

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



JEFFERSON DE ALBUQUERQUE SANTOS

**Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica
de novas tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona.**

RECIFE

2018

JEFFERSON DE ALBUQUERQUE SANTOS

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de novas tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Planejamento e síntese de fármacos

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S237s Santos, Jefferson de Albuquerque.
Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de novas tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona / Jefferson de Albuquerque Santos. – Recife: o autor, 2018.
161 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Alexandre José da Silva Góes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências, figuras, tabelas, gráficos, quadros e anexos .

1. Naftoquinonas. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Toxicidade. I. Góes, Alexandre José da Silva. (orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 144)

JEFFERSON DE ALBUQUERQUE SANTOS

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de novas tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

**Dedico esse trabalho
particularmente ao meu avô (*in
memoriam*), meu exemplo de
seriedade.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus e a Nossa Senhora por caminharem sempre comigo, protegendo-me e iluminando todos os meus passos na caminhada da vida.

À toda minha família principalmente aos meus pais **Neci** e **José Rafael**, e a minha esposa **Minéias** que sempre me incentivaram a estudar, mostrando o melhor caminho a seguir.

Ao **Professor Alexandre José da Silva Góes**, do Laboratório de Síntese de Substâncias de Interesse Terapêutico do Departamento de Antibióticos da UFPE, por ter aceitado me orientar e por tudo que me ensinou nesta fase da vida, meus verdadeiros agradecimentos.

À **Mariza S. de Lima Silva**, minha colega de laboratório por ter contribuído nas correções gramaticais do manuscrito, meu muito obrigado.

À **Gibson Gomes**, do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (Ribeirão Preto-USP) por proceder as análises espectrométricas de massas de alta resolução e espectroscópicas de RMN dos derivados.

À **Professora Gláucia Manoella de Souza**, do Departamento de Antibióticos da UFPE, por realizar os testes antimicrobianos, meus sinceros agradecimentos.

À **Professora Teresinha Gonçalves da Silva**, do Laboratório de Bioensaios para pesquisa de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, por realizar os testes de citotoxicidade, meu muito obrigado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFPE)**, que tornou possível a realização do Mestrado.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite para a avaliação desta dissertação e pelas importantíssimas contribuições dadas para engrandecer este trabalho.

À **Central Analítica do Departamento de Química Fundamental – DQF/UFPE**, pela realização dos espectros de Infravermelho (IV).

A **todos amigos** e pessoas que ajudaram de forma direta ou indireta para conclusão deste trabalho.

“Agrada-te do Senhor, e Ele satisfará os desejos do teu coração.”

(Salmo 37:4)

RESUMO

A espécie *Handroanthus heptaphyllus* (Bignoniaceae), apresenta diferentes classes de metabólitos secundários, e dentre estas as quinonas, que são os marcadores químicos dessa família botânica. Os derivados sintéticos das quinonas merecem destaques devido as suas propriedades biológicas, tais como: antimicrobianas, antitumorais e antiparasitárias. Na procura por novos compostos ativos, este trabalho teve como objetivo a síntese e avaliação de novos derivados da α -lapachona. Para a obtenção do lapachol puro, empregamos o novo método Góes de extração e purificação simultânea, com um sistema *n*-hexano/acetato de etila (9:1) como eluente, fornecendo 1,2 % de rendimento após lavagem com hexano. A α -lapachona foi então sintetizada, através de uma metodologia inovadora na qual uma reação de ciclização intramolecular do lapachol em meio de ácido fosfórico concentrado, forneceu essa naftoquinona em 95 % de rendimento. Seis novas tiossemicarbazonas (**1a-1f**) foram então obtidas reagindo a α -lapachona com diferentes tiossemicarbazidas em placa de aquecimento com agitador magnético, apresentando rendimentos entre 72-91%. Os resultados com a extração do lapachol, indicaram que o método Góes foi mais eficiente do que aquele ácido-base descrito na literatura. Do mesmo modo, a metodologia sintética da α -lapachona com H_3PO_4 concentrado foi mais eficiente do que com HCl concentrado (da literatura). As reações empregadas para a obtenção dos derivados (tiossemicarbazonas) forneceram facilmente os produtos com rendimentos de 72 à 91 %. Os compostos **1a** à **1f** foram caracterizados por espectrometria de infravermelho (IV), massas de alta resolução, RMN ^1H e RMN ^{13}C . A α -lapachona e seus derivados foram avaliados quanto às suas atividades antimicrobianas e citotóxicas. Os testes de susceptibilidade microbiana, realizados por método de microdiluição em caldo, demonstraram que dentre os derivados sintetizados, **1b** e **1e** foram os que apresentaram melhor atividade antimicrobiana ($\text{CIM} > 31,25 \mu\text{g/mL}$) contra as espécies *Candida albicans* e *Bacillus cereus* respectivamente sendo **1b** o melhor. Os ensaios de citotoxicidade (MTT) indicaram que dos seis derivados da α -lapachona obtidos, **1f** foi o que demonstrou atividade citotóxica promissora ($\text{IC}_{50} = 9,06 \pm 0,5 \mu\text{M}$) atuando sobre a linhagem de leucemia mieloide crônica K562.

PALAVRAS-CHAVE: Naftoquinonas. Tiossemicarbazonas. Toxicidade.

ABSTRACT

The species *Handroanthus heptaphyllus* (Bignoniaceae), presents different classes of secondary metabolites, and among these the quinones, which are the chemical markers of this botanical family. Synthetic derivatives of quinones deserve prominence due to their biological properties, such as: antimicrobial, antitumor and antiparasitic. In the search for new active compounds, this work aimed at the synthesis and evaluation of new α -lapachone derivatives. To obtain pure lapachol, we used the new method of simultaneous extraction and purification, with a n-hexane / ethyl acetate system (9:1) as the eluent, providing 1.2% yield after washing with n-hexane. The α -lapachone was then synthesized by an innovative methodology in which an intramolecular cyclization reaction of lapachol in concentrated phosphoric acid medium provided that naphthoquinone in 95% yield. Six new thiosemicarbazones (**1a-1f**) were then obtained by reacting α -lapachone with different thiosemicarbazides on a magnetic stirrer heating plate, yielding between 72-91%. The results with lapachol extraction indicated that the Góes method was more efficient than that described in the literature. Likewise, the synthetic methodology of α -lapachone with concentrated H_3PO_4 was more efficient than with concentrated HCl (from the literature). The reactions employed to obtain the derivatives (thiosemicarbazones) easily provided the products in yields of 72 to 91%. Compounds **1a** to **1f** were characterized by infrared (IR) spectrometry, high resolution masses, ^1H NMR and ^{13}C NMR. α -lapachone and its derivatives were evaluated for their antimicrobial and cytotoxic activities. The microbial susceptibility tests performed by broth microdilution method showed that **1b** and **1e** were the ones with the best antimicrobial activity ($\text{MIC} > 31.25 \mu\text{g} / \text{mL}$) against the *Candida albicans* and *Bacillus cereus* species respectively with **1b** being the best. Cytotoxicity assays (MTT) indicated that of the six α -lapachone derivatives obtained, **1f** was what demonstrated promising cytotoxic activity ($\text{IC}_{50} = 9.06 \pm 0.5 \mu\text{M}$) acting on the K562 chronic myeloid leukemia lineage.

KEY WORDS: Naftoquinones. Thiosemicarbazones. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de naftoquinonas biologicamente ativas

Figura 2 – Modelo geral para 1,4-naftoquinonas unidas a anel heterocíclico (carbazol, triazol, indol, furano, pirano, tiofeno quinolina etc)

Figura 3 – Derivados da α -lapachona com atividade citotóxica para algumas células leucêmicas

Figura 4 – Estrutura molecular da epóxi- α -lapachona

Figura 5 – Estruturas do lapachol (8), β -lapachona (9) e α -lapachona (1)

Figura 6 – *Orto* e *para*-naftoquinonas avaliadas contra linhagem celular esofágica cancerosa

Figura 7 – Propriedade redox do anel de *p*-naftoquinonas. Formação de ânion radical semiquinona ($Q\cdot^-$) e diânion hidroquinona (Q^{2-}) por redução sequencial de dois elétrons

Figura 8 – Peças necessárias para o absoluto funcionamento do aparelho Góes

Figura 9 – Corpo da coluna do aparelho Góes

Figura 10 – Esquema de montagem e funcionamento do aparelho Góes

Figura 11 – Fórmula estrutural das novas tiosemicarbazonas derivadas da α -lapachona **1a-1f**

Figura 12 – RMN ^1H do derivado **1c** mostrando os sinais dos grupos metil e metileno

Figura 13 – RMN ^1H do derivado **1d** mostrando todos os sinais abaixo de 5 ppm

Figura 14 – Ampliação do espectro de RMN ^1H do derivado **1e** na região dos aromáticos

Figura 15 – Ampliação do espectro de RMN ^1H do derivado **1e** mostrando os sinais dos prótons ligados aos nitrogênios

Figura 16 – Ampliação dos espectros de RMN ^{13}C do derivado **1c** (a esquerda) e **1d** (a direita) apresentando os sinais das metilas e metilenos

Figura 17 – Ampliação dos espectros de RMN ^{13}C do derivado **1c** (a esquerda) e **1d** (a direita) apresentando os sinais na região dos aromáticos e dos grupos imina e tiona

Figura 18 – Efeito citotóxico do composto α -lapachona sobre a linhagem HCT 116 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão

analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

Figuras 18A à 18E – Efeito citotóxico dos compostos (**1a**, **1c-1f**) sobre a linhagem HCT 116 após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

Figura 19 – Efeito citotóxico do composto α -Lapachona sobre a linhagem K562 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Figuras 19A à 19E – Efeito citotóxico dos compostos (**1a**, **1c-1f**) sobre a linhagem K562 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Figura 20 – Efeito citotóxico do composto α -Lapachona sobre a linhagem L929 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $P < 0,001$ em relação ao controle.

Figuras 20A à 20E – Efeito citotóxico dos compostos (**1a**, **1c-1f**) sobre a linhagem L929 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Figura 21 – Efeito citotóxico do composto α -Lapachona sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Figuras 21A à 21E – Efeito citotóxico dos compostos (**1a**, **1c-1f**) sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Figura 22 – Estruturas e concentrações inibitórias mínimas dos derivados **1a-1f** e seus correspondentes isômeros.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Representação do ciclo redox e a formação dos metabólitos

Esquema 2 – Formação da α -lapachona (1) a partir do lapachol (8)

Esquema 3 – Derivados de α -lapachona obtidos através de alterações realizadas no anel C e no centro redox.

Esquema 4 – Derivados 1,2,3-triazóis da α -lapachona obtidos a partir de lapachol (8)

Esquema 5 – Síntese de derivados arilamino de α -lapachona com substituição no anel C

Esquema 6 – Síntese do tio derivado da α -lapachona (33), obtido a partir de lapachol

Esquema 7 – Síntese de análogos da α -lapachona através da reação one pot de três componentes usando aluminato de cobre (CuAl_2O_4) como catalisador

Esquema 8 – Reação de condensação em one pot de três componentes para obtenção dos derivados da α -lapachona (37a-37i) modificados no anel C

Esquema 9 – Preparação de análogos da α -lapachona modificados no anel C a partir da estrutura (38) um derivado do nor-lapachol

Esquema 10 – Síntese de análogos da α -lapachona tetra-substituídos no anel C usando uma reação sequencial de quatro componentes

Esquema 11 – Mecanismo proposto para a síntese do composto dehidro- α -lapachona (49) a partir da oxidação in vitro do lapachol (8)

Esquema 12 – Síntese dos derivados da α -lapachona (53) e (54) a partir de uma reação de Diels-Alder

Esquema 13 – Rota sintética geral para obtenção de epóxi- α -lapachona a partir da α -lapachona.

Esquema 14 – Reação implicada no processo de extração ácido-base do Lapachol a partir da serragem do Ipê roxo

Esquema 15 – Rotas sintéticas utilizadas para obtenção da α -lapachona a partir do lapachol

Esquema 16 - Mecanismo proposto para formação da α -lapachona a partir do lapachol

Esquema 17 - Rotas sintéticas para a obtenção das tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona (1a-1f)

Esquema 18 – Mecanismo de reação para obtenção dos compostos de 1a-1f. (1a)-R₁= Fenil; (1b)-R= H; (1c)-R= CH₂CH₃; (1d)-R₁= 4-CH₃; (1e)-R₁= 2,4-dicloro; (1f)- R₁=4-nitrofenil

Esquema 19 – Ressonância apresentada pela α -lapachona

Esquema 20 – Rotas sintéticas utilizadas no estudo de obtenção do derivado 1a

Esquema 21 – Rotas sintéticas utilizadas no estudo de obtenção do derivado 1b

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Dados reacionais das tiosemicarbazonas derivadas da α -lapachona 1a-1f

Tabela 2 – Principais bandas de absorção no infravermelho relacionadas ao núcleo da α -lapachona

Tabela 3 – Principais bandas de absorção no infravermelho relacionadas à porção tiosemicarbazona

Tabela 4 – Massas moleculares dos picos $[M+H]^+$ e correspondentes fórmulas moleculares da α -lapachona e seus derivados (1a -1f)

Tabela 5 - Estrutura e concentrações inibitórias (IC_{50}) do derivado **1f** e seu isômero BV-3

Tabela 6 – Sensibilidade microbiana ao composto **1a** por técnica de microdiluição em caldo

Tabela 7 – Sensibilidade microbiana ao composto **1b** por técnica de microdiluição em caldo

Tabela 8 – Sensibilidade microbiana ao composto **1c** por técnica de microdiluição em caldo

Tabela 9 – Sensibilidade microbiana ao composto **1d** por técnica de microdiluição em caldo

Tabela 10 – Sensibilidade microbiana ao composto **1e** por técnica de microdiluição em caldo

Tabela 11 – Sensibilidade microbiana ao composto **1f** por técnica de microdiluição em caldo

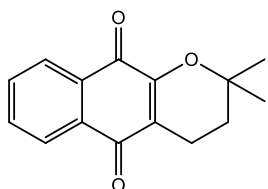
Quadro 1 – Espécies de bactérias e fungos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana para os compostos sintetizados

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

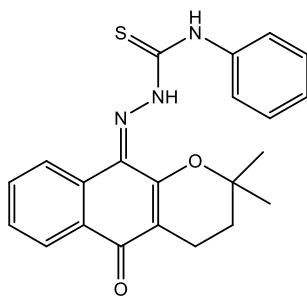
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
AcOH	Ácido acético
AcONa	Acetato de sódio
APTS	Ácido <i>p</i> -Tolueno Sulfônico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Clorofórmio Deuterado
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório
cm⁻¹	Frequência de absorção
CO₂	Gás carbônico
Ctl	Controle
CuAl₂O₄	Aluminato de cobre
CuSO₄·H₂O	Sulfato de cobre hidratado
d	Dupleto
Δ	Temperatura
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC₅₀	Concentração de uma substância que produz 50 % do efeito máximo
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH	Etanol
FCEV	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
HCT 116	Linhagem celular de Câncer de Cólon
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
HCO₂H	Ácido fórmico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hz	Hertz
IC₅₀	Concentração molar de uma substância que produz 50 % de inibição
IV	Infra Vermelho

K562	Linhagem celular de Leucemia Mieloide Crônica
KCl	Cloreto de potássio
L929	Linhagem celular de fibroblasto murino
LC₅₀	Concentração molar de uma substância que produz 50 % de morte
λ	Comprimento de onda
m	multiplete
M⁺	Íon molecular
m/z	massa/carga
MHz	Megahertz
MS	Espectrometria de Massas
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo tetrazólio
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaN₃	Azida de sódio
NBS	N-bromo succinimida
NCI-H292	Linhagem celular de câncer Pulmonar Humano
PBS	Phosphate Bufferid Saline
PF	Ponto de Fusão
PM.	Peso molecular
ppm	Partes por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear protônica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
s	Simpleto
SBF	Soro Bovino Fetal
SCOC	Câncer Esofágico de Células Escamosas
t	Tripleto
UFPEDA	Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos
URM	University Recife Mycologia
UV	Ultra violeta
VERO	Verda Reno

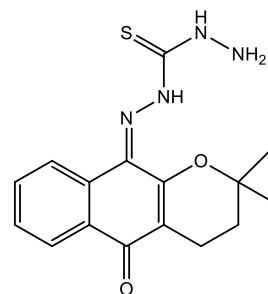
LISTA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS



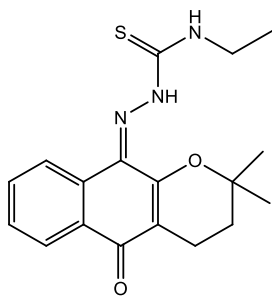
(1) α- Lapachona



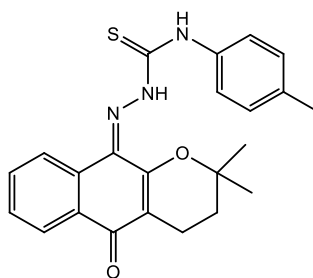
(1a) JF-1



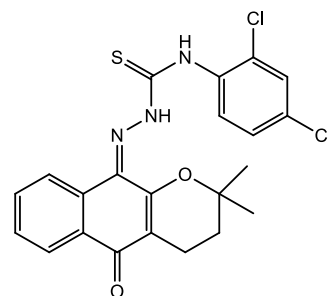
(1b) JF-2



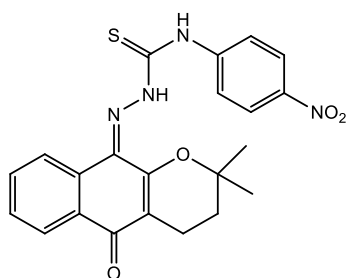
(1c) JF-4



(1d) JF-6



(1e) JF-7



(1f) JF-5

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3 REFERENCIAL TEÓRICO	25
3.1 Bioatividades das Naftoquinonas.....	25
3.1.1 Bioatividades da α-lapachona e seus derivados.....	26
3.1.2 Bioatividades dos isômeros da α-Lapachona (lapachol e β-lapachona)	30
3.2 Mecanismos de ação citotóxica das naftoquinonas.....	33
3.3 Métodos de extração e purificação do Lapachol.....	35
3.4 Métodos de obtenção da α-lapachona e seus derivados.....	36
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	46
4.1 Materias.....	46
4.1.1 Reagentes e solventes.....	46
4.1.2 Equipamentos.....	47
4.1.2.1 Pontos de fusão.....	47
4.1.2.2 Cromatografias.....	47
4.1.2.3 Infravermelho (IV).....	47
4.1.2.4 Espectrometria de massas (MS).....	47
4.1.2.5 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	47
4.1.2.6 Ensaios de citotoxicidade.....	48
4.1.2.7 Ensaios Antimicrobianos.....	48
5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	49
5.1 Procedimentos para a extração e purificação do Lapachol.....	49
5.2 Procedimentos de síntese e purificação da α-Lapachona.....	52
5.3 Procedimento global de síntese dos derivados da α-lapachona (1a-1f).....	54
5.3.1 Utilizando a tiossemicarbazida.....	54
5.3.2 Utilizando hidrato de hidrazina e isotiocianato.....	56
5.3.3 Dados dos compostos sintetizados.....	58
5.3.3.1 Derivado 1a: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida.....	59

