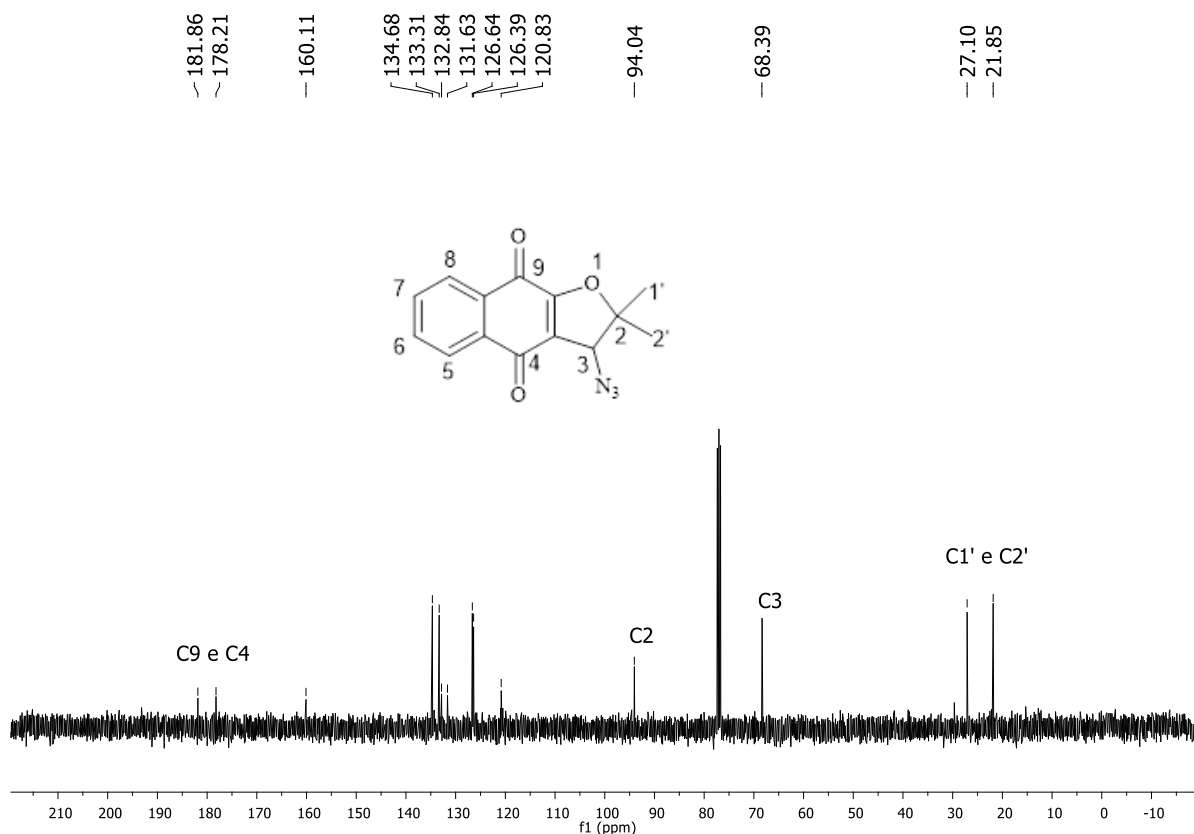


**Figura 37:** Espectro no Infravermelho (IV) do composto (44)

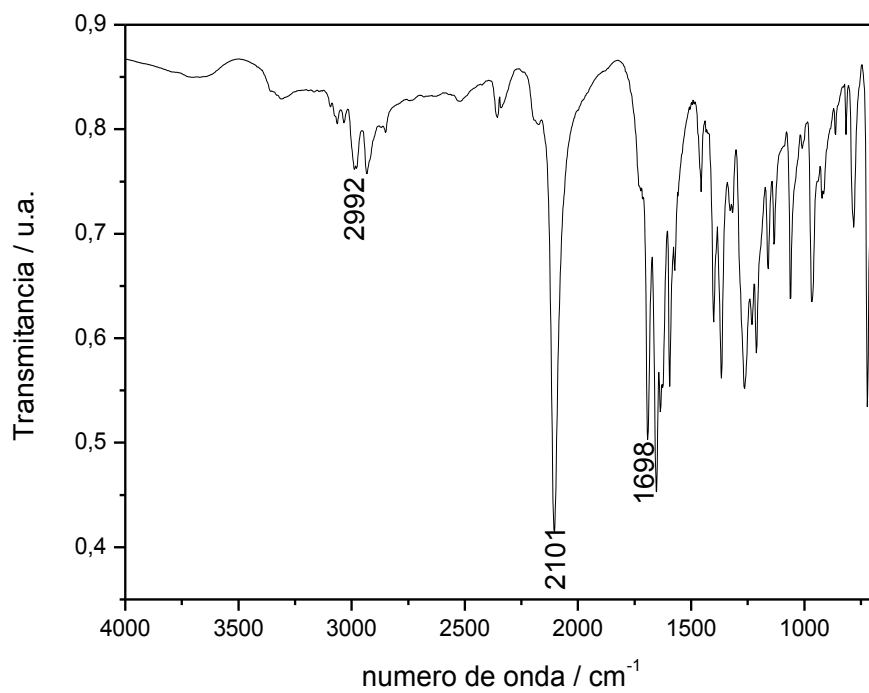


**Figura 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (47) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)





**Figura 39:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do composto (47) (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)



**Figura 40:** Espectro no Infravermelho (IV) do composto (47)

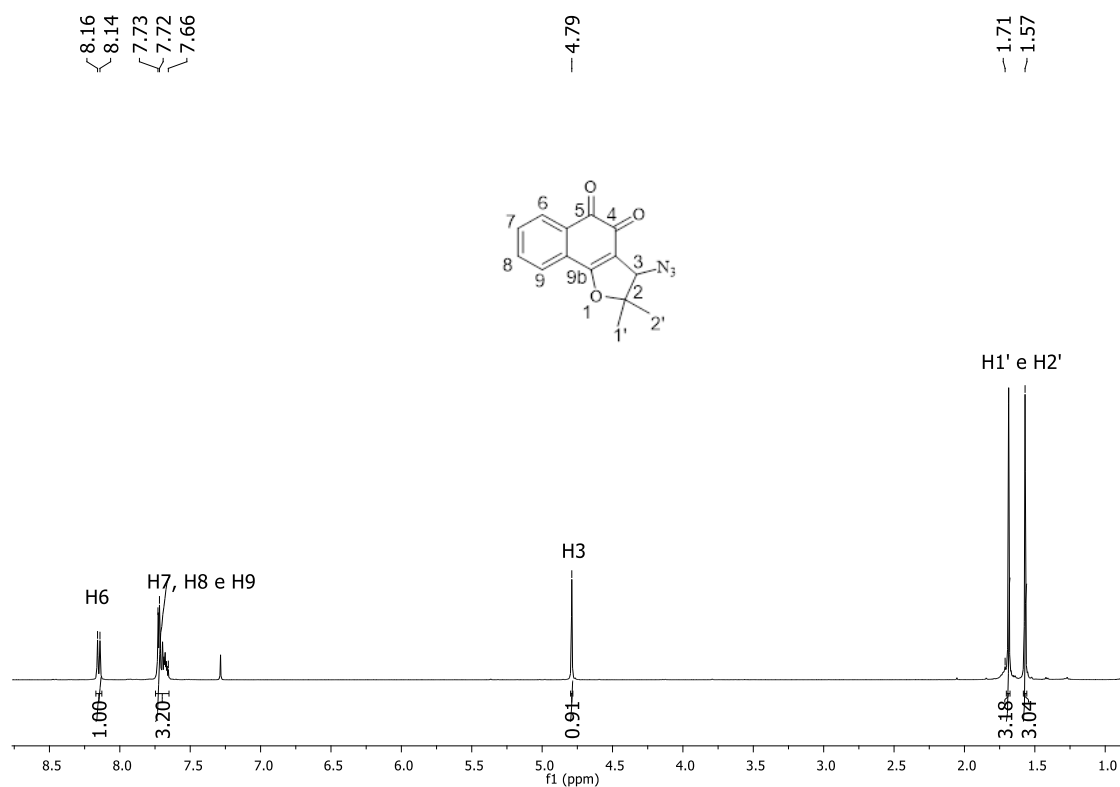


Figura 41: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (46) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