5.3.3.2 Derivado 1b: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2Hbenzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida.....	60
5.3.3.3 Derivado 1c: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-etil-hidrazina-carbotioamida.....	61
5.3.3.4 Derivado 1d: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-(p-toluil)hidrazina-carbotioamida.....	63
5.3.3.5 Derivado 1e: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-(2,4-diclorofenil)hidrazina-carbotioamida.....	64
5.3.3.6 Derivado 1f: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazina-carbotioamida.....	65
6 ENSAIOS BIOLÓGICOS	67
6.1 Ensaios de citotoxicidade (MTT).....	67
6.1.1 Método.....	67
6.1.2 Método de análise dos resultados.....	67
6.2 Ensaios Antimicrobianos.....	68
6.2.1 Método.....	68
7 RESULTADOS E DISCURSÕES.....	69
7.1 Extração do Lapachol.....	69
7.2 Síntese da α -Lapachona.....	69
7.3 Vias de obtenção das tiossemicarbazonas (1a-1f).....	71
7.3.1 Mecanismo de reação proposto para formação dos compostos (1a-1f).....	72
7.3.2 Ensaios de síntese para a obtenção do derivado 1a: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida.....	74
7.3.3 Ensaios de síntese para a obtenção do derivado 1b: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2Hbenzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida.....	75
7.3.4 Obtenção dos derivados (1c à 1f).....	75
7.4 Caracterização dos compostos sintetizados	76
7.4.1 Caracterização da α -lapachona.....	76
7.4.2 Caracterização dos derivados (1a-1f).....	77
7.4.2.1 Análise dos espectros de Infravermelho (IV).....	77
7.4.2.2 Análise dos espectros de Massas de Alta Definição dos compostos (1a-1f).....	79
7.4.2.3 Análise dos espectros de RMN ^1H	80
7.4.2.4 Análise dos espectros de RMN ^{13}C	83
7.5 Resultados biológicos.....	85

7.5.1 Citotoxicidade (MTT).....	85
7.5.2 Antimicrobiano.....	95
8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	100
REFERÊNCIAS	102
ANEXOS	108
ANEXO A– ESPECTROS DA A-LAPACHONA	108
Infravermelho.....	108
Massa de alta resolução	109
RMN ¹ H.....	110
RMN ¹³ C	113
ANEXO B – ESPECTROS DO DERIVADO 1A: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO - 2HBENZO[G]CROMEN - 10(5H) - ILIDENO) – N – FENIL - HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA.....	116
Infravermelho	116
Massa de alta resolução	117
RMN ¹ H.....	118
RMN ¹³ C	122
ANEXO C – ESPECTROS DO DERIVADO 1B: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO - 2HBENZO[G]CROMEN - 10(5H) - ILIDENO)HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA.....	124
Infravermelho	124
Massa de Alta Resolução	125
RMN ¹ H.....	126
RMN ¹³ C	130
ANEXO D – ESPECTROS DO DERIVADO 1C: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO - 2H - BENZO[G]CROMEN - 10(5H) - ILIDENO) – N – ETIL - HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA.....	132
Infravermelho	132
Massa de alta resolução	133
RMN ¹ H.....	133
RMN ¹³ C	137
ANEXO E – ESPECTROS DO DERIVADO 1D: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO-2H-BENZO[G]CROMEN-10(5H)- ILIDENO)-N-(P-TOLUIL)HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA.....	139

Infravermelho	139
Massa de alta resolução	140
RMN¹H.....	141
RMN¹³C	145
ANEXO F – ESPECTROS DO DERIVADO 1E: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO - 2H - BENZO[G]CROMEN - 10(5H) - ILIDENO) – N - (2,4-DICLOROFENIL)HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA.....	147
Infravermelho	147
Massa de alta resolução	148
RMN¹H.....	149
RMN¹³C	153
ANEXO G – ESPECTROS DO DERIVADO 1F: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO - 2H - BENZO[G]CROMEN - 10(5H)-ILIDENO) – N - (4-NITROFENIL)HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA.....	155
Infravermelho	155
Massa de alta resolução	156
RMN¹H.....	157
ANEXO H – APRESENTAÇÃO DO TRABALHO EM CONGRESSO.....	161

1 INTRODUÇÃO

As quinonas representam uma vasta e diversificada família de metabólitos secundários de ocorrência natural. O interesse nesses compostos aumentou muito nos últimos anos em função de sua importância farmacológica. Tanto as quinonas naturais quanto as sintéticas são moléculas notavelmente possuidoras de potentes e diversificadas atividades biológicas, tais como: antitumorais, moluscicida, leishmanicidas, anti-inflamatórias, antifúngicas, tripanocidas, antiprotozoárias e inibidoras da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1 (REIS, et al., 2015; FERREIRA, et al., 2013; FERREIRA, FERREIRA, SILVA, 2010; FIOROT, et al., 2014). As quinonas têm apresentado ainda, atividade larvicida contra a espécie *Aedes aegypti*, revelando uma maior quantidade de moléculas bioativas dentre as diversas classes de metabólitos secundários encontrados nas diferentes espécies de plantas (GARCEZ, et al., 2013; CARNEIRO, et al., 2016).

Esses compostos, especialmente as naftoquinonas, podem ser encontrados na madeira das árvores do gênero *Handroanthus sp*, comumente conhecidas como Ipê roxo ou amarelo. Essas substâncias também podem ser preparadas sinteticamente, como é o caso daquelas produzidas em larga escala pela indústria química como corantes orgânicos (ROMAGNOLI, et al., 2013; RAHMOUN, et al., 2013).

O gênero *Tabebuia* que pertence à família Bignoniaceae, foi dividido em três outros gêneros e um deles é o *Handroanthus sp*. (SANTOS, 2017).

A característica elementar das quinonas é a propriedade redox, que é induzida através da formação de um sistema aromático. Dessa forma, esses compostos podem participar em múltiplos processos oxidativos biológicos em função de suas propriedades estruturais. O mecanismo antitumoral desses compostos, por exemplo, é baseado em um ciclo redox o qual produz espécies reativas de oxigênio (ERO) (CASTRO, EMERY, SILVA Jr, 2013).

A quimioterapia do câncer inclui vários medicamentos contendo uma estrutura quinonóide, como a doxorrubicina, mitomicina e mitoxantrona por exemplo. Isso mostra a importância dessas estruturas (*para*- e *orto*-quinonas), sendo identificadas como excepcionais no campo da química medicinal (SUNASSEE, et al., 2013). Muitos derivados 1,4-naftoquinonas são utilizados por exemplo como agentes antimaláricos, comprovando a relevância dessas estruturas uma vez que 3,2 bilhões de pessoas em todo mundo permanecem

sob risco de contrair a malária segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (IMWONG, et al., 2011; OMS, 2015; SHARMA, et al., 2013; SCHUCK, et al., 2013).

Diante dos aspectos mencionados, pesquisadores têm realizado modificações químicas no centro quinonóide desses compostos, afim de produzir derivados farmacologicamente efetivos contra outras patologias como a doença de Chagas, provocado pelo *Trypanosoma cruzi*, que acomete cerca de 16 a 18 milhões de pessoas na América Latina e conduz a uma cardiomiopatia irreversível. O tratamento atual para essa doença, compreende o uso do benznidazol e nifurtimox que geram vários efeitos secundários graves, necessitando assim da contínua procura por novas substâncias ativas com reduzida toxicidade e elevada eficácia na fase crônica da doença de Chagas (BOURGUIGNON, et al., 2011).

Adicionalmente, o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos atuais tem levado à diversas pesquisas pela indústria farmacêutica, instituições governamentais e laboratórios acadêmicos para obtenção de novos antimicrobianos. Diante desse cenário inquietante, os produtos naturais e seus derivados têm se apresentado como uma opção de tratamento para várias patologias, uma vez que apresentaram menos efeitos secundários que os compostos totalmente sintéticos. Desse modo as naftoquinonas, como um grupo de compostos naturais, têm demonstrado múltiplas atividades biológicas inclusive antimicrobiana (LÓPEZ, LEYVA, CRUZ, 2011). O impacto dos produtos naturais sobre a descoberta de medicamentos é realmente considerável, tanto para o tratamento das infecções parasitárias quanto para o câncer (NDJONKA, et al., 2013).

A maioria das atividades farmacológicas apresentadas pelos compostos quinônicos, pode ser atribuída ao potencial citotóxico que possuem. Este último, tem sido explicado frequentemente com base na formação *in situ* de ERO, as quais causam danos a vários componentes celulares incluindo o DNA (JORQUEIRA, et al., 2006; SALUSTIANO, et al., 2010).

Desse modo, a síntese de piranonaftoquinonas como a α -lapachona (1) e seus derivados (figura 1), tem atraído a atenção para novas pesquisas em função de suas diversas propriedades biológicas. (MORI, et al., 2016).

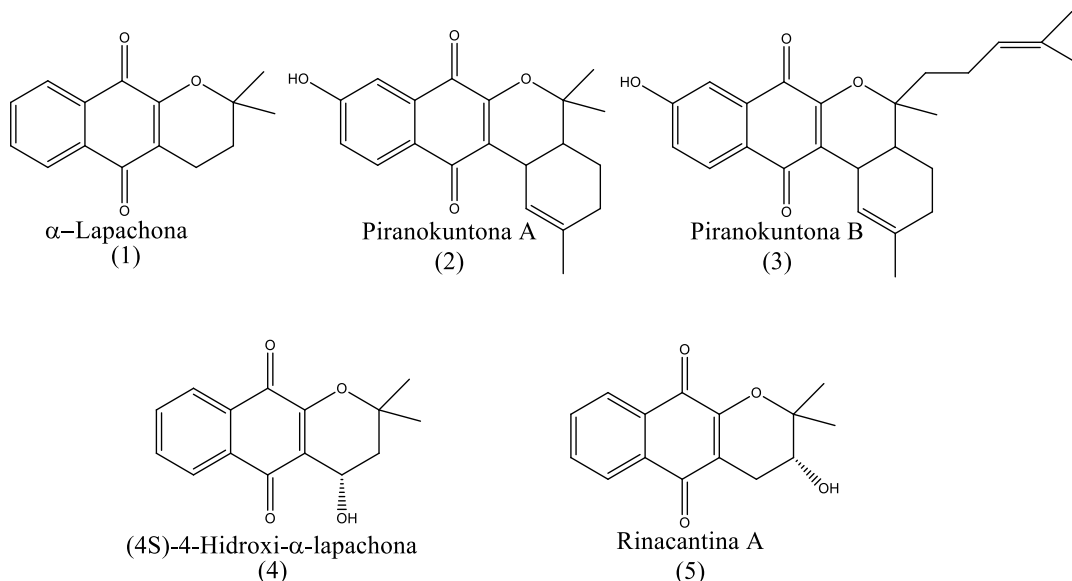


Figura 1 – Exemplos de naftoquinonas biologicamente ativas. Fonte: (MORI, et al., 2016)

A literatura tem reportado também, um amplo espectro de bioatividades para a classe das tiossemicarbazonas, como antitumorais, antiprotozoárias e antimicrobianas indicando, ainda, um amplo uso desses compostos como intermediários em reações orgânicas (TENÓRIO, GÓES, 2005).

Observando o potencial farmacológico da α -lapachona e seus derivados, juntamente com os importantes resultados biológicos obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa com β -lapachona, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de sintetizar e avaliar seis novas tiossemicarbazonas, isômeros daquelas avaliadas nesses dois trabalhos, reagindo a α -lapachona com os mesmos substituintes tiossemicarbazidas para então analisar, por comparação dos resultados, a contribuição da geometria dos isômeros, 1,2-naftoquinona e 1,4-naftoquinona, para a atividade antimicrobiana e citotóxicas desses compostos (BARBOSA, 2014; ANDRADE, 2017).

No estudo dos processos, otimizamos a extração do lapachol presente na serragem do ipê, sintetizamos a α -lapachona com outros ácidos orgânicos e os seis derivados tiossemicarbazonas da α -lapachona através de reações convencionais. Por fim, todos os derivados foram caracterizados e avaliados quanto às suas atividades antimicrobianas e citotóxicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Síntese de novas tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica desses compostos.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair e purificar o lapachol a partir da serragem do ipê roxo.
- Sintetizar a α -lapachona a partir do lapachol em meio de ácidos fosfórico e clorídrico.
- Obter seis novas tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona através de reações convencionais.
- Elucidar a estrutura de todos os compostos sintetizados por meio da espectrometria de infravermelho (IV), massas (MS), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C).
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados.
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos em estudo frente à diversas linhagens de células cancerígenas (HCT116, K562, L929 e NCI-H292).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bioatividade das naftoquinonas

As naftoquinonas são compostos aromáticos que podem ser encontrados em várias famílias de plantas assim como em fungos, algas e bactérias. Encontram-se inseridas na classe das quinonas, e são moléculas bioativas importantíssimas por demonstrarem além de sua tradicional propriedade corante, (RAMOS-PERALTA, et al., 2015) atividade contra diversos micro-organismos, como por exemplo o *Trypanosoma cruzi* (protozoário que causa a doença de Chagas), *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei* (protozoários que causam malária grave em humanos e roedores, respectivamente), vírus da imunodeficiência humana (HIV), além de apresentar atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (CARNEIRO, et al., 2016; GARCEZ, et al., 2013).

Esses compostos são usados na medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias, particularmente como agente anticancerígenos. As naftoquinonas sintéticas também apresentam diversas propriedades biológicas, que vão desde atividade antimicrobica até anticancerígena. Tendo em vista essa gama de atividades apresentadas pelas naftoquinonas, moléculas como o lapachol (8), α -lapachona (1) e β -lapachona (9) (figura 5) têm despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores em todo o mundo (CASTRO, EMERY, SILVA Jr, 2013; WINK, ASHOUR, EL-READI, 2012).

As naftoquinonas do tipo 1,4- possuem uma variedade de aplicações biológicas (ESMAIL et al., 2011) como é o caso daquelas obtidas através da fusão de hexahidropirimidina com sistemas naftoquinonas, por exemplo. A figura 2 ilustra uma estrutura geral para sistemas 1,4-naftoquinonas unidos a compostos heterocíclicos (REIS, et al., 2015).

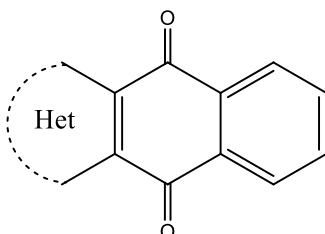


Figura 2 – Modelo geral para 1,4-naftoquinonas unidas a anel heterocíclico (carbazol, triazol, indol, furano, pirano, tiofeno quinolina etc). Fonte: (REIS, et al., 2015).

Adicionalmente, diversos estudos têm sido conduzidos combinando fitoquímicos com agentes antimicrobianos. Esse tipo de associação constitui uma alternativa para tratar infecções causadas por micro-organismos resistente a vários fármacos. Nesse cenário, as naftoquinonas como fitoquímicos altamente ativos farmacologicamente, têm sido bastante utilizadas nessas associações (MACEDO, et al., 2013).

3.1.1 Bioatividades da α -lapachona e seus derivados

Uma das estratégias utilizadas para tratar o câncer é a através da redução da densidade vascular em tumores, que tem provado ser um importante artifício no combate a essa doença. Contudo, os agentes antiangiogênicos utilizados, cuja maioria apresentam como alvo o fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) ou seus receptores, têm mostrado eficácia moderada e, as vezes, toxicidade com risco de morte. Em função dessas limitações, têm sido desenvolvidos novos agentes apresentando alvos diferentes do FCEV. Nesse contexto, a dehidro- α -lapachona (esquema 11) demonstrou atividade antivasculard nos modelos zebrafish com alvo nas vias de adesão celular, as quais constituem alvos interessantes para terapia do câncer. Utilizando modelos com camundongos, dehidro- α -lapachona apresentou redução na taxa de crescimento de tumores mamários (4T1 e E0771) na dose de 37,5 mg/Kg (baseado nos experimentos farmacocinéticos *in vivo*), aumentando em aproximadamente cinco vezes o tempo de duplicação do tamanho dos tumores 4T1 a partir de um volume tumoral inicial de 200 mm³. Esse composto não induziu perda de peso ou outros sinais visíveis, indicando ser um agente seguro e eficaz contra tumores desse tipo. (CARMELIET, JAIN, 2011; GARKAVTSEV, et al., 2011).

Cavalcante e colaboradores (2008) descreveram o efeito da α -lapachona nas contrações induzidas por carbacol ou histamina na musculatura lisa intestinal. Nesse estudo, α -lapachona antagonizou de modo considerável e dependente da concentração as contrações induzidas por 1 μ M de histamina ou carbacol no íleo da cobaia. O valor da concentração necessária para inibição de 50 % da contração (IC₅₀) obtido para α -lapachona foi igual a $7,3 \pm 0,9 \times 10^{-5}$ M na contração induzida por carbacol e $3,6 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M na contração induzida por histamina. A responsividade do íleo foi restabelecida após 45 minutos sem contato com a α -lapachona. Esta última, apresentou um perfil espasmolítico semelhante nas contrações do íleo induzidas previamente com 40 mM de KCl, apresentando uma EC₅₀ = $4,4 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ M (concentração molar da substância que produz 50% do efeito máximo). Nas contrações musculares induzidas por 1 μ M de carbacol ou 1 μ M de histamina, os valores da EC₅₀ obtidos para α -lapachona foram $3,5 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M e $1,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M respectivamente. A análise dos dados indicou que dentre

as naftoquinonas avaliadas nesse estudo, a α -lapachona foi aquela que apresentou maior potência como bloqueador das contrações musculares induzidas por cloreto de potássio, histamina ou carbacol.

Outro estudo demonstrou as mudanças induzidas pela α -lapachona nas células de macrófagos em termos da produção de ERO e de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), usando cepas RAW 264.7 e um método de sinapse artificial que permitiu a medida da corrente elétrica gerada. Esse modelo possibilitou avaliar a resposta oxidativa dessas células imune individualmente sob diferentes períodos de incubação e concentrações da α -lapachona (AMATORE, et al., 2006).

Não foi observada uma redução líquida da resposta amperométrica na concentração de 1 μ M da α -lapachona ao final de uma hora de incubação, indicando que este composto não restringiu nos macrófagos a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nessas condições. Utilizando as concentrações de 10 μ M e 100 μ M da α -lapachona, ambas por uma hora de incubação, também não foram observadas mudanças significativas na resposta das células quando comparadas com o controle. Por fim, uma mudança considerável na redução da resposta oxidativa foi constatada após 24 horas de incubação na concentração de 10 μ M (FERREIRA, et al., 2009).

Trabalhos têm indicado atividade antiparasitária para o composto α -lapachona, demonstrando que o mesmo reduziu a viabilidade celular das formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* a um percentual de 2,9 % em relação ao controle negativo (100%), na concentração de 24,7 μ M desse composto (SALAS, et al., 2008). Nesse ponto é importante mencionar que o tratamento padrão para a doença de Chagas inclui dois agentes nitro-heterocíclico: o 5-nitrofurano e o 2-nitroimidazol os quais apresentam baixa atividade na fase crônica da doença além de efeitos consideráveis em outros alvos, levando à toxicidade (GUEDES, et al., 2011; SOTERO, CASTRO, 2011; SILVA Jr, et al., 2008).

Nesse contexto, a α -lapachona tem se mostrado um dos mais importantes derivados de lapachol atuando também na prevenção do câncer. Esse composto tem apresentado uma efetiva inibição da topoisomerase II de DNA, e sua estrutura apresenta um alto potencial como protótipo para o desenvolvimento de medicamentos para tratar linhagem celular resistente a múltiplos fármacos com baixa expressões de topoisomerase II (WEI, et al., 2009). Os derivados da α -lapachona também apresentaram importantes atividades antitumorais, fornecendo

compostos com baixa toxicidade e atividade biológica melhorada (BALA, RAJESH, PERUMAL, 2012).

Alguns derivados da α -lapachona, mostrados na figura 3, foram obtidos através de hibridização molecular e exibiram citotoxicidade em relação à linhagem celular de câncer de mama MCF-7 (resistente ao estresse oxidativo). A partir dessa observação, esses compostos foram testados em outras linhagens celulares como K562 (obtidas a partir de pacientes com leucemia mieloide crônica) e Daudi (derivadas de linfoma de Burkitt). Os efeitos citotóxicos desses derivados na linhagem MCF-7 variou de acordo com o grupo substituinte presente no anel E, diferentemente dos testes utilizando essas outras linhagens celulares cujos efeitos citotóxicos foram menos dependente dos substituintes presentes. A toxicidade dos compostos 6a, 6c e 6d para as células mononucleares do sangue periférico humano foi estabelecida, exibindo valores de IC_{50} acima de 23 μ M para os híbridos 6a e 6c. O derivado 6d apresentou um valor menor igual a 8,56 μ M. Os compostos hidroxilados 6b e 6c apresentaram atividades 5 e 4 vezes maior respectivamente que o derivado 6a cujos oxigênios fazem parte do grupo metilenodioxi menos polar (SALUSTIANO, et al., 2010).

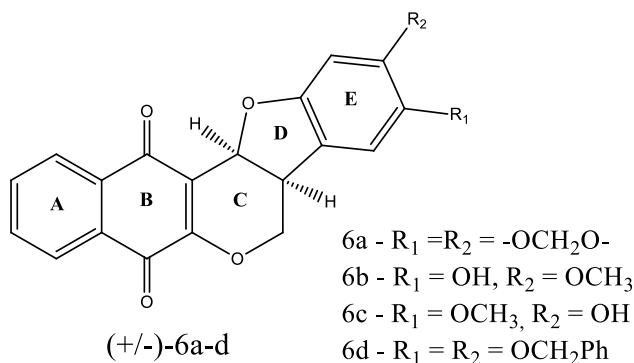


Figura 3 – Derivados da α -lapachona com atividade citotóxica para algumas células leucêmicas. Fonte: (SALUSTIANO, et al., 2010)

Pesquisas apontaram indução de apoptose pelos compostos 6a e 6c, por isso eles foram testados em nove amostras de células leucêmicas sendo oito obtidas a partir de pacientes com leucemia mieloide crônica e uma a partir de um indivíduo com leucemia linfóide aguda. A porcentagem média de apoptose foi quantificada após 24 horas de incubação usando 5 μ M de cada composto. Utilizando as amostras de células leucêmicas do tipo mieloide crônica, a porcentagem média de apoptose para ambos os compostos (6a e 6c) foi de 12,5 %, já para a

amostra de células leucêmicas do tipo linfóide aguda essa porcentagem foi igual a 39 % para qualquer um dos dois híbridos (SALUSTIANO, et al., 2010).

O anel C da α -lapachona, apresentado no esquema 3 (seção 3.4), tem mostrado ser uma porção estrutural relevante para a atividade tripanocida desse composto. Adicionalmente, a literatura tem indicado uma forte relação entre o centro redox dessa molécula e a bioatividade em discussão. Desse modo o composto epóxi- α -lapachona mostrado na figura 4, foi avaliado contra as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* e apresentou elevada potência como agente tripanocida, com $IC_{50} = 1,3 \mu M$. Paralelamente, esse derivado epóxi demonstrou baixa toxicidade para linhagem celular VERO (abreviação de “verda reno” que significa rim verde, uma linhagem estabelecida a partir de células renais de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*) além de elevada especificidade quando comparado com a molécula controle β -lapachona (FERREIRA, et al., 2006).

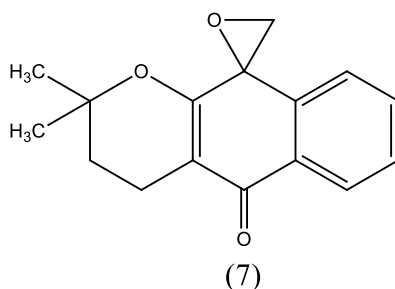


Figura 4 – Estrutura molecular da epóxi- α -lapachona. Fonte: (SOUZA-SILVA, et al., 2015).

A atividade tripanocida da Epóxi- α -lapachona também foi avaliada nas formas tripomastigota do *Trypanossoma cruzi*. Para isso foram usadas duas diferentes cepas desse parasito (Y e Colombiana). Os resultados preliminares revelaram que esse composto matou facilmente mais de 50% das cepas Y do *T. cruzi* em um período de 24 horas na concentração de 50 μM , exibindo um efeito dose-dependente em concentrações maiores. Um perfil responsivo diferente foi observado usando cepas Colombiana do *T. cruzi* (17%). Contudo, a atividade tripanocida da epóxi- α -lapachona para as duas cepas avaliadas aumentou em períodos de incubação maiores (48 e 72 horas). A atividade tripanocida desse derivado epóxi foi testada ainda, usando as formas amastigota do *T. cruzi*. Empregando uma concentração de 75 μM do composto e um período de incubação de 24 horas, o resultado indicou um efeito tripanocida ligeiramente maior em macrófagos infectados com as cepas Y do que naqueles infectados com cepas colombiana (85,6% e 71,9% de inibição do crescimento parasitário, respectivamente).

sendo observada uma redução da infectividade de ambas as cepas (BOURGUIGNON, et al., 2009).

A epóxi- α -lapachona também tem se mostrado um bom candidato a atuar como principal agente no tratamento das leishmanioses, uma vez que tem apresentado baixa citotoxicidade em células de mamíferos e efetividade contra *Leishmania (Viannia) Braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*. Esse composto matou facilmente cepas promastigotas dessas duas espécies agindo também contra cepas amastigotas, provando que ele é de fato um agente leishmanicida potente (SOUZA-SILVA, et al., 2015).

A incubação simultânea de cepas promastigotas de *Leishmania (Viannia) Brasiliensis* e epóxi- α -lapachona resultou em uma importante diminuição do número desses micro-organismos quando comparado com as culturas controle. Após 24 horas de incubação, houve uma redução de 98,5% da viabilidade das cepas promastigotas de *Leishmania (Viannia) Brasiliensis* usando 75 μ M do derivado epóxi em questão. Com um período de incubação de 48 horas e uma concentração menor de 50 μ M de epóxi- α -lapachona, foi observado uma taxa de redução microbiana semelhante (98,6%) (SOUZA-SILVA, et al., 2014).

Trabalhos têm demonstrado que epóxi- α -lapachona pode atuar nas proteases de serina e cisteína, dificultando suas atividades (BOURGUIGNON, et al., 2011). Sabe-se que essas proteases são fatores de virulência essenciais para *Leishmania* spp. (SILVA-ALMEIDA, et al., 2012). Algumas proteases de serina foram relacionadas com a infecção de macrófagos murinos por parasitos, e com a permanência desses micro-organismos dentro da célula. Desse modo, foi avaliado o poder inibitório da epóxi- α -lapachona em relação às serino proteases de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* a partir de cepas promastigotas e amastigotas, e o resultado comprovou realmente essa inibição enzimática, uma vez que diferentes graus de inibição proteica por epóxi- α -lapachona foram observados usando diversos substratos (SOUZA-SILVA, et al., 2015).

Outros derivados da α -lapachona biologicamente ativos podem ser encontrados na seção 3.5 adiante.

3.1.2 Bioatividade dos isômeros da α -lapachona (lapachol e β -lapachona)

No começo do século XX se deu inicialmente a investigação sobre a reatividade química do lapachol, α -lapachona e β -lapachona (figura 5). O lapachol pode ser facilmente isolado da serragem do ipê roxo, utilizando-se um método de extração ácido-base, e é obtido em rendimentos razoáveis. Esse composto tem apresentado uma impressionante lista de atividades

biológicas como: antibacterianas, tripanocidas, leishmanicidas, antitumorais, pesticidas entre outras, (COSTA, et al., 2013) além de uma potente atividade citotóxica. Essa ampla gama de atividades pode explicar por que o Ipê roxo (uma Bignoniaceae do gênero *Handroanthus sp*) é uma planta conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antibióticas e antineoplásicas (DELARMELINA, et al., 2016). Essa árvore tem sido tradicionalmente utilizada pelos povos indígenas para tratar infecções parasitárias, incluindo a malária. Nesse ponto, vale salientar que o lapachol foi a primeira naftoquinona descoberta a apresentar atividade antimalárica, sendo mais tarde observado que sua toxicidade contra o parasito foi devido a sua interação com a cadeia respiratória mitocondrial. (CARNEIRO, et al., 2016; SHARMA, et al., 2013).

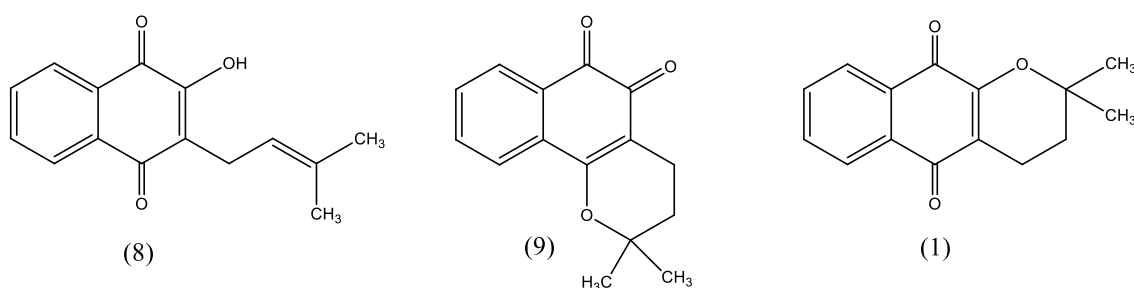


Figura 5 – Estruturas do lapachol (8), β -lapachona (9) e α -lapachona (1). Fonte: adaptado de (BARBOSA, NETO, 2013).

Nos últimos anos, pesquisadores têm sido atraídos pela a atividade anticancerígena dessa 1,4-naftoquinona. Nesse sentido, algumas *o*- e *p*-naftoquinonas como as apresentadas na figura 6, têm sido avaliadas contra o câncer esofágico de células escamosas (SCOC) (SUNASSEE, et al., 2013). O composto 14, por exemplo, apresentou uma atividade citotóxica onze vezes maior do que o medicamento de escolha, a cisplatina (SILVA Jr, et al., 2011).

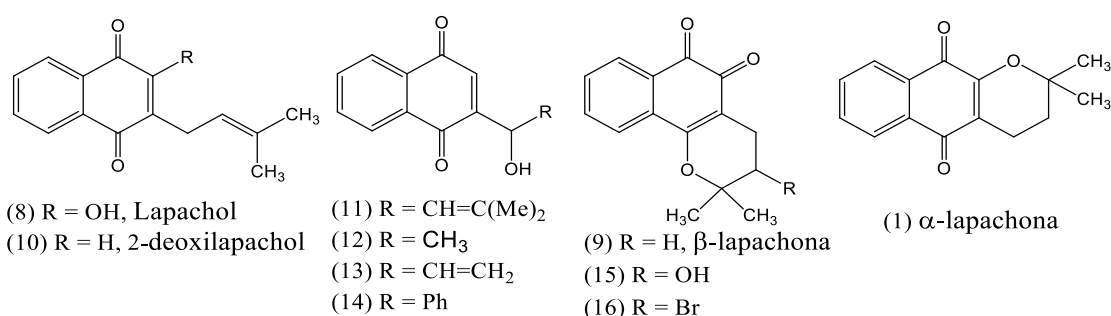


Figura 6 – *Orto* e *para*-naftoquinonas avaliadas contra linhagem de células esofágicas cancerosas. Fonte: (SILVA Jr, et al., 2011)

O alto potencial farmacológico do lapachol (COSTA, et al., 2013) explica seu uso como protótipo para obtenção de novos derivados anticancerígenos, e várias substâncias já foram descritas com potente atividade contra diversas linhagens celulares de câncer, apresentando valores de IC_{50} inferiores aos da doxorubicina, um medicamento importante utilizado no tratamento do câncer (SILVA Jr, et al., 2011).

A β -lapachona, se mostrou uma das moléculas mais promissoras derivada do lapachol pois, além de apresentar atividade antibacteriana, antifúngica, tripanocida e antiviral exibiu citotoxicidade para uma variedade de cânceres humanos, que são células tipicamente mais susceptíveis ao dano oxidativo do que as normais (CASTRO, EMERY, SILVA Jr., 2013; COSTA, et al., 2013). Um estudo mostrou que a β -lapachona induziu apoptose na linhagem celular T-24 em carcinoma de bexiga humana e está associada com um aumento na atividade intracelular da protease cisteína denominada caspase-3, que desempenha um papel intrínseco nas etapas finais da apoptose (SUNASSEE, et al., 2013). Adicionalmente, têm sido descrita atividades tripanocida e leishmanicidas de derivados 1,2,3-triazóis com base na estrutura das lapachonas (DIOGO, et al., 2013).

A estrutura da α -lapachona e do seu isômero β - também têm sido amplamente utilizadas como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas ativas. Desse modo, foi relatada nos últimos anos a preparação desses compostos apresentando importantes atividades farmacológicas, como é o caso dos derivados nitrogenados os quais são conhecidos por apresentar excelentes atividades antitumorais (FERREIRA, FERREIRA, SILVA, 2010; CAVALCANTI, et al., 2013; BARBOSA, et al., 2005).

Pesquisas científicas são constantemente realizadas para o desenvolvimento de fármacos direcionados às doenças negligenciadas, tais como leishmaniose e doença de Chagas por exemplo. Os medicamentos usados clinicamente para tratar a leishmaniose como a paromomicina e anfotericina B, promovem efeitos tóxicos e ainda induz à resistência. Dessa forma, fármacos mais seguros e efetivos tornam-se cada vez mais necessários (CROFT, OLLIARO, 2011; SUNDAR, SINGH, 2013).

3.2 Mecanismos de ação citotóxica das naftoquinonas

As naftoquinonas estão estruturalmente relacionadas ao naftaleno e são caracterizadas pela presença de dois grupos carbonila nas posições relativas 1,2 ou 1,4. Esses compostos são altamente reativos e apresentam diversas colorações (KUMAGAI, et al., 2012; LÓPEZ, LEYVA, CRUZ, 2011).

Devido às propriedades estruturais dessas moléculas suas atividades biológicas têm sido relacionadas a estimulação do estresse oxidativo e alquilação dos nucleófilos celulares (CAVALCANTI, et al., 2011). Contudo, essa relação refere-se as propriedades redox das quinonas que podem frequentemente induzir a apoptose em células cancerígenas via estresse oxidativo, desencadeado *in situ* pela produção de espécies reativas de oxigênio (KOVACIC, SOMANATHAN, 2011). Paralelamente, outras evidências preconizam que algumas quinonas podem se intercalar diretamente com DNA ou inibir proteínas que regulam a replicação do DNA e biogêneses de nucleotídeos (SUNASSEE, et al., 2013).

Segundo Diogo e colaboradores (2013), as características eletrônicas das quinonas sofrem interferência de grupos substituintes, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e efeitos conformacionais, que somados atuam na estabilidade do ânion radical semiquinona gerado. Assim, o potencial em aceitar um ou dois elétrons, produzindo respectivamente o ânion radical semiquinona ($Q^{\cdot-}$) e o diânion hidroquinona (Q^{2-}) (figura 7), pode ser controlado sinteticamente por modificação dos grupos substituintes doadores e retiradores de elétrons ligados ao anel 1,4-naftoquinona, com o objetivo de melhorar suas atividades terapêuticas. Nesse contexto, as naftoquinonas e seus derivados, representam um conjunto importantíssimo de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos. (RAMOS-PERALTA, et al., 2015).

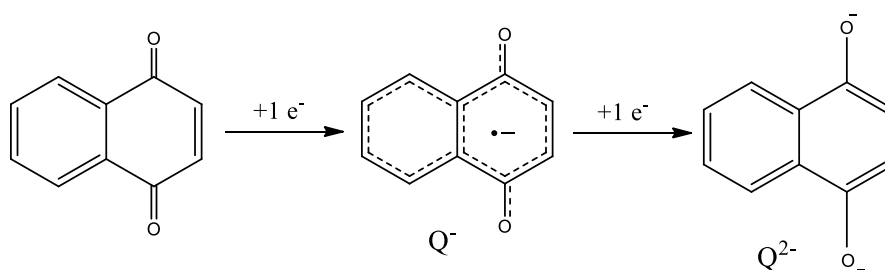
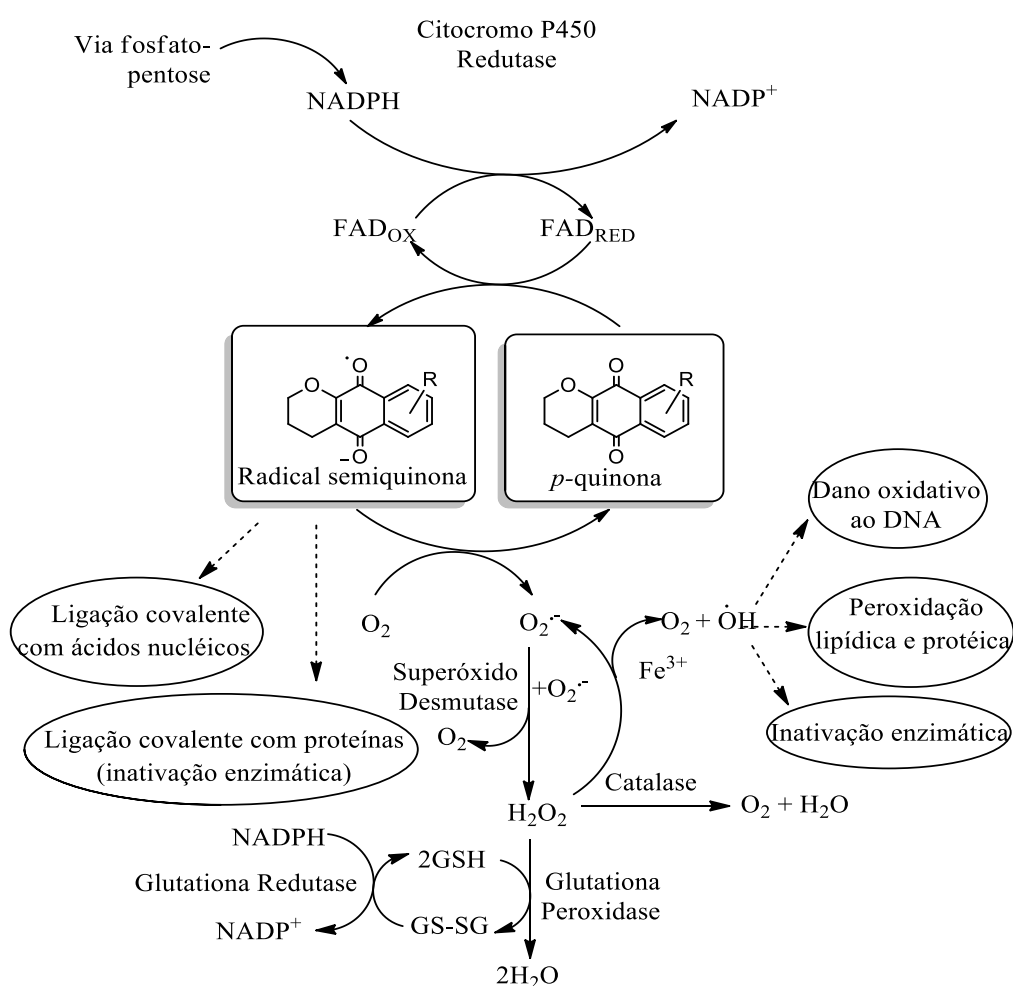


Figura 7 – Propriedade redox do anel 1,4-naftoquinona. Formação do ânion radical semiquinona ($Q^{\cdot-}$) e diânion hidroquinona (Q^{2-}) por redução sequencial de dois elétrons. Fonte: (RAMOS-PERALTA, et al., 2015).