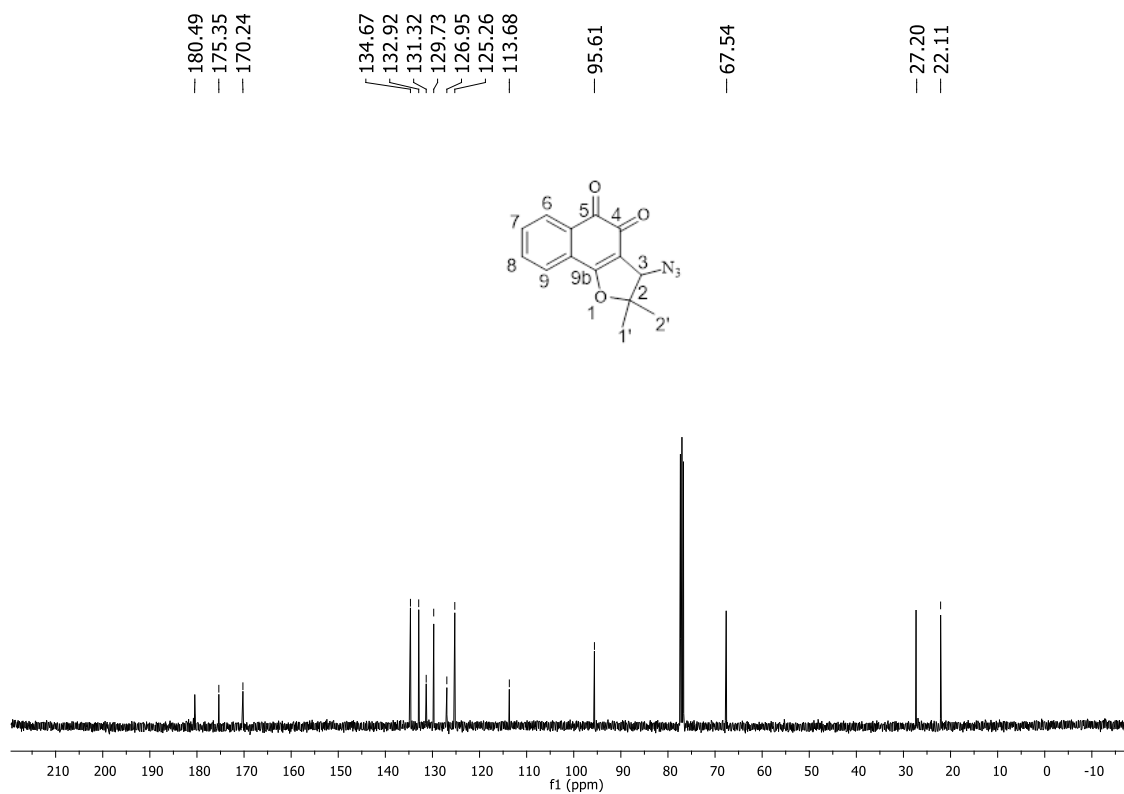


Figura 42: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (46) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

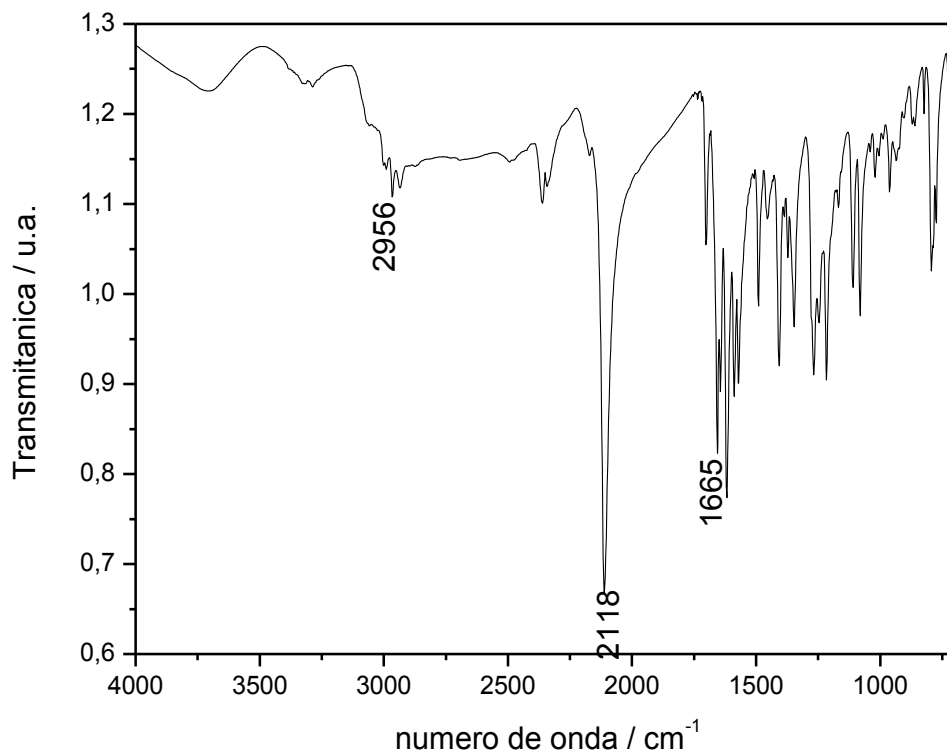


Figura 43: Espectro no Infravermelho (IV) do composto (46)

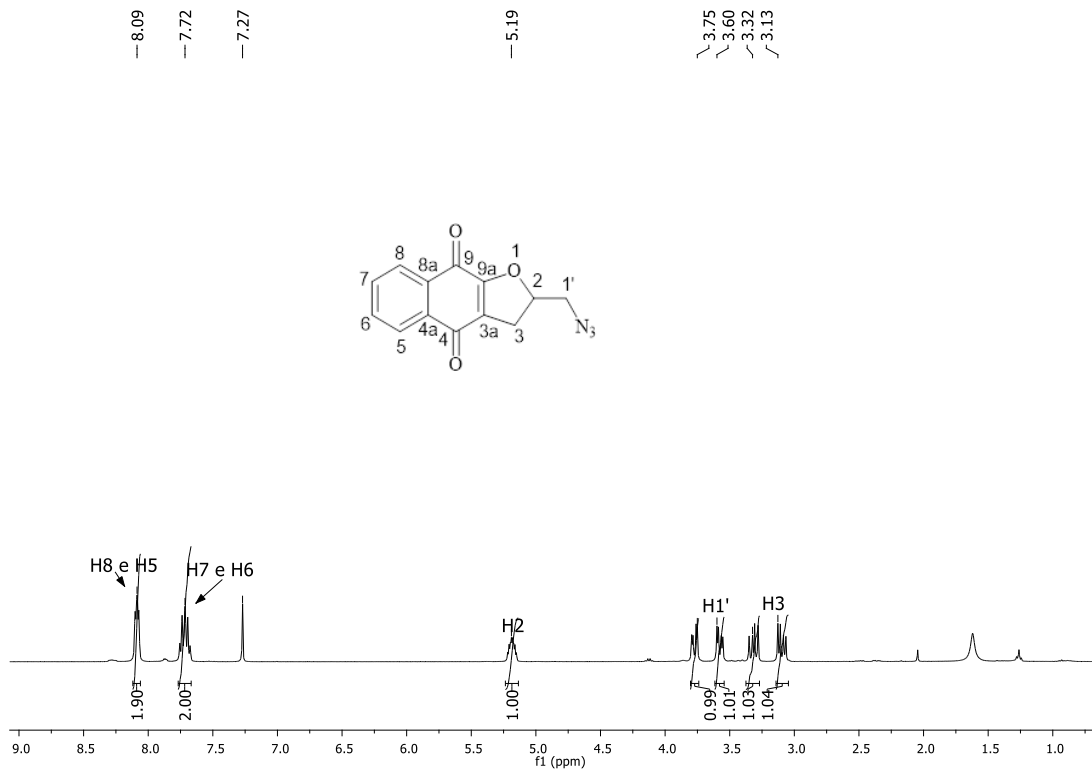


Figura 44: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (49) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

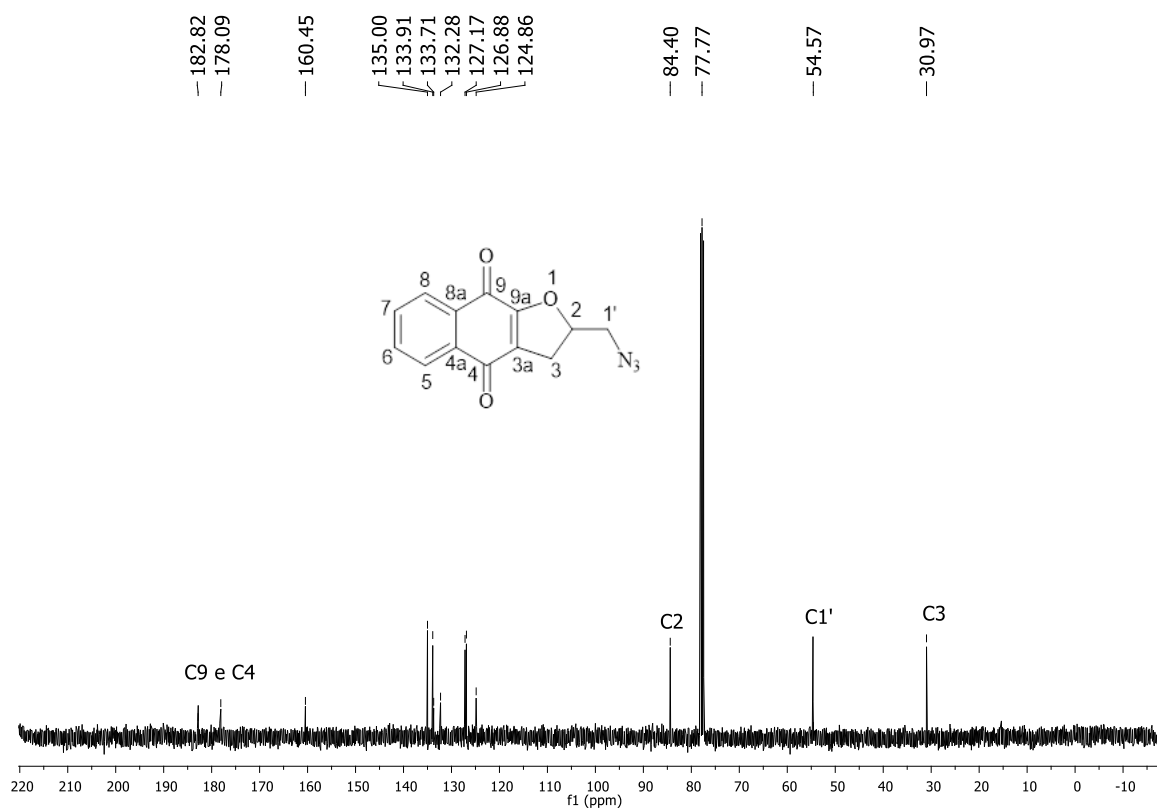


Figura 45: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do composto (49) (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

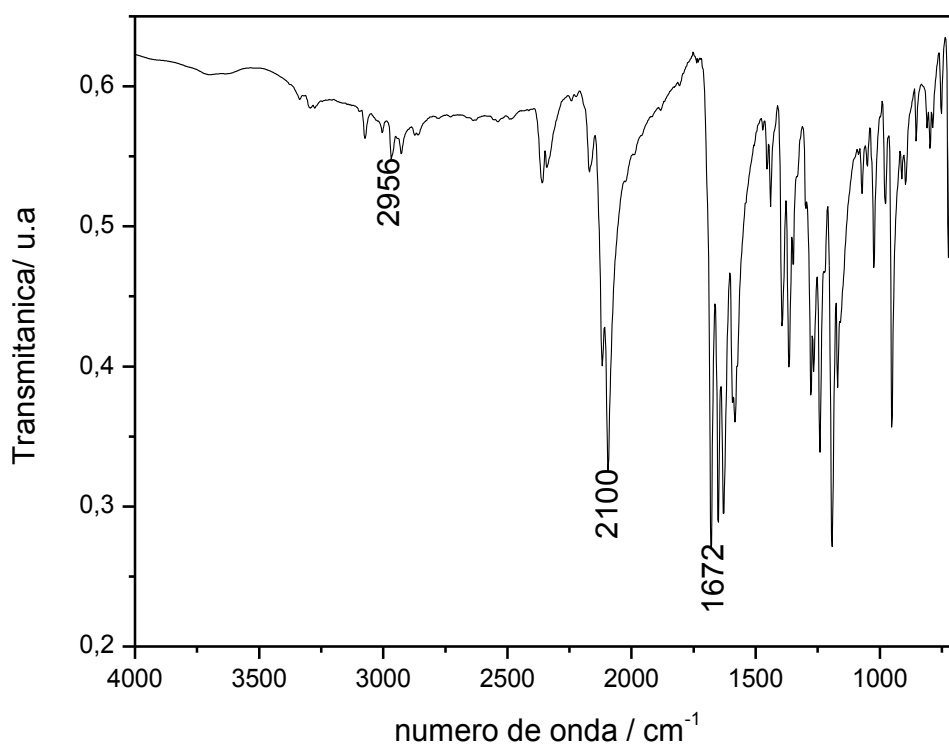


Figura 46: Espectro no Infravermelho (IV) do composto (49)