Devido a essas propriedades eletrônicas, as naftoquinonas atuam em um ciclo redox (esquema 1) que pode ser iniciado através da redução envolvendo um ou dois elétrons. As semiquinonas geradas, podem promover dano celular por si só ou participar desse ciclo reagindo com o oxigênio molecular gerando ânion radical superóxido, restaurando a quinona inicial que poderá ser reduzida novamente. Esse ciclo promove o estresse oxidativo em função do consumo de equivalentes redutores das células e da formação de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, as naftoquinonas e seus produtos de redução, semiquinonas e hidroquinonas, apresentam grande importância toxicológica em função de sua facilidade de formar ERO [ânions radicais superóxidos ($O_2^{\cdot -}$), radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)], que podem lesionar membranas, proteínas e DNA, sendo capaz de estimular o processo de apoptose e até mesmo a carcinogênese. Todavia, é importante salientar que uma infinidade de quinonas tem sido elaborada como agentes anticancerígenos (CASTRO, EMERY, SILVA Jr, 2013; SOUZA, LOPES, ANDRADE, 2016).



Esquema 1 - Representação do ciclo redox e a formação dos metabólitos. Fonte: (SALAS, et al., 2008).

Considera-se que espécies reativas de oxigênio formados em excesso no ambiente intracelular, são capazes de ativar a via intrínseca da apoptose celular pela permeabilidade da mitocôndria e ativação de enzimas envolvidas no processo apoptótico. Julga-se que esse seja o mecanismo responsável pela ação citotóxica dessas substâncias, tanto em micro-organismos quanto em células tumorais (CARNEIRO, et al., 2016).

3.3 Métodos de extração e purificação do lapachol

O lapachol pode ser extraído por diversos métodos, porém sempre fazendo uso da sua capacidade de ser solubilizado em alguns solventes orgânicos e de atuar como ácido fraco em reações ácido-base (FONSECA, BRAGA, SANTANA, 2003).

Gonçalves de Lima e colaboradores (1962), utilizaram uma solução aquosa de carbonato de sódio para tratar o extrato benzênico da serragem do “Pau D’arco” roxo (*Handroanthus sp.*) purificando, em seguida, a solução alcalina aquosa do lapachol com benzeno até a eliminação dos constituintes extraíveis por benzeno. Esse processo de purificação foi repetido várias vezes. Posteriormente, o lapachol foi precipitado por acidificação lenta com ácido sulfúrico diluído e então separado por dissolução em benzeno. O produto resultante, foi cristalizado em etanol hidratado e em seguida cromatografado em coluna de sílica gel utilizando éter de petróleo como fase móvel. A fração de cor vermelha-escuro obtida foi por fim recristalizada em etanol.

D’Albuquerque (1968), descreveu uma metodologia semelhante na qual o extrato benzênico do tronco do *Tecoma impetiginosa*, foi tratado com uma solução de hidróxido de sódio à 2 %. A mistura alcalina resultante, após purificação e filtração, foi acidificada suavemente com ácido clorídrico diluído sendo observada uma mudança de coloração (para amarelo) e imediata precipitação do lapachol. Em seguida esse último foi filtrado, lavado com água, seco ao ar e cristalizado em etanol. O produto resultante foi cromatografado em coluna de sílica, utilizando éter de petróleo e benzeno (8:2) como sistema eluente. A primeira fração obtida foi evaporada à vácuo e o resíduo dissolvido em benzeno. A partir daqui todo o processo foi repetido até a recristalização em etanol à quente. O rendimento do lapachol puro foi de 1,2 %.

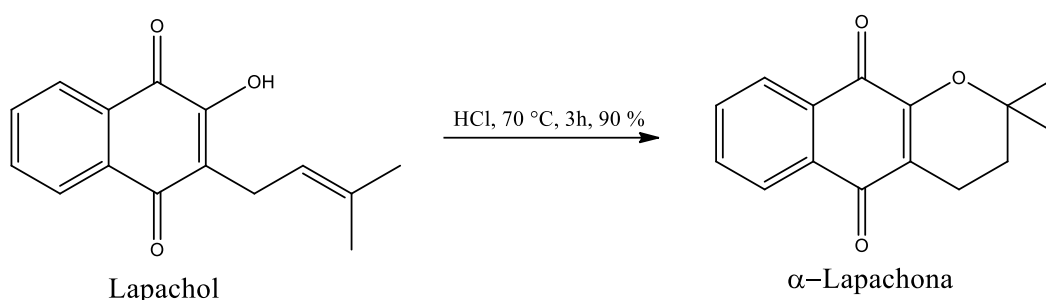
Tavares e colaboradores (2013), avaliaram o rendimento do lapachol a partir da extração com diversos solventes, para isso eles também empregaram uma metodologia extrativa ácido-base. Em seu trabalho, utilizaram 5 g do pó comercial da casca do Ipê roxo em 40 mL de cada solução experimentada (água destilada, éter e acetona à 50%), agitando-as por 20 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado 0,15 g/mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) à essas

soluções. Os resíduos foram separados por filtração à vácuo e os cristais do lapachol precipitados utilizando HCl concentrado e secos à 40 °C em estufa. As soluções de éter, acetona e água destilada apresentaram rendimentos de 0,89, 0,34 e 0,22 g de lapachol impuro respectivamente.

3.4 Métodos de obtenção da α -lapachona e seus derivados.

A metodologia mais amplamente encontrada na literatura para a obtenção da α -lapachona, baseia-se no tratamento do lapachol com ácido clorídrico concentrado (HCl) para promover a ciclização intramolecular dessa naftoquinona. Esse procedimento é altamente viável uma vez que requer materiais e equipamentos de baixo custo (BARBOSA, NETO, 2013).

Esse método tem fornecido majoritariamente o isômero α -lapachona em elevados rendimentos, tanto à temperatura ambiente quanto sob aquecimento. Nesse sentido, Salas e colaboradores (2008) adicionaram ao lapachol (50 mg, 0,21 mmol) ácido clorídrico 12 N (20 mL) mantendo a mistura à 70 °C por 3 horas (Esquema 2). Posteriormente, após resfriamento até a temperatura ambiente, foi adicionada água gelada (20 mL) e a mistura reacional extraída com clorofórmio (2x 25 mL). Após lavagem da fase orgânica com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e purificação do resíduo resultante por coluna cromatográfica (usando clorofórmio como fase móvel), o produto foi obtido em um rendimento de 90%.

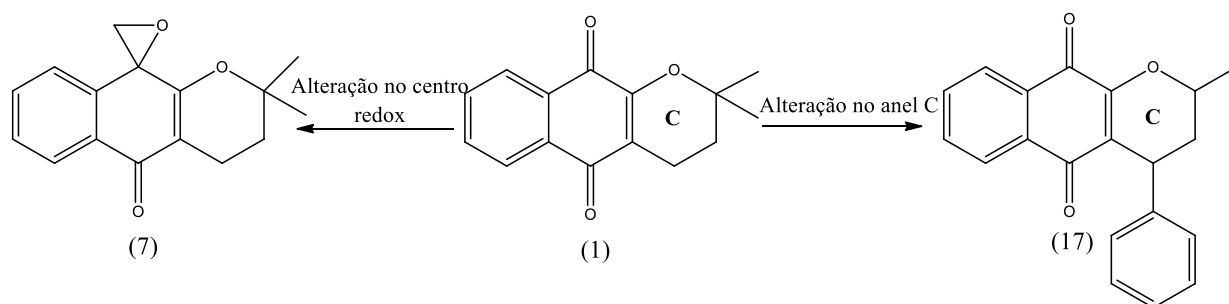


Esquema 2 – Formação da α -lapachona a partir do lapachol. Fonte: (SALAS, et al., 2008).

Além disso, a facilidade de se obter a α -lapachona através do lapachol é outro fator importante que deve ser mencionado. Este último, tem sido ainda utilizado como protótipo para a síntese de outros compostos incluindo a β -lapachona, um isômero de posição da α -lapachona. (COSTA, et al., 2013).

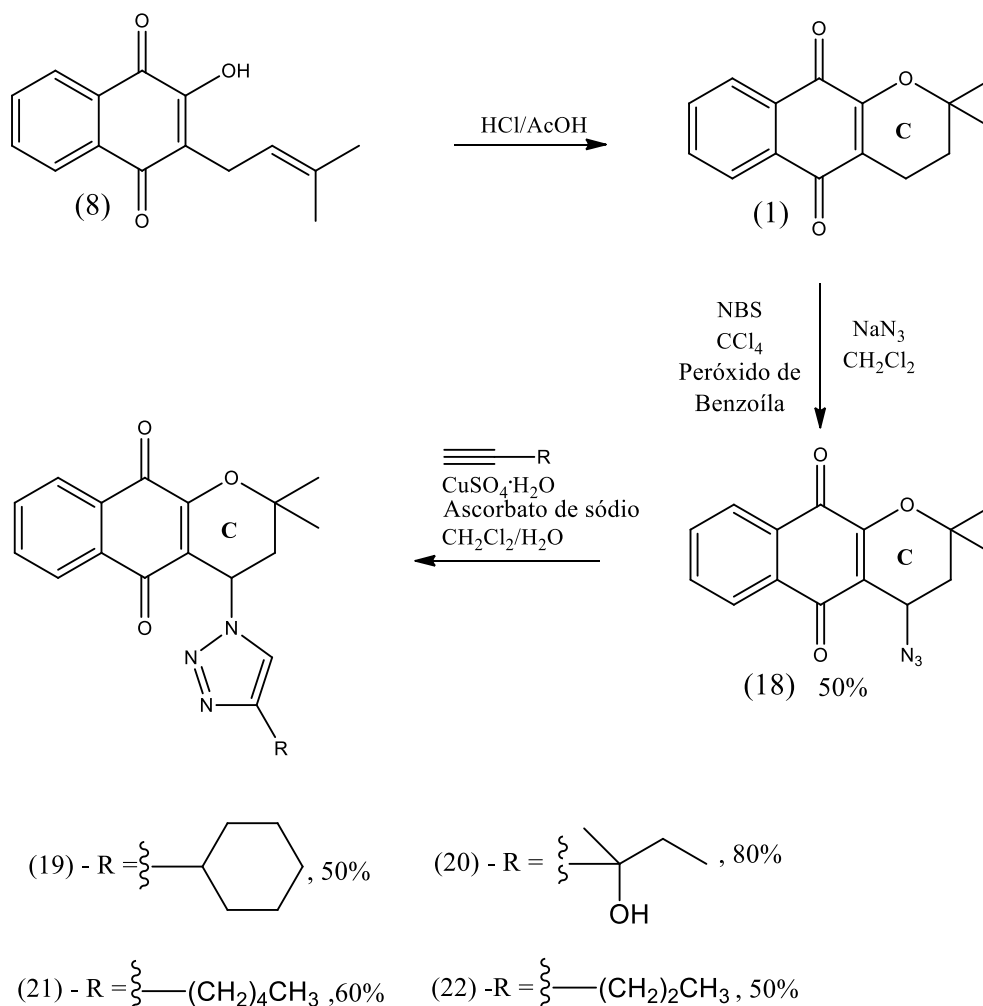
É importante mencionar que a reatividade química do lapachol está relacionada a cadeia lateral prenil, que é suscetível a reação com diferentes eletrófilos. Além da α - e β -lapachona, a síntese de outras piranonaftoquinonas tem sido também intensamente investigadas com o objetivo de desenvolver novos medicamentos, uma vez que esses compostos têm apresentado importantes aplicações biológicas. (DELARMELINA, et al., 2016; VIEIRA, et al., 2015).

Trabalhos anteriores têm descrito tanto a preparação de derivados da α -lapachona quanto do seu homólogo inferior nor- α -lapachona, um análogo com relevante atividade biológica (CAVALCANTI, et al., 2013). Desse modo, tem sido utilizado a α -lapachona como protótipo para obtenção de novos derivados farmacologicamente ativos através de alterações estruturais que são mostradas no esquema 3. Como pode ser visto, modificações no anel C foram realizadas através da remoção de um grupo metil e inserção de um grupo aril gerando o composto (17), o qual apresentou atividade contra o *Trypanossoma cruzi*. O composto (7), preparado por modificação no centro redox, além de atuar contra o *T. cruzi*, apresentou baixa citotoxicidade em linhagem celular VERO (CASTRO, EMERY, SILVA Jr, 2013).



Esquema 3 – Derivados da α -lapachona obtidos através de alterações no anel C e no centro redox. Fonte: (CASTRO, EMERY, SILVA Jr, 2013).

As alterações no anel C da α -lapachona foram realizadas com o objetivo de se obter compostos com melhores atividades farmacológicas e ao mesmo tempo com baixa citotoxicidade e seletividade adequada. A formação de derivados 1,2,3-triazóis a partir da α -lapachona é um exemplo da aplicabilidade dessa estratégia de derivação e está representada no esquema 4 (CASTRO, EMERY, SILVA Jr, 2013).

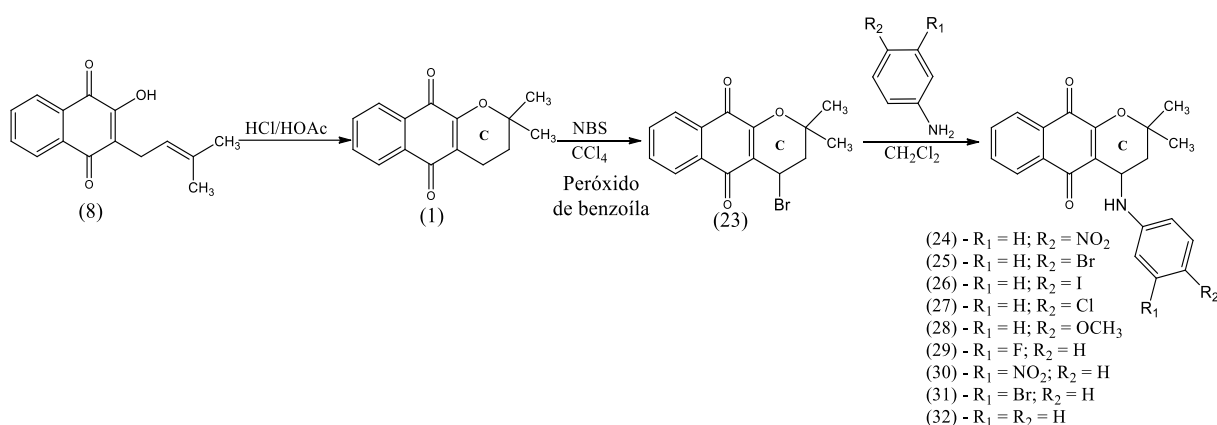


Esquema 4 – Derivados 1,2,3-triazóis da α-lapachona (1) obtidos a partir de lapachol (8). Fonte: (CASTRO, EMERY, SILVA Jr, 2013).

A primeira etapa de obtenção dos compostos (19-22), ocorreu através da ciclização simples do lapachol em meio ácido (HCl/AcOH) formando a α-lapachona. Na etapa seguinte, a α-lapachona foi tratada com N-bromosuccinimida (NBS) em presença de peróxido de benzoíla formando um intermediário bromado (4-bromo-α-lapachona) que, após reagir com a azida de sódio, produziu o composto 4-azida-α-lapachona (18). A última etapa ocorreu de forma catalítica utilizando sulfato de cobre hidratado (CuSO₄·H₂O). Os compostos (19-22), apresentaram elevada atividade contra cepas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* que são resistentes e sensíveis à antimônio, superando a ação dos compostos à base de antimônio trivalente Sb(III) usados como tratamento padrão dessa parasitose. Isso indica que modificações no anel C da α-lapachona é altamente importante para a atividade leishmanicida (GUIMARÃES, et al., 2013; SALAS, et al., 2008). Esses derivados também foram avaliados contra sete linhagens celulares cancerígenas e apresentaram moderada

atividade com valores de concentração inibitória variando entre 2,12-10,0 μM (CRUZ, et al., 2014).

Utilizando uma metodologia semelhante, foram descritos derivados da α -lapachona com substituintes arilamino inseridos no anel C (esquema 5). Nesse caso, a 4-bromo- α -lapachona (23) reagiu com várias anilinas substituídas, contendo grupos doadores e retiradores de elétrons, através de uma substituição nucleofílica para formar os derivados (24-32) em altos rendimentos. Esses últimos, foram avaliados contra diversas linhagens celulares de câncer e apresentaram de moderada a alta atividade (CRUZ, et al., 2014). Esses derivados também foram testados contra as formas tripomastigota do *Trypanossoma cruzi*, e dentre eles o composto (29) se destacou como o mais ativo, sendo em média duas vezes mais potente que o composto de referência benznidazol (JARDIM, et al., 2015).

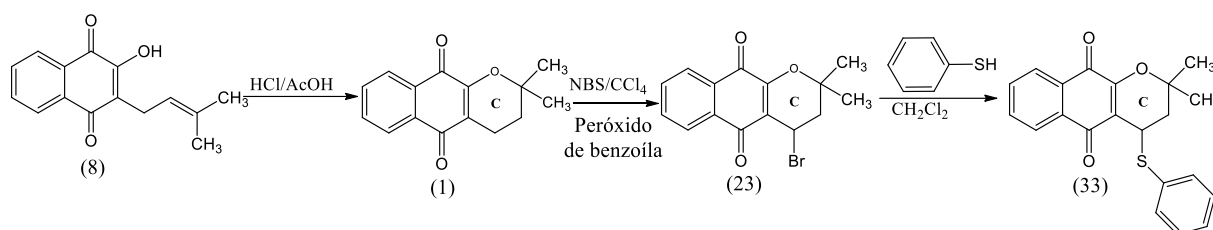


Esquema 5 – Síntese de derivados arilamino da α -lapachona com substituição no anel C. Fonte: (CRUZ, et al., 2014; SILVA Jr, et al., 2008).