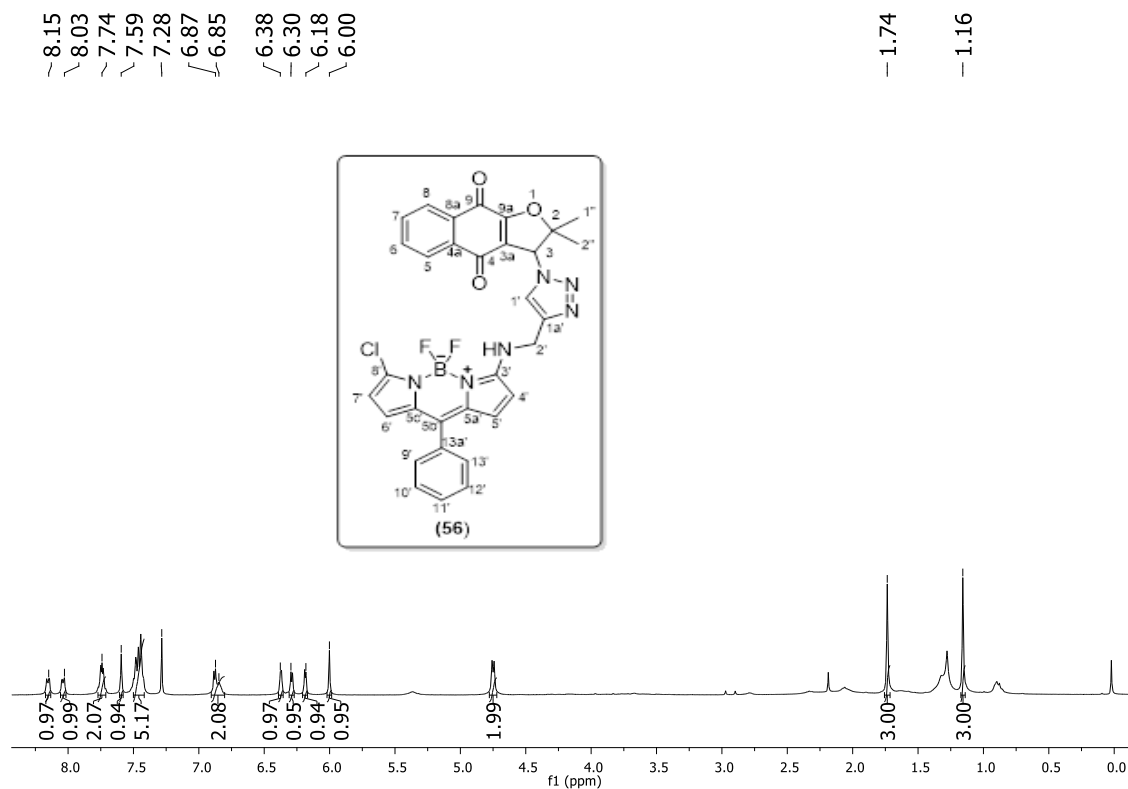


Figura 47: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (56) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

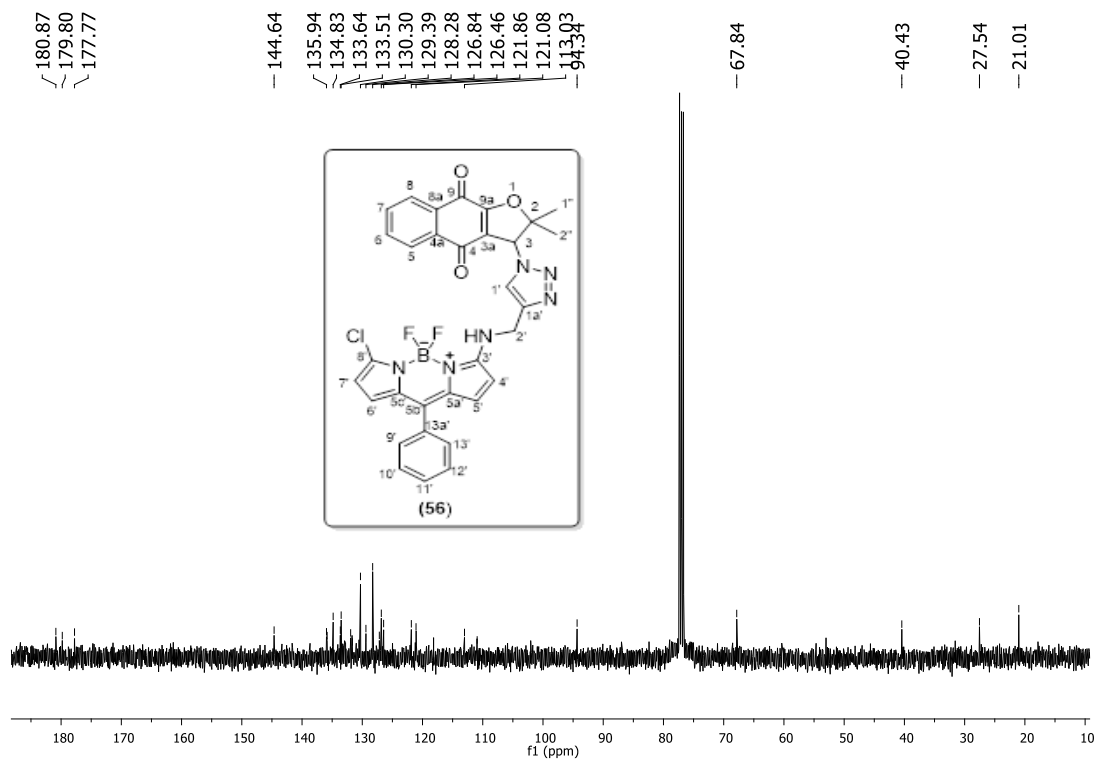
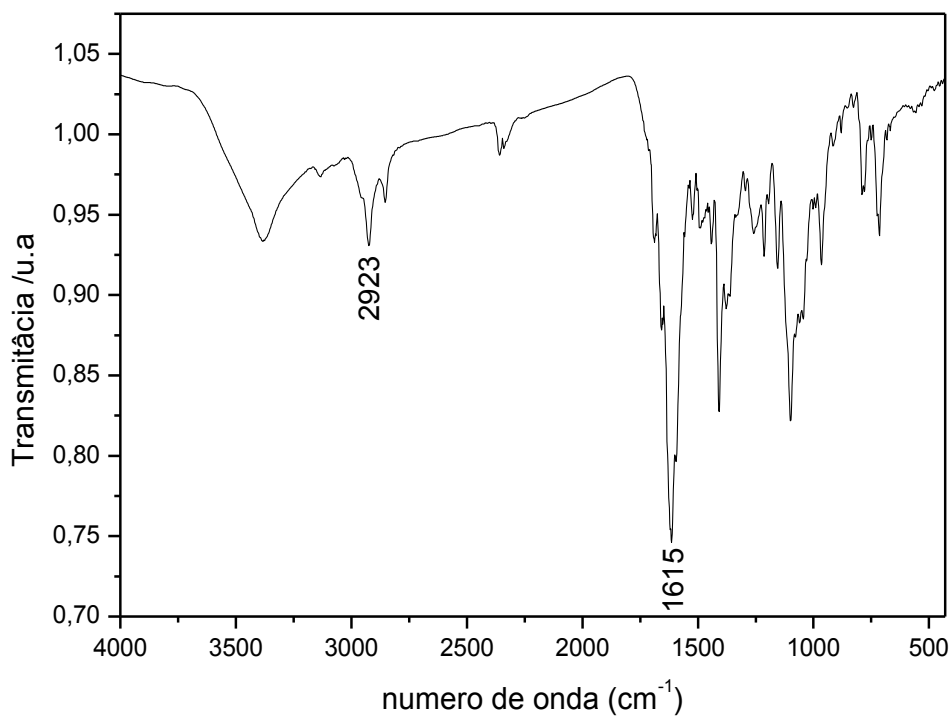
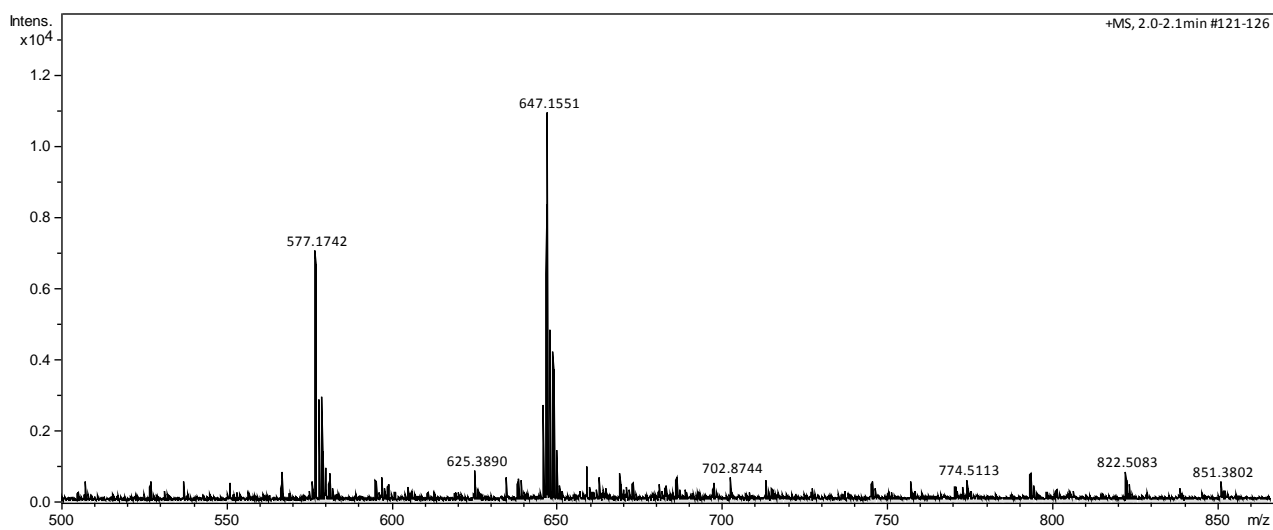


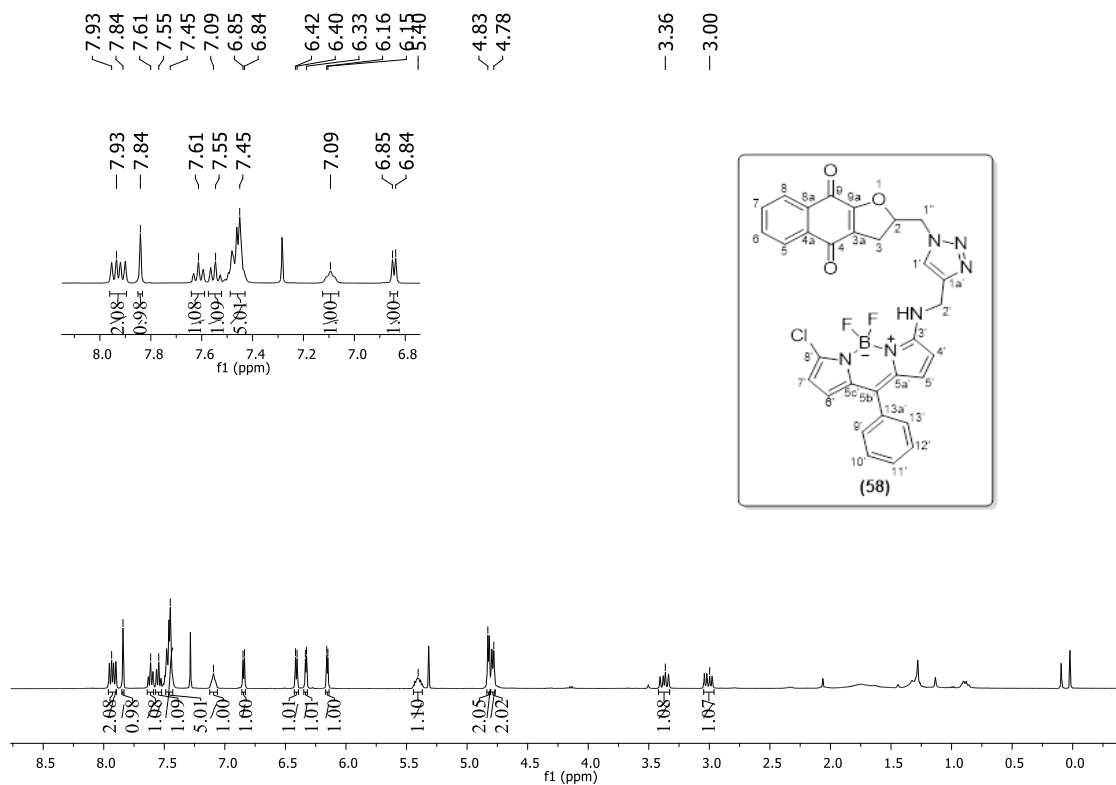
Figura 48: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (56) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