O procedimento de síntese e a bioatividade do derivado (32) foram descritos por Silva e colaboradores onde o composto bromado (23) (307 mg, 1mmol), produzido a partir da α -lapachona, foi dissolvido em 5 mL de anilina (5,1 g, 58 mmol) e a mistura deixada para reagir sob agitação durante 30 minutos. Essa metodologia forneceu o produto como um sólido marrom (233 mg, 0,7 mmol) em 70% de rendimento. Esse derivado arilamino, apresentou uma bioatividade superior àquela encontrada para α -lapachona, sendo isso devido provavelmente ao aumento da lipofilicidade, melhorando assim sua penetração através das membranas (SILVA Jr, et al., 2008).

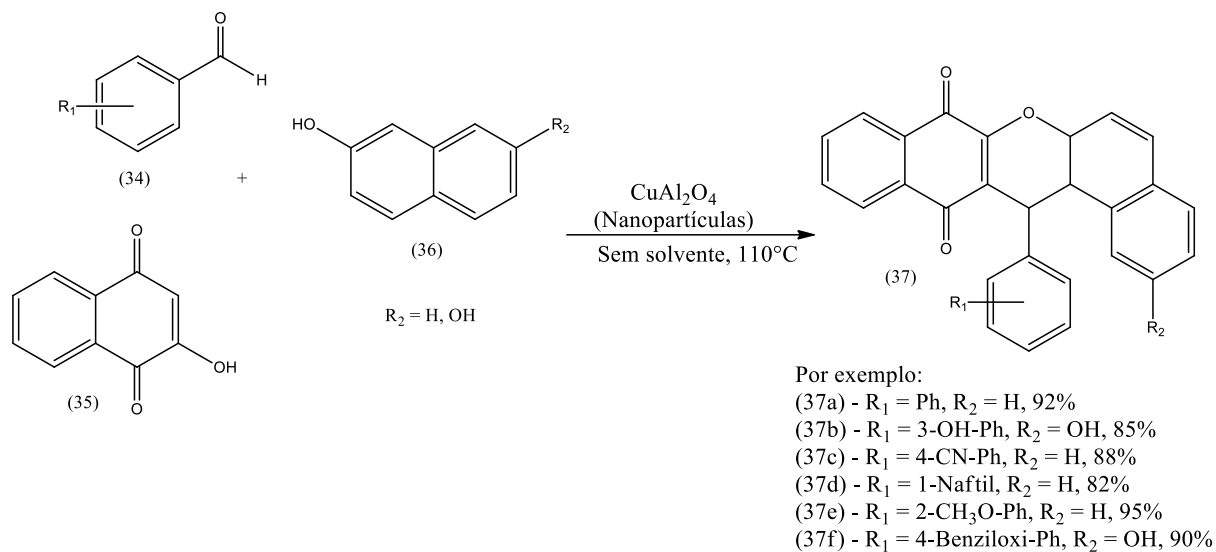
Utilizando ainda essa mesma metodologia foi obtido o composto (33), um derivado da α -lapachona tio substituído no anel C (esquema 6). Como pode ser visto, o intermediário

bromado (23) reagiu com o tiofenol formando o composto final. Este tio derivado foi avaliado contra a linhagem celular tumoral HL-60 (leucemia promielocítica humana) apresentando alta efetividade, com $IC_{50} = 2,91 \mu M$. (CRUZ, et al., 2014).



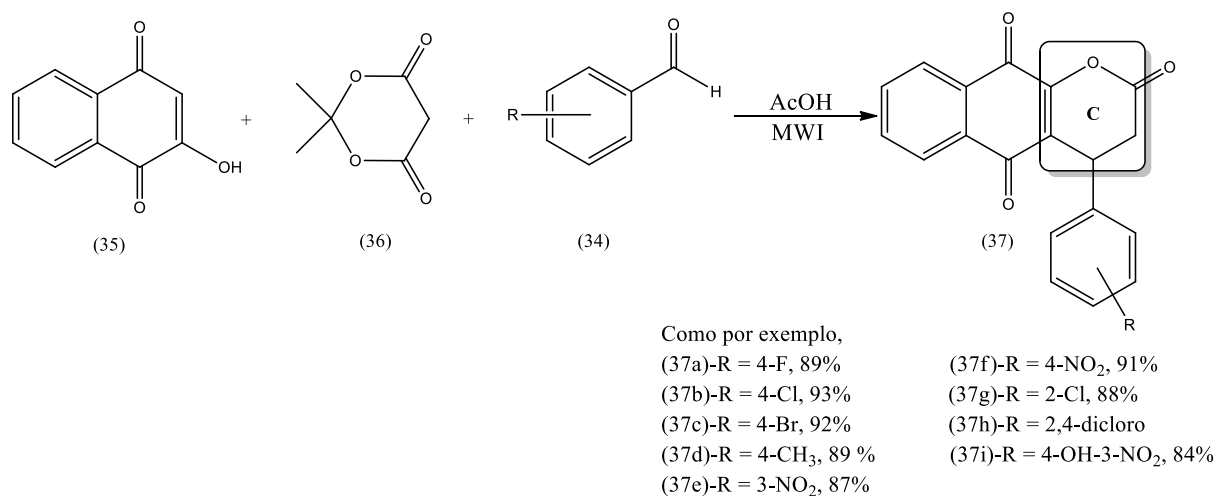
Esquema 6 – Síntese do tio derivado da α -lapachona (33), obtido a partir de lapachol. Fonte: (CRUZ, et al., 2014).

Mori e colaboradores (2016) descreveram um método para preparação de derivados da α -lapachona que utiliza nanopartículas de aluminato de cobre ($CuAl_2O_4$), como catalisador nas reações. Desse modo, os compostos (37a-37f) apresentados no esquema 7 foram sintetizadas através de uma reação de três componentes usando aldeídos aromáticos (34), 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (35) e β -naftóis (36) em condições livre de solventes, utilizando um nanocatalisador de aluminato de cobre ($CuAl_2O_4$). A reação que levou a formação do derivado (37a) foi tomada como referência para verificar a viabilidade desse método, e forneceu o produto em 92% de rendimento após 70 minutos de reação à $110^\circ C$ usando 0,07 mmol de catalisador. Se presume que essa reação de condensação ocorra em três etapas. Inicialmente ocorre o acoplamento Knoevenagel do aldeído com o naftol, seguida de uma adição de Michael entre o intermediário e a Lawsona (35) finalizando com a ciclização intramolecular e desidratação. Esse processo de síntese é amplamente conhecido por se tratar de um processo verde, uma vez que não utiliza solvente. A temperatura nessa reação apresentou um papel chave, uma vez que seu aumento afetou diretamente o rendimento do produto para altos valores à $110^\circ C$.



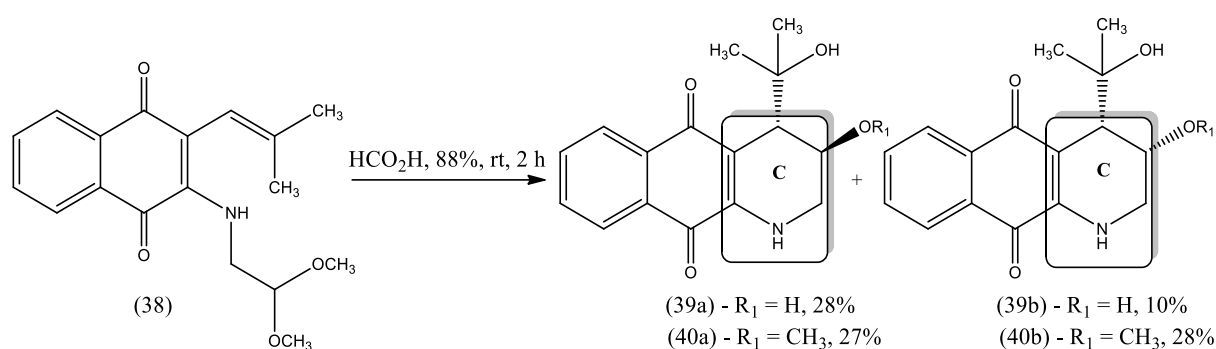
Esquema 7 – Síntese de análogos da α -lapachona através da reação *one pot* de três componentes usando aluminato de cobre (CuAl_2O_4) como catalisador. Fonte: (MORI, et al., 2016)

Wei e colaboradores (2009) prepararam novos derivados da α -lapachona com diferentes grupos aril inseridos no anel C através de uma condensação de três componentes (esquema 8). Usando 4-clorobenzaldeído, ácido de Meldrum (36) e lawsona (35) por exemplo, foi produzido o composto (37b) sendo todos os demais derivados obtidos usando os aldeídos correspondentes. Essas reações ocorreram sob irradiação de micro-ondas com excelentes rendimentos, constituindo uma forma simples e eficiente de sintetizar os referidos derivados. Os autores sugeriram atividade que inibiu a topoisomerase II de DNA para os análogos da α -lapachona (37a-37i).



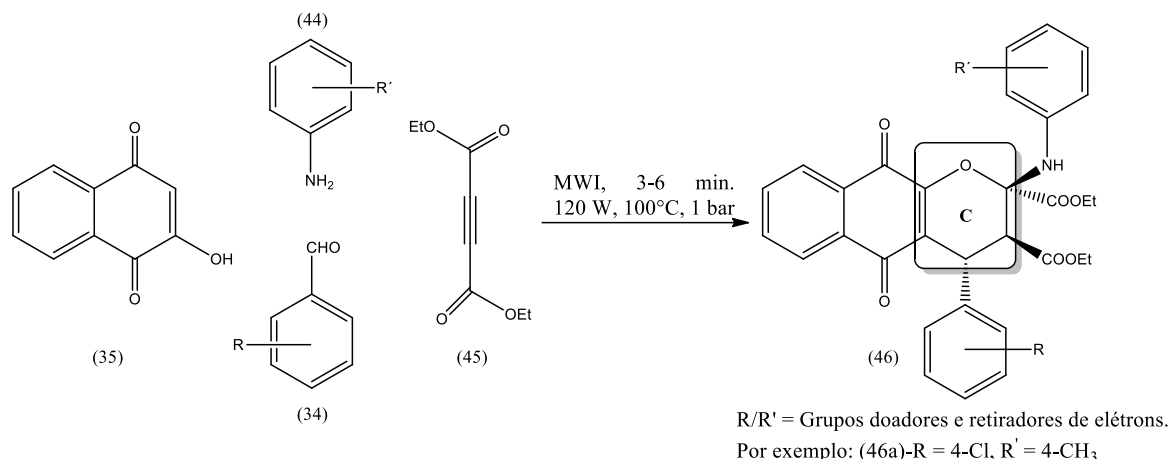
Esquema 8 – Reação de condensação em *one pot* de três componentes para obtenção dos derivados da α -lapachona (37a-37i). Fonte: (WEI, et al., 2009).

Barbosa e colaboradores (2005), descreveram outro método para obtenção de derivados da α -lapachona com alterações no anel C. Eles sintetizaram os compostos (39a-40b) (esquema 9), preparando inicialmente o composto (38). Este último, foi obtido fazendo reagir nor-lapachol com carbonato de potássio e sulfato de dimetila em acetona, submetendo em seguida o produto metoxilado a substituição nucleofílica com uma amina apropriada (estruturas não apresentadas). Posteriormente, por meio de uma reação de ciclização de Prins, os derivados estereoisoméricos foram obtidos. Os compostos (40a) e (40b) apresentaram atividade moluscicida contra o caracol adulto *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, mostrando uma LC_{50} de 64,55 e 99,00 μ M, respectivamente.



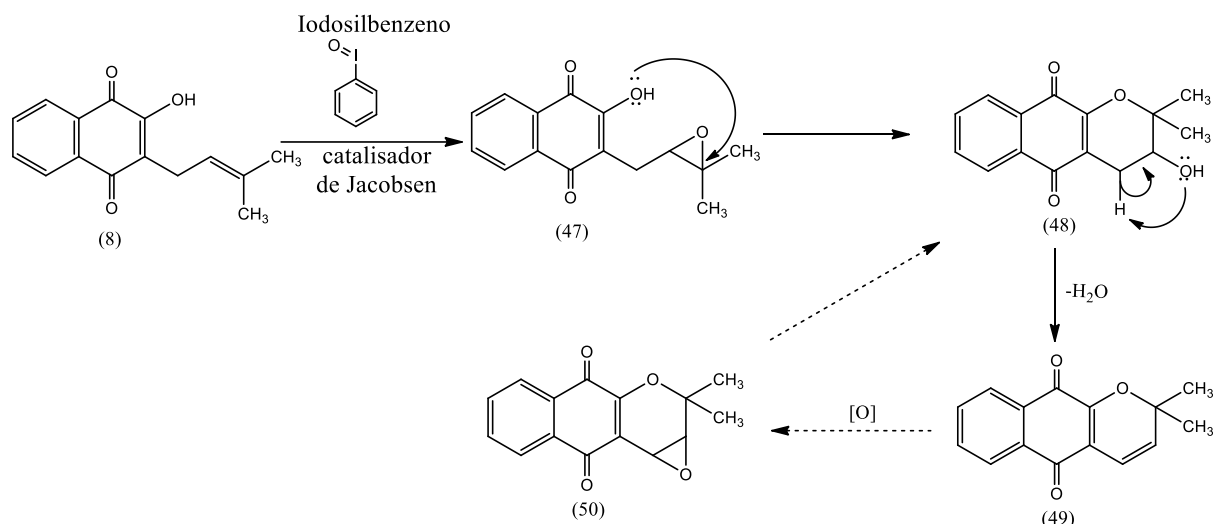
Esquema 9 – Preparação de análogos da α -lapachona modificados no anel C a partir da estrutura (38) um derivado do nor-lapachol. Fonte: (BARBOSA, et al., 2005).

A síntese de outros compostos estruturalmente relacionados a α -lapachona foi descrita por Bala, Rajesh e Perumal (2012). Eles relataram um método para preparação de 1,4-piranonaftoquinonas tetra-substituídos análogos da α -lapachona, por meio de uma síntese verde usando quatro componentes sem o emprego de solventes e catalizadores. A obtenção desses produtos se deu através da reação sequencial *one pot* entre anilinas substituídas (44), dietil acetilenodicarboxilato (45), lawsona (35) e benzaldeídos substituídos (34) sob irradiação de micro-ondas (esquema 10). Na síntese do composto (46a) por exemplo, foi utilizado uma quantidade equimolar de 1,14 mmol de *p*-toluidina e dietil acetilenodicarboxilato, sendo postos inicialmente para reagir por 30 segundos, levando a formação de um sólido amarelo. A este último, foi adicionado a lawsona e 4-clorobenzaldeído para reagir por mais 3 minutos sob irradiação a 120 W, 100° C e 1 bar de pressão, formando o composto final (46a) com 81 % de rendimento. Essa metodologia foi retratada como uma interessante forma de sintetizar derivados da α -lapachona modificados no anel C, apresentando potenciais bioatividades.



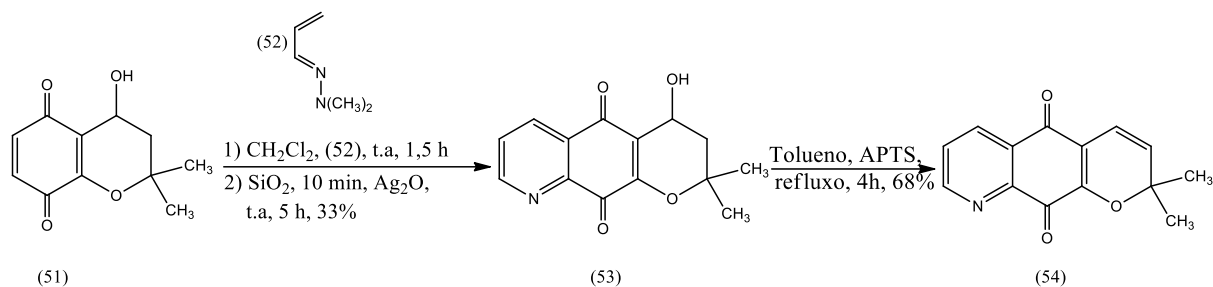
Esquema 10 – Síntese de análogos da α -lapachona tetra-substituídos no anel C usando uma reação sequencial de quatro componentes. Fonte: (BALA, RAJESH, PERUMAL, 2012).

Niehues e colaboradores (2012), estudando o metabolismo de fase I *in vivo* de compostos bioativos, descreveram um modelo oxidativo biomimético *in vitro* no qual foi utilizado o catalisador de Jacobsen [sal de manganês (III)] e o iodosilbenzeno para promover a epoxidação do lapachol e formar, após reação de ciclização e desidratação, o derivado dehidro- α -lapachona (49) (esquema 11). Essa reação ocorreu em um tubo de 5 mL ao abrigo da luz. Tanto o catalisador de Jacobsen (0,5 μ mol) quanto o lapachol (15 μ mol) foram dissolvidos em acetonitrila até um total de 1,5 mL. Em seguida, o iodosilbenzeno (15 μ mol) foi adicionado e a mistura reacional agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. Em termos mecanísticos, na primeira etapa dessa síntese, ocorreu uma reação de epoxidação na cadeia lateral prenil do lapachol produzindo o intermediário (47), o qual por meio da abertura do anel epóxi após ataque nucleofílico intramolecular, formou o derivado hidroxilado (48). Este último, através de uma reação de desidratação, conduziu ao composto final (49) e parece induzir um ciclo de epoxidação e desidratação como mostrado no esquema abaixo.



Esquema 11 – Mecanismo proposto para a síntese do composto dehidro- α -lapachona (49) a partir da oxidação *in vitro* do lapachol (8). Fonte: (NIEHUES, et al., 2012)

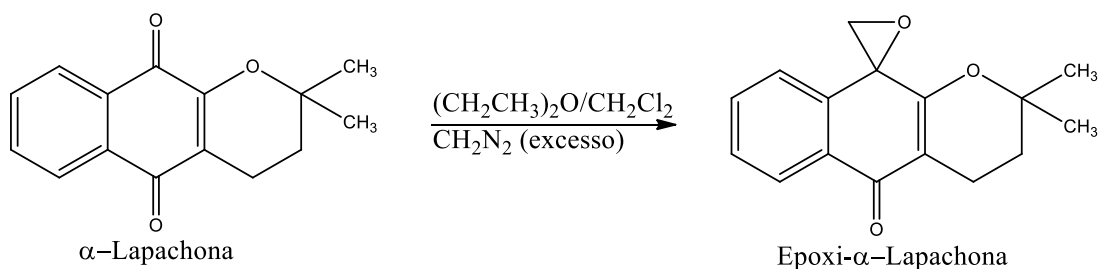
Derivados da α -lapachona com alterações em dois anéis, **C** e aromático, também foram descritos na literatura e apresentaram potenciais atividades biológicas. Assim, o composto (53) (esquema 12) foi sintetizado por Salas e colaboradores (2008) e se destacou como o agente antiparasitário mais ativo da série avaliada no estudo. Esse derivado foi sintetizado através de uma reação de Diels-Alder entre a *p*-quinona (51) e o dieno 1-substituído (52) seguido por aromatização do aduto resultante. Por fim, a piranoquinolinaquinona (54) foi produzida a partir do derivado (53) através de uma reação de desidratação promovida pelo ácido *p*-toluenossulfônico (APTS). O esquema 12 apresenta as condições reacionais utilizadas. O composto (53) apresentou um valor de IC_{50} igual à 0,19 μ M (contra as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*), sendo 108 vezes menor que aquela encontrada para o benznidazol (agente anti-chagásico padrão). Já o derivado (54) mostrou-se equipotente quando comparado ao benznidazol, exibindo uma IC_{50} igual à 20,1 μ M. A forte atividade tripanocida encontrada para a estrutura (53) indicou que além das modificações no anel C da α -lapachona, substituições no anel aromático podem constituir outra estratégia sintética importante para o aumento da bioatividade dessa piranonaftoquinona.