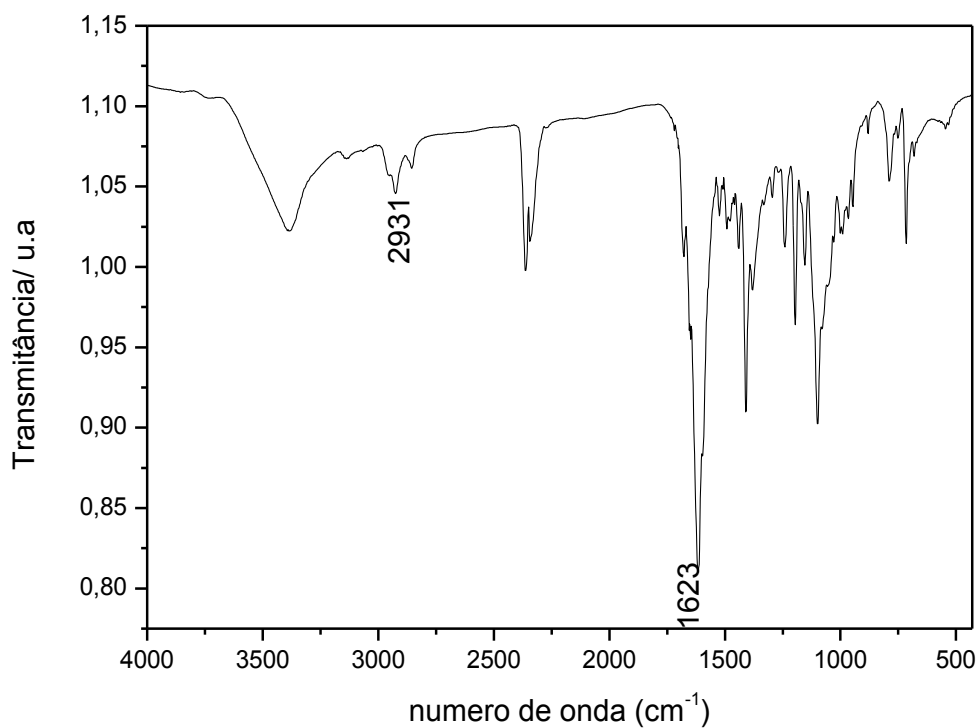


**Figura 49:** Espectro no Infravermelho (IV) do composto (56)

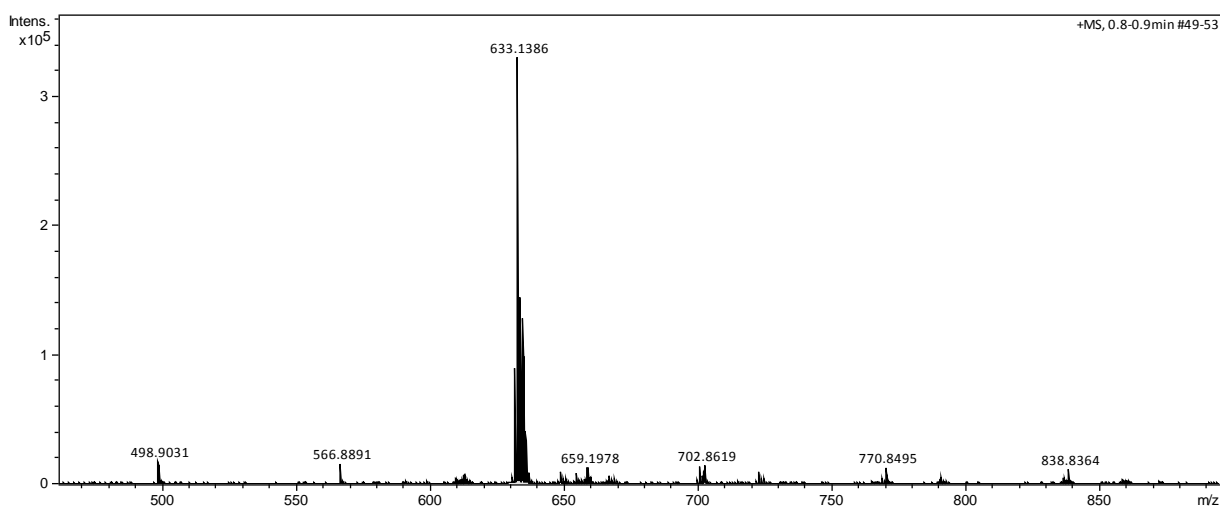


**Figura 50:** Espectro de Massas do composto (56) (ESI+)



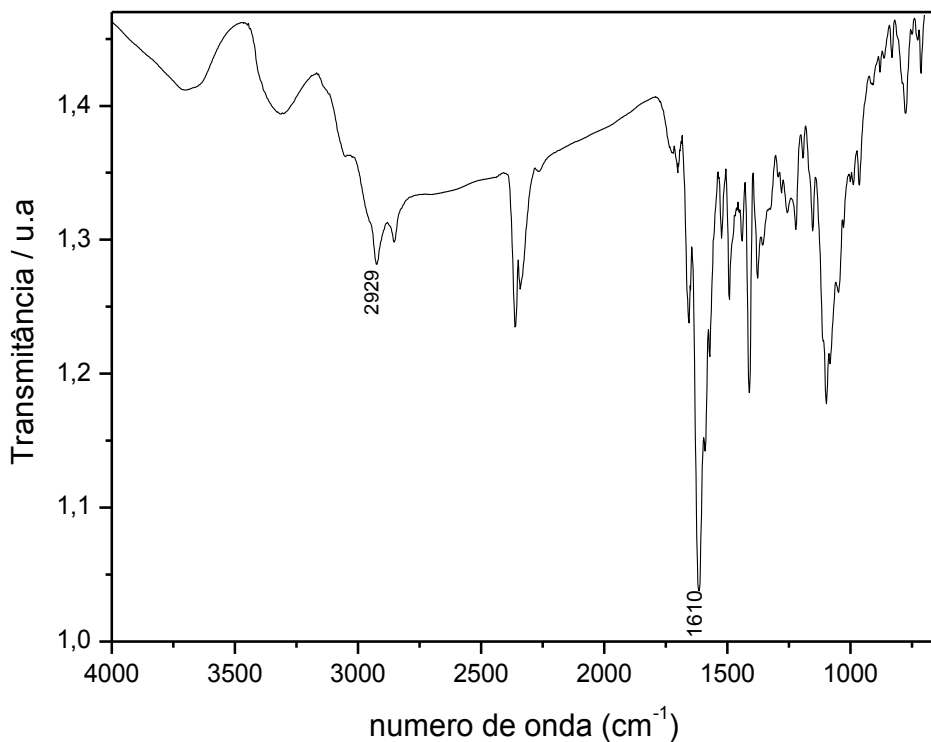


**Figura 53:** Espectro no Infravermelho (IV) do composto (58)

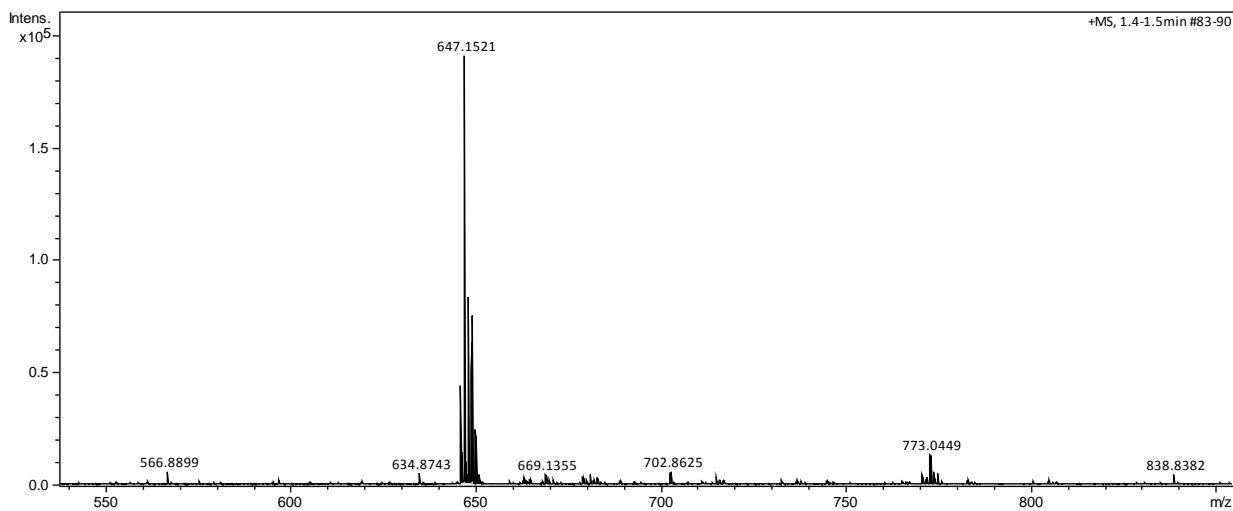