Esquema 12 – Síntese dos derivados da α -lapachona (53) e (54) a partir de uma reação de Diels-Alder.

Fonte: (SALAS, et al., 2008).

Outros estudos têm se empenhado em obter derivados da α -lapachona através de modificações químicas no centro redox desse composto. Essa técnica de derivação tem fornecido produtos bem menos citotóxicos para células de mamíferos do que seus precursores. Um composto obtido por essa técnica, foi a epóxi- α -lapachona através de uma reação de epoxidação usando α -lapachona como precursor (esquema 13). Como pode ser visto, esse derivado epóxi foi produzido adicionando diretamente à α -lapachona, uma solução previamente preparada de éter etílico em diclorometano e diazometano em excesso. A mistura permaneceu à 5 °C por 48 horas (FERREIRA, et al., 2006).



Esquema 13 – Rota sintética geral para obtenção de epóxi- α -lapachona a partir da α -lapachona. Fonte: (FERREIRA, et al., 2006)

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes foram obtidos comercialmente, e os solventes previamente destilados para a utilização.

Acetato de etila	VETEC
Acetona	CINÉTICA
Acetonitrila	MERCK
Ácido clorídrico	MERCK
Ácido fosfórico	MERCK
Carbonato de sódio	MERCK
Clorofórmio	MERCK
Diclorometano	CINÉTICA
Dimetilsulfóxido	REAGEN
Etanol	CINÉTICA
Éter etílico	VETEC
Metanol	CINÉTICA
<i>n</i> -Hexano	CINÉTICA
Sulfato de sódio anidro	VETEC
Tiossemicarbazida	SIGMA-ALDRICH
Toluol	DINÂMICA
2,4-diclorofenil-3-tiossemicarbazida	SIGMA-ALDRICH
4-etil-3-tiossemicarbazida	SIGMA-ALDRICH
4-fenil-3-tiossemicarbazida	SIGMA-ALDRICH

4-metilfenil-3-tiossemicarbazida	SIGMA-ALDRICH
4-nitrofenil-3-tiossemicarbazida	SIGMA-ALDRICH

4.1.2 Equipamentos

Para a obtenção dos derivados tiossemicarbazonas, utilizamos uma balança analítica modelo E. METTER, uma capela de fluxo laminar, uma placa de aquecimento com agitador magnético – FANEM, uma centrífuga PCL séries, um rotaevaporador modelo 802 – FISATON e uma estufa – FANEM.

4.1.2.1 Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram medidos em um fusiômetro Fisatom ® modelo 431 da série 1511035.

4.1.2.2 Cromatografias

As cromatografias em camada delgada (CCD), ocorreram em cromatofolhas Al de sílica gel Merck 60 F₂₅₄ de 0,25 mm de espessura. E as colunas cromatográficas foram preparadas sob pressão utilizando sílica gel 60 Merck 230-400 Mesh (Flash). A visualização durante a CCD foi auxiliada pela luz ultravioleta (UV) (254 nm).

4.1.2.3 Infravermelho (IV)

O espectrômetro de infravermelho (IV) utilizado foi o aparelho PerkinElmer ® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância atenuada.

4.1.2.4 Espectrometria de massas (MS)

Os espectros de massas de alta definição foram gerados por um espectrômetro modelo micrOTOF II. As intensidades são apresentadas em porcentagem do pico base.

4.1.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C foram gerados no equipamento Bruker Avance ® DRX-500. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterados (CDCl₃). Os espectros foram obtidos com os deslocamentos químicos expressos ppm dispondo do tetrametilsilano como padrão interno no caso dos RMN ¹H.

4.1.2.6 Ensaio de MTT

Para o ensaio de MTT foram utilizadas placas de 96 poços, micropipetador multicanal e de 1 mL, solução salina de PBS, tripsina, meio RPMI acrescido de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), MTT à 5 mg/mL, câmara de Neubauer, corante azul de Tripan e DMSO.

4.1.2.7 Ensaios Antimicrobianos

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizadas placas de 96 poços, micropipetador de 1 mL, estufa, os micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Bacillus cereus* (UFPEDA 213), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Candida krusei* (UFPEDA 1002), *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *Candida glabrata* (URM 6393), meio Ágar Mueller-Hinton (para as bactérias) e RPMI (para os fungos), Gentamicina, Fluconazol, Resazurina, Acetato de etila e Metanol.

5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1 Procedimentos para a extração e purificação do Lapachol

Para a extração do lapachol, foi utilizado inicialmente uma metodologia amplamente descrita na literatura cujo princípio baseia-se na solubilidade de sais em meio aquoso e na solubilidade por semelhança de polaridade (TAVARES, et al., 2013; FERREIRA, 1996).

Desse modo, em um erlenmeyer de 1000 mL foram colocados 100g de serragem do ipê-roxo (*Handroanthus sp.*) e em seguida 400 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2%, sendo a mistura agitada ocasionalmente. A solução resultante de coloração vermelha, após ser filtrada, passou por um processo de lavagem com acetato de etila para a retirada de impurezas. Essa solução foi então acidificada lentamente com ácido clorídrico (HCl) à 50 % sob agitação constante. A medida que a solução foi sendo acidificada, ocorreu a precipitação de cristais amarelos característicos do lapachol. Este último foi filtrado e os cristais secos. Através da cromatografia em camada delgada (CCD), comparando a amostra obtida com o lapachol puro (referência), confirmamos a obtenção dessa naftoquinona. Após recristalização em etanol, obteve-se aproximadamente 1% de lapachol puro na forma de cristais amarelos.

Na tentativa de obter o lapachol com um rendimento melhor, nós desenvolvemos neste trabalho um novo método de extração, o método Góes, utilizando o aparelho Góes registrado sob o número de patente BR 10 2017 021 0995, realizando extração e purificação simultânea. Para realizar o método Góes é necessário um aparelho inovador denominado aparelho Góes, um condensador, um balão de fundo redondo, uma manta aquecedora, tubos de ensaio para coleta das amostras, tubo capilar para preparação de placas cromatográficas (CCD), cuba cromatográfica de vidro, placas de cromatografias as quais podem ser de sílica, alumina dentre outras de acordo com a polaridade da substância (Figura 8).

Sendo assim usamos 20 gramas de sílica gel como substância adsorvente, 20 gramas da serragem do ipê roxo e 120 mL do sistema eluente hexano/ acetato de etila (9:1) no qual o lapachol apresentou um R_f igual a 0,48. Esse mesmo sistema de solventes, foi utilizado durante todo monitoramento por cromatografia em camada delgada. As amostras obtidas nesse processo foram então evaporadas e em seguida lavadas com um pequeno volume de hexano, fornecendo 231 mg do lapachol puro na forma de cristais amarelos (aproximadamente 1,2 %). Esse método foi o que nós escolhemos para a obtenção do lapachol puro (na quantidade necessária), por apresentar um maior rendimento.

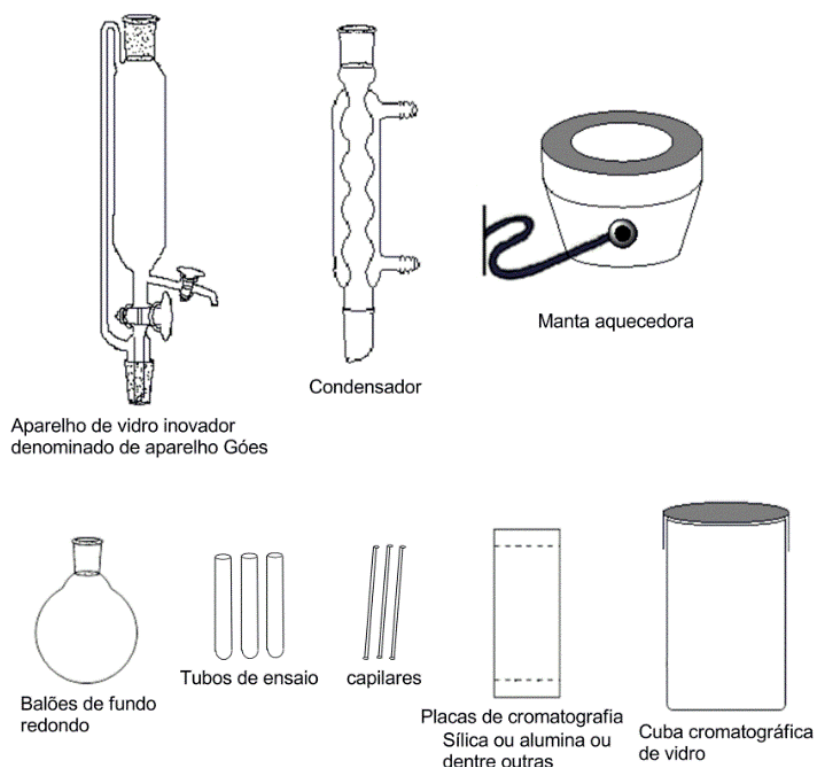


Figura 8 – Constituintes necessários para o absoluto funcionamento do aparelho Góes.

Inicialmente é importante determinar o solvente ou mistura de solventes a ser utilizado como eluente durante o processo de extração e purificação simultânea. Um eluente ideal é aquele no qual o produto estudado apresenta um fator de retenção (R_f) entre 0,3 e 0,45.

Esse método inovador de extração e purificação simultânea, consiste na utilização de um aparelho de vidro denominado aparelho Góes (Figura 9) no qual o interior do corpo da coluna é parcialmente preenchido por uma substância adsorvente adequada (sílica em gel, alumina, etc). Na parte mediana interna da coluna é adicionado o material a ser analisado (serragem de origem vegetal ou outro material). O eluente ideal encontrado, em quantidade suficiente para extração e purificação simultânea, alimenta a parte superior interna da coluna a partir do balão de fundo redondo por aquecimento.

O processo inovador de extração e purificação simultânea ocorre com economia de solvente (ou sistema de solventes) e de tempo de execução. O espaço da coluna dedicado a receber o sistema eluente, corresponde a um terço ou mais de todo o corpo dessa vidraria. Este espaço livre tem como objetivo receber a maior quantidade possível do eluente antes da substituição de cada balão contendo as amostras, economizando assim solventes no processo.

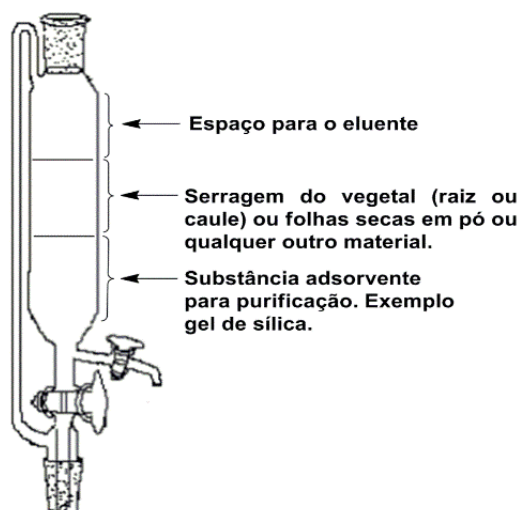


Figura 9 – Corpo da coluna do aparelho Góes.

A passagem do solvente contido no balão de fundo redondo até a parte superior interna do corpo da coluna, ocorre através da fina tubulação de vidro localizada ao lado da coluna contendo o material a ser processado. A torneira localizada imediatamente abaixo do algodão (Figura 10), é utilizada para fácil coleta das amostras durante o preparo da CCD.

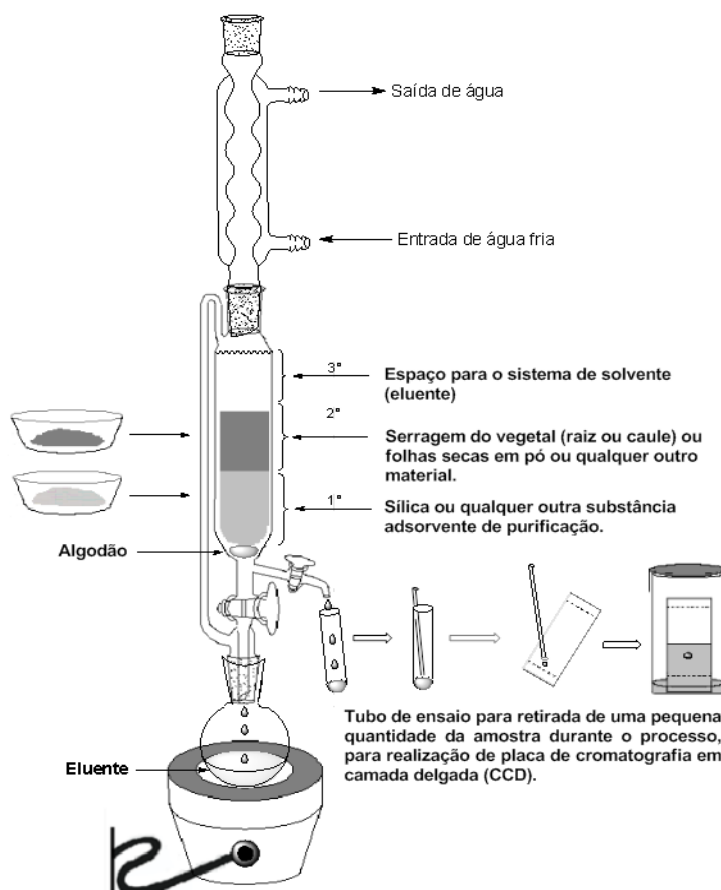


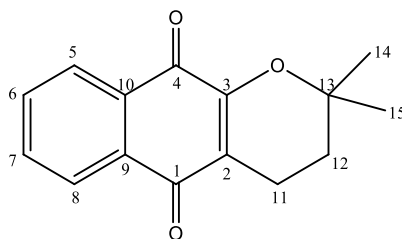
Figura 10 – Esquema de montagem e funcionamento do aparelho Góes.

5.2 Procedimentos de síntese e purificação da α -lapachona

Para obter a α -lapachona, nós utilizamos inicialmente uma metodologia amplamente descrita na literatura que consiste em reagir o lapachol com ácido clorídrico (HCl) concentrado (SALAS, et al., 2008).

Para isso, em um tubo de ensaio de 25 mL foram adicionados 100 mg de lapachol (0,4132 mmol) e em seguida 4 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado sendo a mistura reacional posta sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético, e aquecida à 82 °C. A mudança de coloração ocorreu 6 minutos após o início da reação, obtendo-se uma mistura vermelha escura a qual permaneceu por 1 hora e 40 minutos sob agitação e aquecimento. A reação foi constantemente monitorada através de CCD usando um sistema 9:1 (Hexano/Acetato de etila) como fase móvel, no qual a α -lapachona apresentou um $R_f = 0,41$. Posteriormente, foi adicionada água com gelo (75mL) à mistura reacional. A fase orgânica foi então extraída com acetato de etila (2x 25 mL), lavada com água, seca sob sulfato de sódio anidro (13 g) e o solvente evaporado à vácuo. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia em coluna de sílica usando um sistema hexano/ acetato de etila (8:2) e por recristalização em etanol, obtendo-se a α -lapachona pura com um rendimento de 88 %.

Na tentativa de obter a α -lapachona com um rendimento mais satisfatório, nós desenvolvemos neste trabalho uma nova metodologia que consiste em reagir o lapachol com ácido fosfórico concentrado (H₃PO₄). Para isso, em tubo de ensaio de 25 mL foram adicionados 100 mg de lapachol (0,4132 mmol) e em seguida 4 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) concentrado. A mistura reacional foi então posta sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético e aquecida à 82 °C. A mudança de coloração ocorreu 20 minutos após o início da reação obtendo-se uma mistura vermelha escura a qual permaneceu por 2 hora e 30 minutos sob agitação e aquecimento. A reação foi constantemente monitorada através de CCD, usando um sistema Hexano/ acetato de etila (9:1) como fase móvel, no qual a α -lapachona apresentou um $R_f = 0,41$. Posteriormente, a mistura reacional foi vertida em um béquer de 250 mL com gelo (75mL). A fase orgânica foi então extraída com acetato de etila (2x 25 mL), lavada com água, seca sob sulfato de sódio anidro (13 g) e o solvente evaporado à vácuo. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia em coluna de sílica utilizando um sistema hexano/ acetato de etila (8:2) e por recristalização em etanol, obtendo-se a α -lapachona pura com um rendimento de 95 %. Essa metodologia foi a que nós escolhemos para a síntese da α -lapachona por apresentar um rendimento melhor.



α -lapachona

Fonte: (RIBEIRO, PINTO, PINTO, 1990)

- Dados reacionais
 - Cristais amarelo
 - Rendimento: 95 %

- Dados físico-químicos e espectrofotométricos
 - **PM:** 242 g/mol
 - **PF:** 112-113 °C
 - **Rf:** 0,41 (*n*-Hexano/Acetato de etila 9:1)
 - **IV: (ν cm⁻¹, ATR):** 3076,59 (C-H, Aromático), 2975,00 (C-H, Alifático), 2934,47 (C-H Alicíclico), 1681,86 (C₄=O), 1634,97 (C₁=O), 1609,14 (C=C, quinona), 1575,47 (C=C, Aromático), 1116,76 (C-O-C).
 - **RMN¹H (300 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 1,389 (s, 6H, 2 CH₃), 1,776 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, CH₂-12), 2,561 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, CH₂-11), 7,621 (m, 2H, CH-6 e CH-7), 8,001 (m, 2H, CH-5 e CH-8).
 - **RMN¹³C (120 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 16,577 (CH₂), 26,360 (2 CH₃), 31,213 (CH₂), 78,007 (C), 119,978 (C), 125,770 (CH-Ar), 126,121 (CH-Ar), 130,929 (C), 131,837 (C), 132,776 (CH-Ar), 133,722 (CH-Ar), 154,402 (C), 179,806 (C), 184,163 (C).

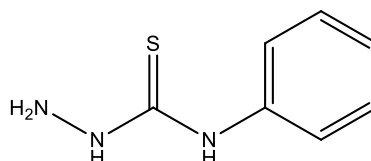
- Solubilidade
 - Solúvel: Éter etílico, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, acetona e DMSO.
 - Insolúvel: *n*-Hexano, água.

5.3 Procedimento global de síntese dos derivados da α -lapachona (1a-1f)

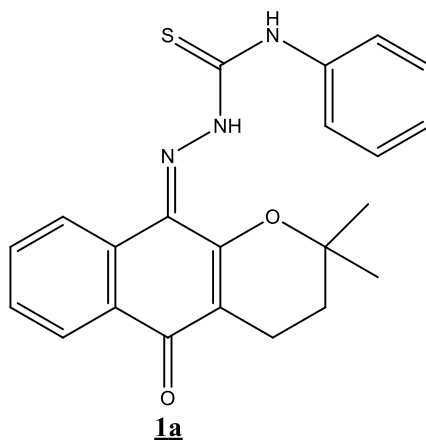
A síntese das tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona ocorreu aplicando duas metodologias distintas de utilização das tiossemicarbazidas: 1) empregando a tiossemicarbazida diretamente e 2) formando-a indiretamente *in situ* a partir da hidrazina e isotiocianatos desejados.