**Figura 54:** Espectro de Massas do composto (58) (ESI+)

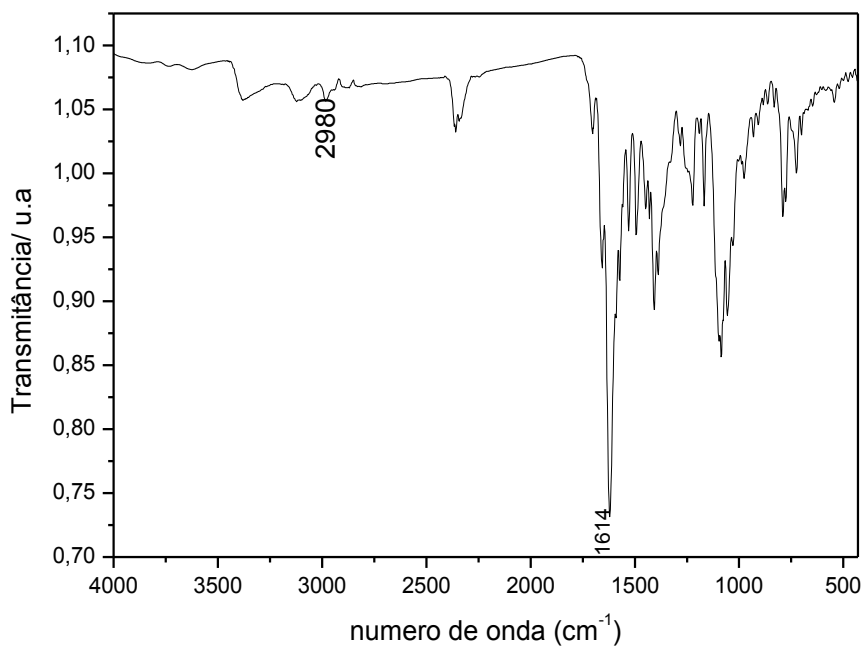




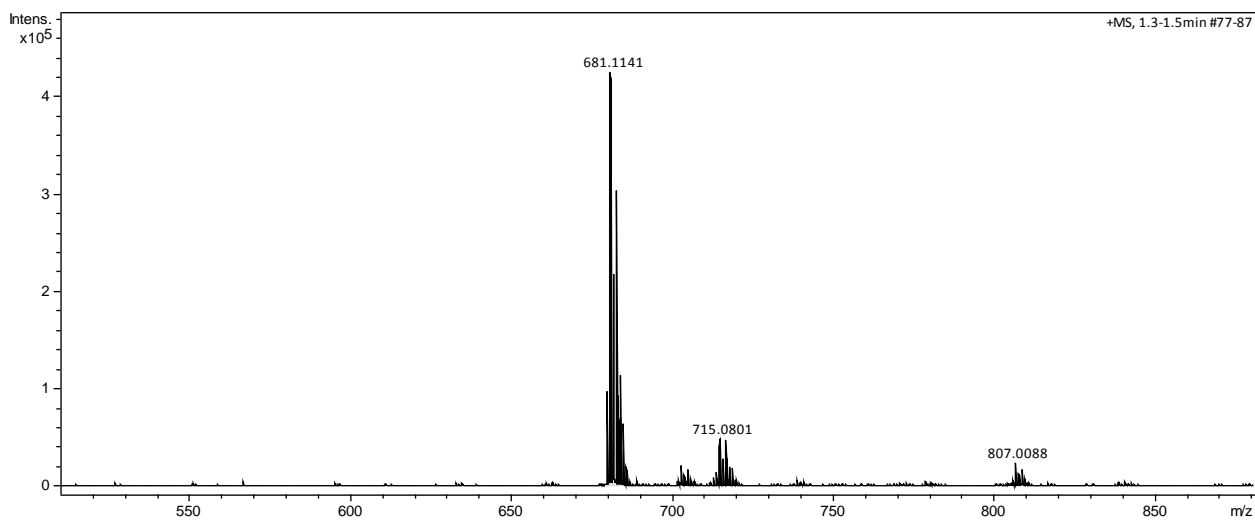
**Figura 55:** Espectro no Infravermelho (IV) do composto (59)



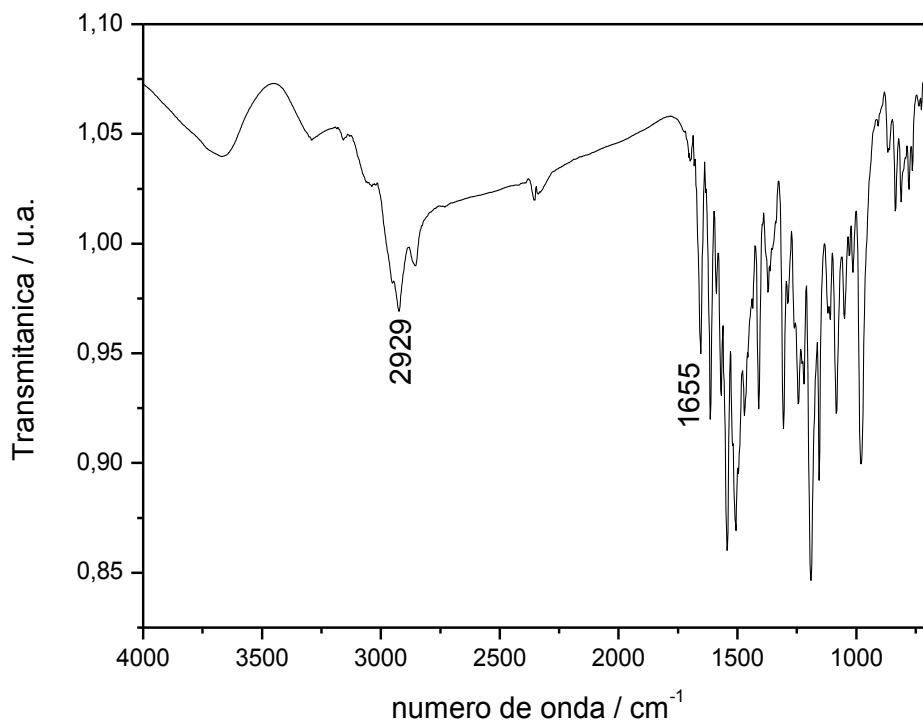
**Figura 56:** Espectro de Massas do composto (59) (ESI+)



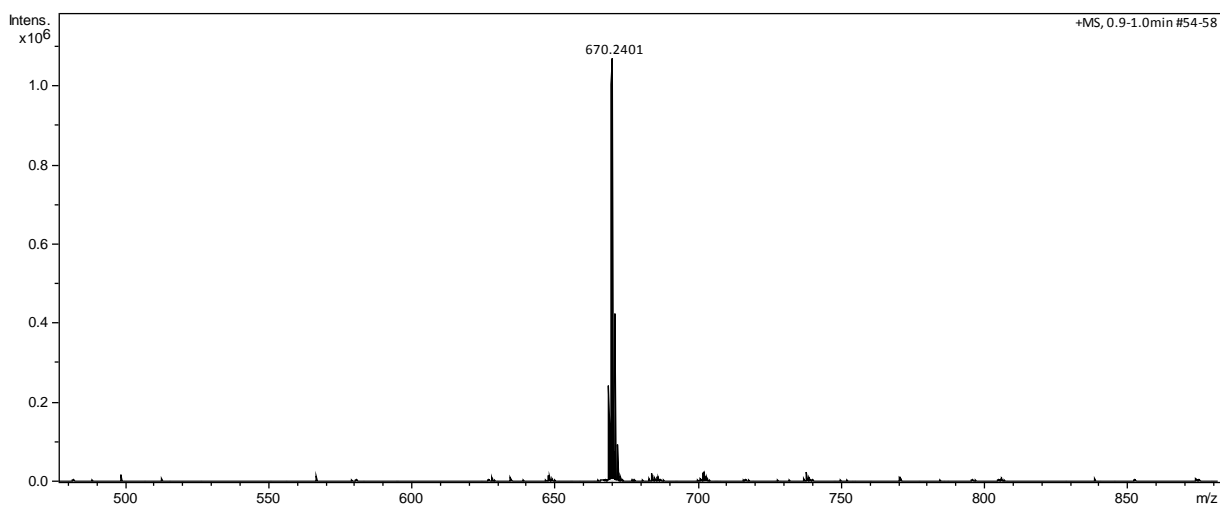
**Figura 57:** Espectro no Infravermelho (IV) do composto (60)



**Figura 58:** Espectro de Massas do composto (60) (ESI+)



**Figura 59:** Espectro no Infravermelho (IV) do composto (61)



**Figura 60:** Espectro de Massas do composto (61) (ESI+)

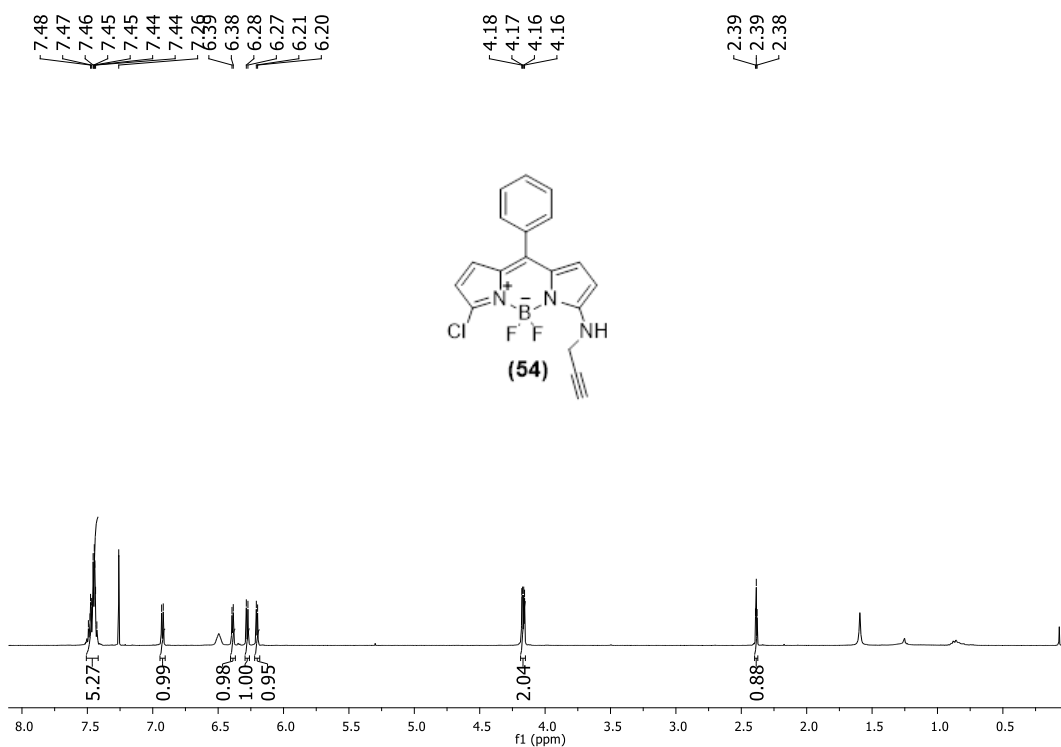


Figura 61: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto (54) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

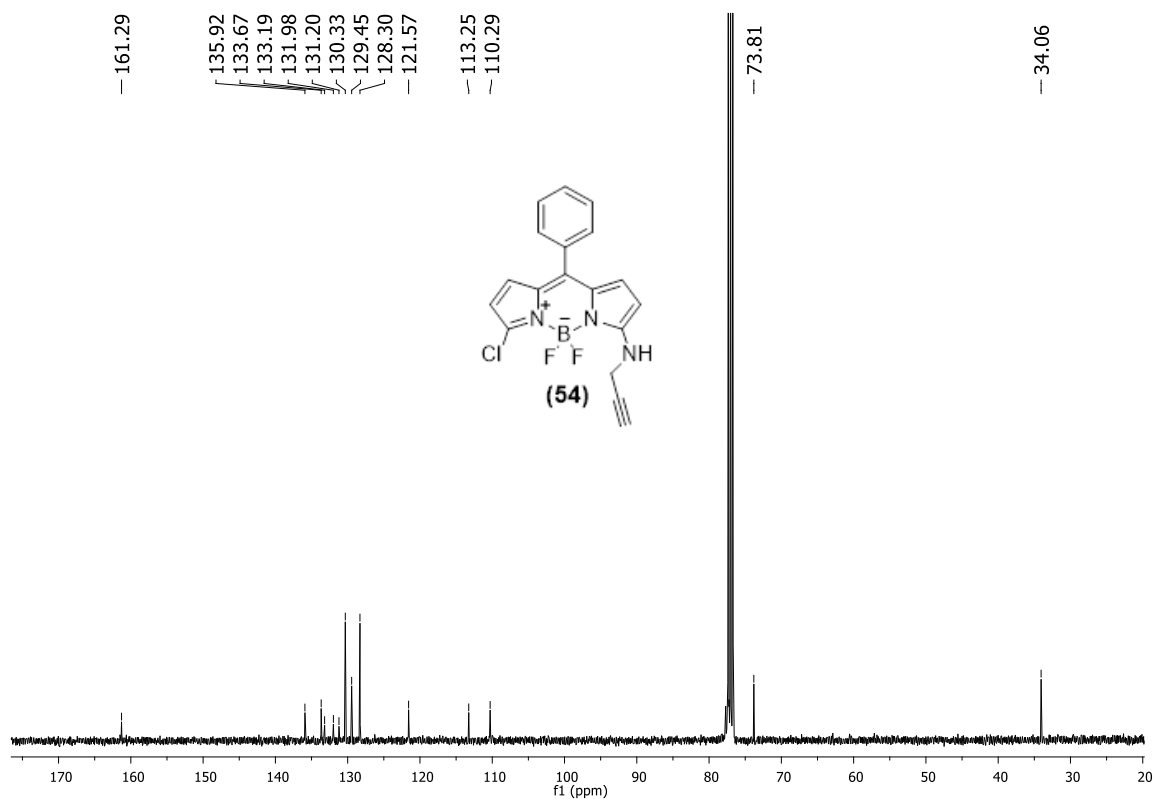


Figura 62: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (54) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