5.3.1 Utilizando a tiossemicarbazida:

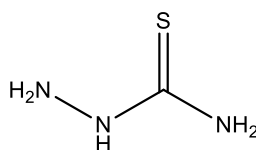
- 4-fenil-3-tiossemicarbazida



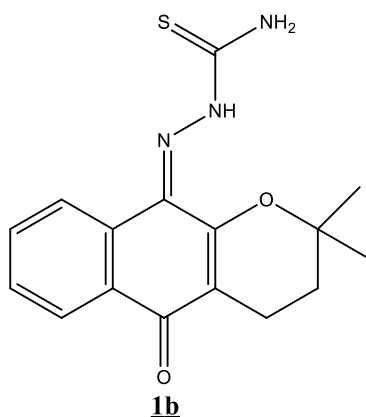
Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados a α -lapachona (200 mg/ 0,8264 mmoles) e 8 mL de etanol. Sob agitação à temperatura ambiente, o ácido *p*-toluenossulfônico (142,3 mg/ 1eq./ 0,8264 mmoles) foi adicionado, seguido da 4-fenil-3-tiossemicarbazida (276,39 mg/ 2eq./ 0,8264 mmoles). A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada até o final, usando um sistema hexano/ acetato de etila (8:2) no qual o R_f do produto foi igual a 0,44. A mudança de coloração ocorreu uma hora após o início da reação como resultado da formação de precipitado. A reação durou 3 dias. Em seguida a mistura reacional foi filtrada à vácuo, lavada com água destilada e hexano e o sólido resultante seco em estufa (37°C) fornecendo o derivado **1a** puro com um rendimento de 81,31 %.



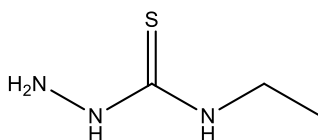
- **Tiossemicarbazida**



Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados a α -lapachona (200 mg/ 0,8264 mmoles) e 8 mL de etanol. Sob agitação à temperatura ambiente, o ácido *p*-toluenossulfônico (142,3 mg/ 1eq./ 0,8264 mmoles) foi adicionado, seguido da tiossemicarbazida (225,6mg/ 3eq./ 0,8264 mmoles). A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada até o final, usando um sistema hexano/ acetato de etila (8:2) no qual o R_f do produto foi igual a 0,25. A mudança de coloração ocorreu 20 horas após o início da reação como resultado da formação de precipitado. A reação durou 4 dias. Em seguida a mistura reacional foi filtrada à vácuo, lavada com água destilada e hexano e o sólido resultante seco em estufa (37°C) fornecendo o derivado **1b** puro com um rendimento de 76 %.

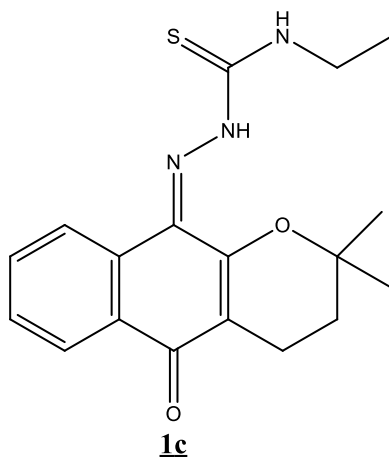


- **4-etil-3-tiossemicarbazida**



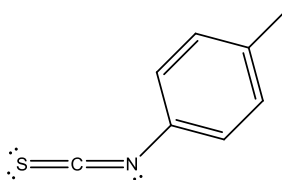
Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados a α -lapachona (200 mg/ 0,8264 mmoles), o ácido *p*-toluenossulfônico (142,3 mg/ 1eq./ 0,8264 mmoles), a 4-etil-3-tiossemicarbazida (196,68 mg/ 2eq./ 0,8264 mmoles) e por último adicionados 12 mL de etanol sendo posto sob agitação e refluxo. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada até o final, usando um sistema hexano/ acetato de etila (8:2) no qual o R_f do produto

foi igual a 0,45. Não foi observada mudança de coloração da mistura reacional. A reação durou 3 dias. Em seguida a mistura reacional foi filtrada à vácuo, lavada com água destilada e hexano e o sólido resultante seco em estufa (37°C) fornecendo o derivado **1c** puro com um rendimento de 91 %.

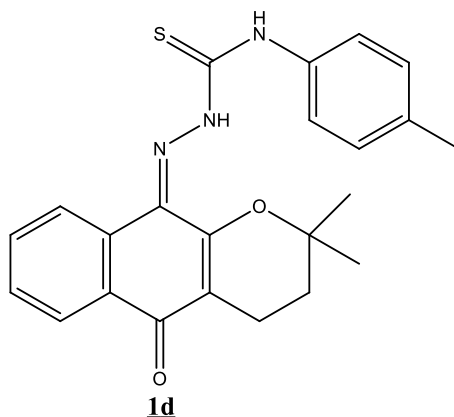


5.3.2 Utilizando hidrato de hidrazina e isotiocianato

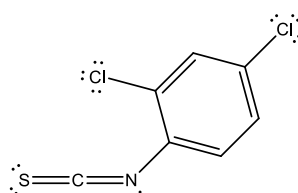
- 4-metilfenil-isotiocianato



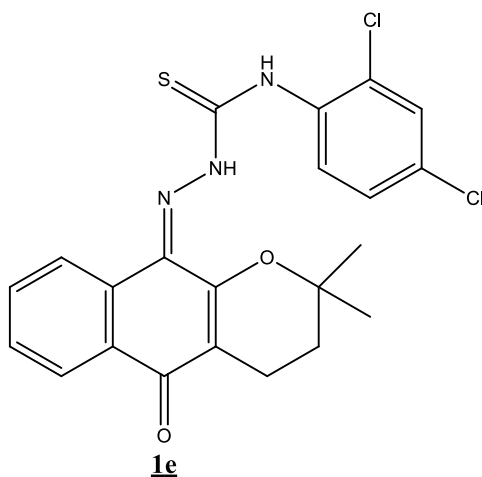
Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foi adicionado 200 mg de α -lapachona (0,8264 mmoles/ 1eq.), juntamente com 142,3 mg de ácido *p*-toluenossulfônico (0,8264 mmoles/ 1eq.). Em seguida foi adicionado 10 mL de etanol e posto sob agitação. Logo após foi adicionado 302,23 μ L de 4-metilfenil-isotiocianato (0,8264 mmoles/ 2,5 eq.) e 125,75 μ L de hidrazina (0,8264 mmoles/ 2,5 eq.). A mistura foi aquecida à 70°C. A formação de precipitado ocorreu após 27 horas de reação, juntamente com a mudança de coloração (para um vermelho). A reação foi monitorada através de CCD usando um sistema hexano/ acetato de etila (8:2) no qual o R_f do produto foi igual a 0,60. A reação durou 2 dias e 7 horas. Em seguida a mistura reacional foi filtrada à vácuo, lavada com água destilada, *n*-hexano e um pequeno volume de álcool etílico, sendo o sólido resultante seco em estufa (37°C) fornecendo o derivado **1d** puro com um rendimento de 77,38 %.



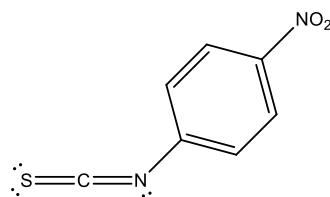
• **2,4-diclorofenil-isotiocianato**



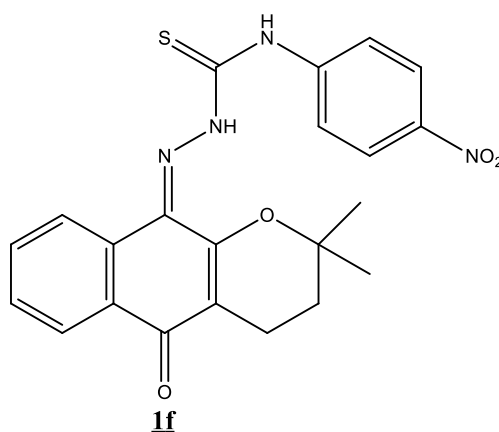
Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foi adicionado 200 mg de α -lapachona (0,8264 mol), juntamente com 142,3 mg de ácido *p*-toluenossulfônico (0,8264 mol; 1 eq.). Em seguida, foi adicionado 10 mL de etanol e posto sob agitação. Logo após, foi adicionado 421,63 mg de 2,4-diclorofenil-isotiocianato (0,8264 mmol; 2,5 eq.) e 125,75 μ L de hidrazina (0,8264 mol; 2,5 eq.). A mistura foi aquecida à 70 °C. A formação de precipitado ocorreu após 20 minutos de reação juntamente com a mudança de coloração (para um verde). A reação foi monitorada através de CCD usando um sistema hexano/ acetato de etila (8:2) no qual o R_f do produto foi igual a 0,49 para fase móvel. A reação durou 2 dias e 7 horas. Em seguida a mistura reacional foi filtrada à vácuo e lavada com água destilada, sendo o sólido resultante seco em estufa (37°C). Após recristalização com *n*-hexano obteve-se o derivado **1e** puro com um rendimento de 91 %.



- **4-nitrofenil-isotiocianato**



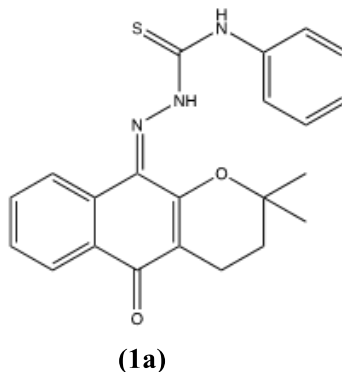
Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados a α -lapachona (200 mg/ 0,8264 mmoles), o ácido *p*-toluenossulfônico (142,3 mg/ 1 eq./ 0,8264 mmoles) e 6 mL de etanol sendo posto sob agitação à temperatura por dois minutos. Em outro balão de fundo redondo de 5 mL, foram adicionados o 4-nitrofenil isotiocianato (298,82 mg/ 2eq./ 0,8264 mmoles), a hidrazina hidratada (100 μ L) e em seguida 2mL de etanol e posto sob agitação a temperatura ambiente (por dois minutos). Por fim, a solução contida no balão de 5 mL foi transferida para o de 250 mL e posta sob refluxo. O progresso da reação foi monitorada através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) usando um sistema para fase móvel de 7:3 (hexano/acetato de etila) no qual o produto apresentou um R_f igual à 0,40. Após uma hora de reação ocorreu formação de precipitado, e uma hora depois a mudança de coloração (para um alaranjado opaco). A reação durou 5 dias e 10 horas. O produto foi filtrado (simples filtração) e o solvente evaporado à vácuo. Após lavagem com água, *n*-hexano e éter etílico, obteve-se o derivado **1f** puro com um rendimento de em 72 %.



5.3.3 Dados dos compostos sintetizados

Nesta seção serão apresentados os dados espectrométricos e físico-químicos dos derivados **1a-1f**.

5.3.3.1 Derivado 1a: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida



- Dados reacionais à temperatura ambiente.

- *Reação com 4-fenil-3-tiossemicarbazida*

- 4-fenil-3-tiossemicarbazida: 276,39 mg/ 2eq./ 0,8264 mmoles
 - Aspecto: Sólido amorfo amarelo.
 - Rendimento: 81,31 %
 - Tempo reacional: 3 dias

- Dados físico-químicos e espectrométricos

- **PM:** 391,1356 g/ mol

- **PF:** 215-216 °C

- **Rf:** 0,44 (Hexano/Acetato de etila 8:2)

- **IV (v cm⁻¹ ATR):** 3331,38 (NH-Ar), 3294,24 (NH-imina), 3061,47 (C-H, Aromático), 2971,10 (C-H, alifático), 2952,99 (C-H, Alicíclico), 1630,50 (C₁=O), 1597,69 (C=C), 1568,02 (C=N), 1524,24 (C=S), 1438,83 (N-C=S), 1139,60 (C-O-C, Assimétrica), 1109,34 (C-O-C, Simétrica) 1066,23 (C=S).

- **RMN ¹H (500 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 1,567 (s, 6H, 2 CH₃), 1,904 (t, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂), 2,674 (t, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂), 7,283 (t, 1H, CH-Ar), 7,443 (t, 2H, 2 CH-Ar), 7,536 (t, 1H, CH-Ar), 7,601 (t, 1H, CH-Ar), 7,752 (d, 2H, 2 CH-Ar), 8,134 (d, 1H, CH-Ar), 8,167 (d, 1H, CH-Ar), 9,476 (s, 1H, Ar-N-H), 12,223 (s, 1H, imina-N-H).

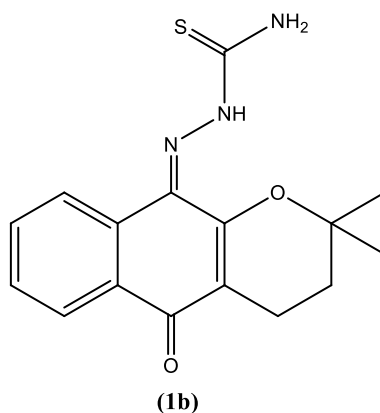
➤ **RMN ^{13}C (125,7 MHz, ppm, CDCl_3):** δ 17,025 (CH_2), 26,817 (2 CH_3), 31,316 (CH_2), 80,242 (C), 116,656 (C), 123,056 (CH), 123,931 (2 CH), 126, 317 (CH), 126,464 (CH), 128,361 (C), 129,030 (2 CH), 129,515 (CH), 130,156 (C), 132,036 (CH), 132,916 (C), 137,665 (C), 154,986 (C), 175,750 (C), 183,162 (C).

➤ **Solubilidade:**

- Solúvel: clorofórmio e acetato de etila.
- Parcialmente solúvel: acetonitrila, metanol e etanol.
- Insolúvel: *n*-hexano e água.

OBS: O ácido *p*-toluenossulfônico é insolúvel tanto em água quanto em etanol. E a 4-fenilssemicarbazida é praticamente solúvel em etanol e insolúvel em água.

5.3.3.2 Derivado 1b: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2Hbenzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida



• Dados reacionais à temperatura ambiente.

➤ *Reação com tiossemicarbazida*

- Tiossemicarbazida: 225,60mg/ 3eq./ 0,8264 mmoles
- Aspecto: Sólido amorfo amarelo
- Rendimento: 76 %
- Tempo reacional: 4 dias.

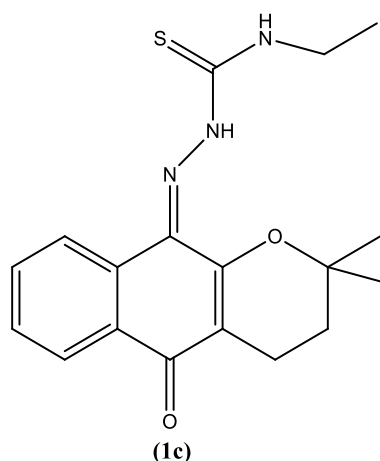
• Dados físico-químicos e espectrométricos

➤ **PM:** 315,1043 g/ mol

- **PF:** 207-209 °C
- **Rf:** 0,25 (Hexano/Acetato de etila 8:2)
- **IV (ν cm⁻¹ ATR):** 3394,48 (NH₂, deformação axial assimétrica), 3328,82 (NH₂, deformação axial simétrica), 3276,53 (NH, amina secundária), 2980,41 (C-H, Aromático), 2965,40 (C-H, Alifático), 1622,73 (C₁=O), 1602,83 (C=C), 1564,71 (C=N), 1521,00 (C=S), 1441,74 (N-C=S), 1133,10 (C-O-C, Assimétrica), 1110,64 (C-O-C, Simétrica), 1052,82 (C=S).
- **RMN ¹H (500MHz, ppm, CDCl₃):** δ 1,550 (s, 6H), δ 1,894 (t, 2H, J = 6,5 Hz), δ 2,666 (t, 2H, J = 6,5 Hz), δ 6,702 (s, 1H), δ 7,488 (s, 1H), δ 7,530 (t, 1H, J = 7,5 Hz), δ 7,573 (t, 1H, J = 7,5 Hz), δ 8,103 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 8,148 (d, 1H, J = 7,5), δ 12,146 (s, 1H).
- **RMN ¹³C (125,7 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 17,022 (CH₂), δ 26,779 (2CH₃), δ 31,265 (CH₂), δ 80,260 (C), δ 116,808 (C), δ 123,284 (CH), δ 126,241 (CH), δ 129,432 (CH), δ 129,631 (C), δ 130,101 (C), δ 132,032 (CH), δ 132,865 (C), δ 154,956 (C), δ 179,626 (C), δ 183,262 (C).
- **Solubilidade:**
- Solúvel: clorofórmio, metanol e acetato de etila.
 - Parcialmente solúvel: Acetonitrila e etanol.
 - Insolúvel: *n*-hexano e água.

OBS: A tiossemicarbazida é insolúvel em etanol e solúvel em água.

5.3.3.3 Derivado 1c: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-etil-hidrazina-carbotioamida



- Dados reacionais utilizando aquecimento convencional.

- *Reação com a 4-etil-3-tiossemicarbazida*

- 4-etil-tiossemicarbazida: 196,68 mg/ 2eq./ 0,8264 mmoles
- Aspecto: Sólido amarelo
- Rendimento: 91 %
- Tempo reacional: 3 dias.

- Dados físico-químicos e espectrométricos

- **PM:** 343,1356 g/ mol

- **PF:** 140-143 °C

- **Rf:** 0,45 (Hexano/Acetato de etila 8:2)

- **IV (v cm⁻¹ ATR):** 3318,03 (NH-Et), 3065,42 (NH-imina), 2974,81 (C-H, Aromático), 2931,47 (C-H, Alifático), 1632,41 (C₁=O), 1595,39 (C=C), 1567,61 (C=N), 1519,38 (C=S), 1447,84 (N-C=S), 1128,34 (C-O-C, Assimétrica), 1111,34 (C-O-C, Simétrica), 1070,56 (C=S).

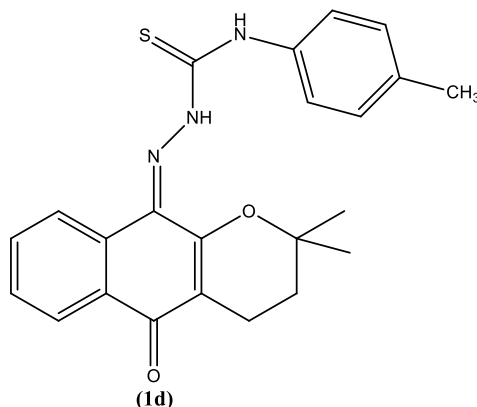
- **RMN ¹H (500 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 1,376 (t, 3H, *J* = 7,5 Hz, CH₃), 1,541 (s, 6H, 2CH₃), 1,882 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz, CH₂), 2,655 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz, CH₂), 3,837 (m, 2H, *J* = 7,5 Hz, CH₂), 7,516 (t, 1H, CH), 7,582 (t, 1H, CH), 7,700 (s, 1H, NH), 8,071 (d, 1H, CH), 8,151 (d, 1H, CH), 12,054 (s, 1H, imina-NH).

- **RMN ¹³C (125,7 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 14,393 (CH₃), 16,971 (CH₂), 26,769 (2 CH₃), 31,307 (CH₂), 39,627 (CH₂), 80,042 (C), 116,259 (C), 123,043 (CH), 126,194 (CH), 128,035 (C), 129,244 (CH), 130,079 (C), 131,850 (CH), 133,138 (C), 155,086 (C), 177,692 (C), 183,206 (C).

- **Solubilidade:**

- Solúvel: Clorofórmio, acetonitrila, etanol, metanol e acetato de etila
- Parcialmente solúvel: Dicloro metano, acetona e éter etílico.
- Insolúvel: *n*-hexano e água.

5.3.3.4 Derivado 1d: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-(p-toluil)hidrazina-carbotioamida



- Dados reacionais utilizando aquecimento convencional.

- *Reação com a 4-metilfenil-isotiocianato*

- 4-metilfenil-isotiocianato: 173,54 mg/ 2eq./ 0,8264 mmoles
 - Sólido amarelo
 - Rendimento: 77,38%
 - Tempo reacional: 2 dias e 6 horas.

- Dados físico-químicos e espectrométricos

- **PM:** 405,1513 g/mol

- **PF:** 215-217 °C

- **Rf:** 0,60 (Hexano/Acetato de etila 8:2)

- **IV (ν cm⁻¹ ATR):** 3298,00 (NH-Ar), 2984,00 (CH, Aromático), 2917,00 (CH, Alifático), 1627,70 (C₁=O), 1595,00 (C=C), 1512,53 (C=N), 1449,18 (N-C=S), 1133,87 (C-O-C, Assimétrica), 1071,96 (C=S).

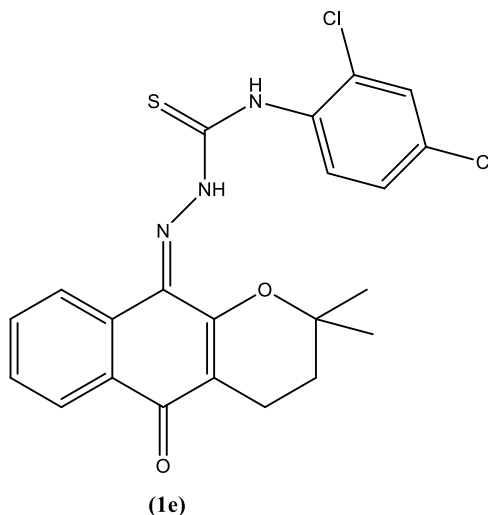
- **RMN ¹H (500 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 1,580 (s, 6H, 2CH₃), 1,918 (t, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂), 2,399 (s, 3H, CH₃), 2,687 (t, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂), 7,264 (t, 1H, CH), 7,546 (t, 1H, CH), 7,605 (d, 4H, 4CH), 8,149 (d, 1H, CH), 8,178 (d, 1H, CH), 9,409 (s, 1H, Ar-NH), 12,219 (s, 1H, imina-NH).

➤ **RMN ^{13}C (125,7 MHz, ppm, CDCl_3):** δ 17,013 (CH_2), 21,116 (CH_3), 26,809 (2 CH_3), 31,341 (CH_2), 80,179 (C), 116,577 (C), 123,068 (CH), 124,150 (2 CH), 126,272 (CH), 128,244 (C), 129, 424 (CH), 129,581 (2 CH), 130,154 (C), 131,977 (CH), 132,968 (C), 135,110 (C), 136,413 (C), 154, 979 (C), 175,983 (C), 183,115 (C).

➤ **Solubilidade:**

- Solúvel: clorofórmio, acetonitrila, metanol e acetato de etila
- Parcialmente solúvel: Hexano e etanol.
- Insolúvel: Água.

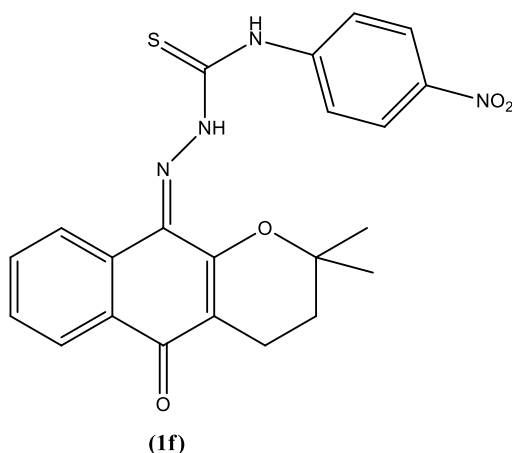
5.3.3.5 Derivado 1e: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-(2,4-diclorofenil)hidrazina-carbotioamida



- Dados reacionais utilizando aquecimento convencional.
 - *Reação com a 2,4-diclorofenil-isotiocianato*
 - 2,4-diclorofenil-isotiocianato: 173,54 mg/ 2eq./ 0,8264 mmoles
 - Sólido amarelo
 - Rendimento: 91%
 - Tempo reacional: 2 dias e 7 horas.
- Dados físico-químicos e espectrométricos
 - **PM:** 459,0577 g/mol
 - **PF:** 193-195 °C

- **Rf:** 0,60 (Hexano/Acetato de etila 8:2)
- **IV (v cm⁻¹ ATR):** 3299,55 (NH-Ar), 3268,12 (NH-imina), 2964,11 (CH, Alifático), 1628,87 (C₁=O), 1595,63 (C=C), 1574,88 (C=N), 1519,38 (C=S), 1451,92 (N-C=S), 1126,72 (C-O-C, Assimétrica), 1111,03 (C-O-C, Simétrica), 1065,68 (C=S).
- **RMN ¹H (500 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 1,591 (s, 6H, 2CH₃), 1,934 (t, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂), 2,702 (t, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂), 7,351 (d, 1H, CH), 7,501 (s, 1H, CH), 7,562 (t, 1H, CH), 7,620 (t, 1H, CH), 8,183 (d, 1H, CH), 8,253 (d, 1H, CH), 8,898 (d, 1H, CH), 10,137 (s, 1H, CH), 12,301 (s, 1H, CH).
- **RMN ¹³C (125,7 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 17,027 (CH₂), 26,814 (2 CH₃), 31,316 (CH₂), 80,300 (C), 116,946 (C), 123,278 (CH), 124,181 (CH), 126,263 (C), 126,316 (CH), 127, 481 (CH), 128,917 (C), 129,065 (CH), 129,652 (CH), 130,201 (C), 130,754 (C), 132,149 (C), 132,801 (C), 133,563 (C), 154, 799 (C), 174,647, 183,108 (C).
- **Solubilidade:**
 - Solúvel: clorofórmio e acetato de etila.
 - Parcialmente solúvel: acetonitrila, *n*-hexano, etanol e metanol.
 - Insolúvel: Água.

5.3.3.6 Derivado 1f: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazina-carbotioamida



- Dados reacionais utilizando aquecimento convencional.
 - *Reação com o 4-nitrofenil-isotiocianato*
 - 4-nitrofenil-isotiocianato: 298,82 mg/ 2eq./ 0,8264 mmoles
 - Sólido alaranjado
 - Rendimento: 72 %
 - Tempo reacional: 5 dias e 10 horas.
- Dados físico-químicos e espectrométricos
 - **PM:** 436,4836 g/mol
 - **PF:** 220-223 °C.
 - **Rf:** 0,40 (Hexano/Acetato de etila 7:3)
 - **IV (ν cm⁻¹ ATR):** 3287,78 (NH-Ar), 3155,06 (NH-imina), 3093,63 (CH, Aromático), 2899,68 e 2819,75 (CH, Alifático), 1631,91 (C₁=O), 1592,54 (C=C), 1569,48 (C=N), 1509,33 (C=S), 1496,64 (Ar-NO₂) 1440,32 (N-C=S), 1147,83 (C-O-C, Assimétrica), 1109,91 (C-O-C, Simétrica), 1065,06 (C=S).
 - **RMN ¹H (300 MHz, ppm, CDCl₃):** δ 1,581 (s, 6H, 2CH₃), 1,925 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, CH₂), 2,694 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, CH₂), 7,578 (t, 1H, CH), 7,649 (t, 1H, CH), 8,106 (d, 2H, CH), 8,132 (d, 1H, CH), 8,187 (d, 1H, CH), 8,308 (d, 2H, CH), 9,773 (s, 1H, CH), 12,380 (s, 1H, CH).
 - **Solubilidade:**
 - Solúvel: acetonitrila e DMF.
 - Parcialmente solúvel: clorofórmio, etanol, metanol, DMSO e acetona, acetato de etila, diclorometano e toluol.
 - Insolúvel: água e *n*-hexano.

6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela Professora Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva.

6.1 Ensaios de citotoxicidade (MTT)

6.1.1 Método

O ensaio de MTT brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium consiste em um método colorimétrico que avalia a atividade citotóxica ou proliferativa de diversos compostos. O MTT é um sal de tetrazólio, solúvel em água, que é convertido em cristais de formazan, com coloração púrpura, após clivagem do anel tetrazólio mediado por desidrogenases mitocondriais e citoplasmática presentes em células viáveis. Após a solubilização dos cristais de formazan e medição da densidade óptica pelo espectrofotômetro ($\lambda = 560$ nm), é possível avaliar a viabilidade celular, onde a intensidade do produto colorido formado após a solubilização do formazan será diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra (FAHEINA-MARTINS, 2009).

6.1.2 Método de análise dos resultados

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad versão 5.0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA). Utilizou-se Análise de Variância ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni, sendo considerado uma diferença significativa quando $p < 0,05$. Os testes foram feitos em triplicata.

Essa metodologia foi utilizada durante todos os ensaios de citotoxicidade envolvendo as linhagens de câncer de cólon (HCT 116), leucemia mieloide crônica (K562), fibroblasto murino (L929) e de câncer pulmonar humano (NCI-H292). A escolha das linhagens de células tumorais foi motivada pela alta incidência desses tipos de cânceres entre homens e mulheres (ANDRADE, 2017).

6.2 Ensaios Antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela Professora Dr^a Gláucia Manoella de Souza.

6.2.1 Método

As espécies de bactérias e fungos utilizadas nos ensaios antimicrobianos foram obtidas a partir das coleções do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e micoteca URM respectivamente. Os micro-organismos testados estão listados no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1 – Espécies de bactérias e fungos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana para os compostos sintetizados.

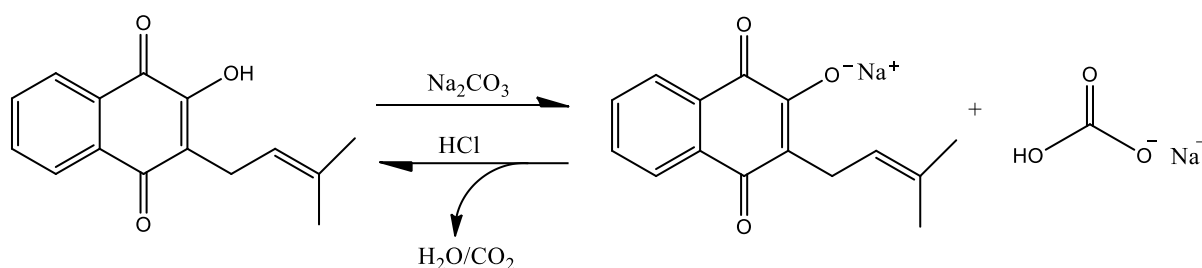
Bactérias Gram-positivas (G+)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 02) <i>Bacillus cereus</i> (UFPEDA 213) <i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138
Bactérias Gram-negativas (G-)	<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA 224) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 416)
Fungos leveduriformes (FL)	<i>Candida krusei</i> (UFPEDA 1002) <i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007) <i>Candida glabrata</i> (URM 6393)

O ensaio de susceptibilidade foi determinado por técnica de microdiluição em caldo, utilizando placa de microtitulação de 96 poços e diluição em ágar para bactérias de acordo com as diretrizes do documento M7-A10 (2015) e M27-A3 (2008) do Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (CLSI) para leveduras. Os inóculos de todas as bactérias e leveduras foram preparados usando o método espectrofotométrico em uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL e $1,5 \times 10^3$ UFC/ mL, respectivamente. Os compostos **1a**, **1d** e **1e** foram dissolvidos em acetato de etila e os derivados **1b**, **1c** e **1f** em metanol. O caldo Müeller Hinton para bactérias ou RPMI para ensaio de levedura foi adicionado em poços e as diluições em série de cada composto foram testadas em concentrações variando de 3,9 a 250 µg/mL. Como controle positivo antibacteriano e antifúngico, foram utilizados gentamicina e fluconazol, respectivamente. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 24 horas para bactérias e 48 horas para os fungos a 37 °C. Cada teste foi realizado em triplicata.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Extração do lapachol

Com relação ao método de extração ácido-base utilizado, é importante discutir alguns aspectos. O lapachol mostra-se insolúvel em solução aquosa, porém na presença de carbonato de sódio (Na_2CO_3), o mesmo perde um próton e produz o sal correspondente tornando-se solúvel em água possibilitando sua separação da serragem por filtração simples. A solução vermelha resultante foi acidificada com HCl para a protonação do sal contido na solução, e como o lapachol é insolúvel em água, ele precipitou formando cristais amarelo. Nesse processo ocorreu a liberação de CO_2 . (Esquema 14) (FERREIRA, 1996). Esse método extrativo apresentou algumas desvantagens que devem ser mencionadas, como a necessidade de uma grande quantidade de solventes para o processo e um elevado tempo de execução.



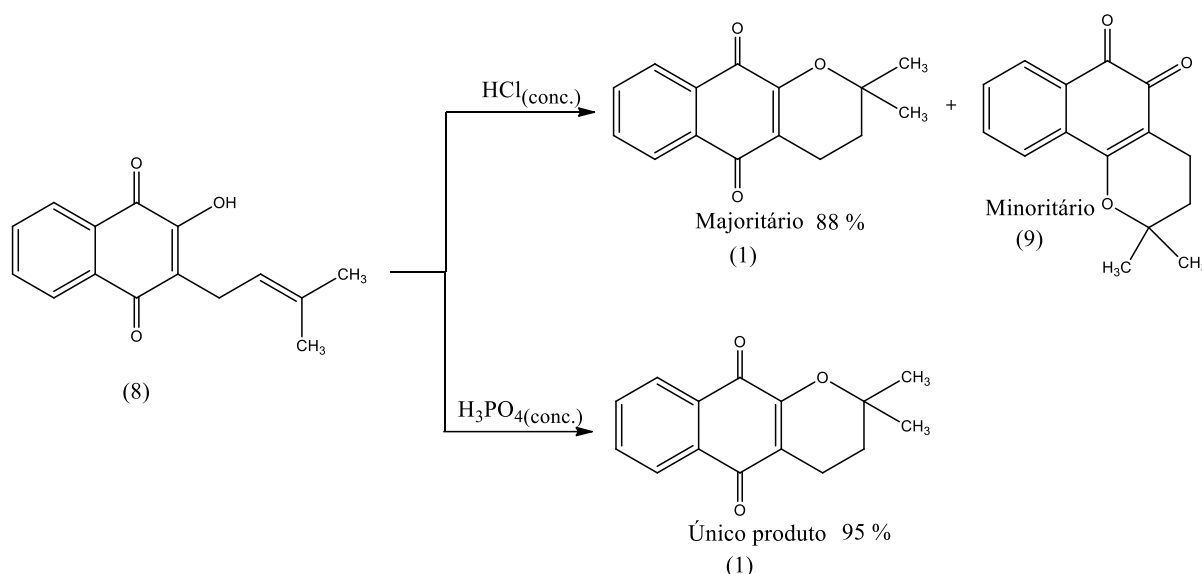
Esquema 14 – Reação implicada no processo de extração ácido-base do Lapachol a partir da serragem do Ipê roxo.

Em relação ao método Góes de extração e purificação simultânea, à medida que foi iniciada a extração do lapachol a partir da serragem do Ipê, o produto foi sendo imediatamente separado através da coluna de sílica. O lapachol é bastante solúvel em solventes (ou misturas de solventes) pouco polares (TAVARES, et al., 2013). Esse processo se mostrou muito eficiente pois, de forma simples economizando solventes e tempo de execução, forneceu o lapachol com um rendimento equivalente aos encontrados na literatura.

7.2 Síntese da α -Lapachona

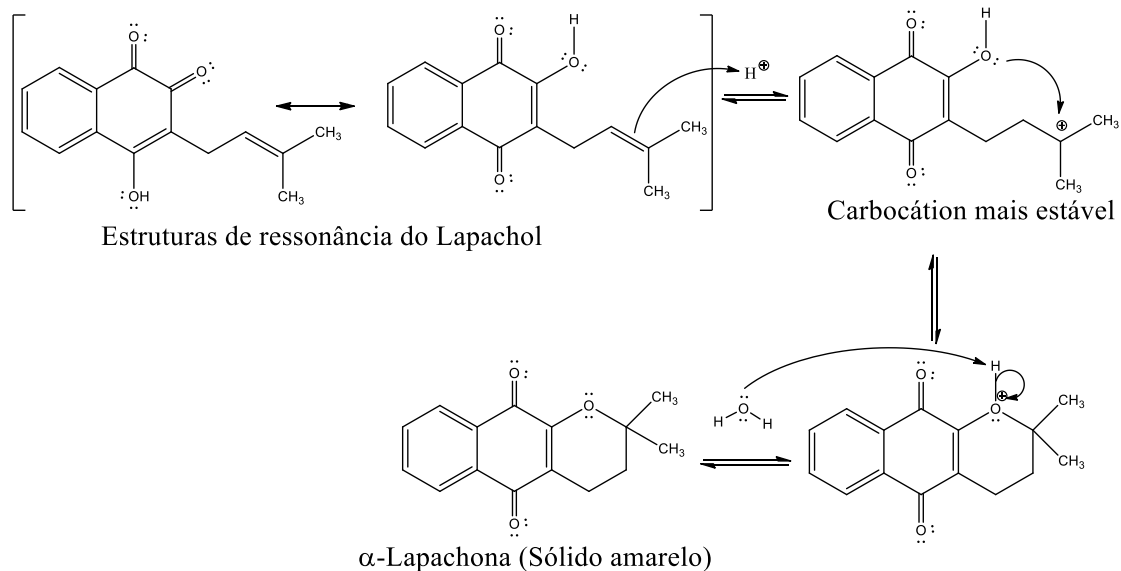
Inicialmente, a α -lapachona foi produzida baseada em uma metodologia amplamente descrita na literatura que utiliza o ácido clorídrico concentrado para a obtenção majoritária da α -lapachona (1). No entanto, a nova metodologia de síntese da α -lapachona utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado (desenvolvida neste trabalho), se mostrou comparativamente

mais eficiente, um vez que apresentou um rendimento maior e não formou o isômero β -lapachona (9) (esquema 15).



Esquema 15 – Rotas sintéticas utilizadas para obtenção da α -lapachona a partir do lapachol.

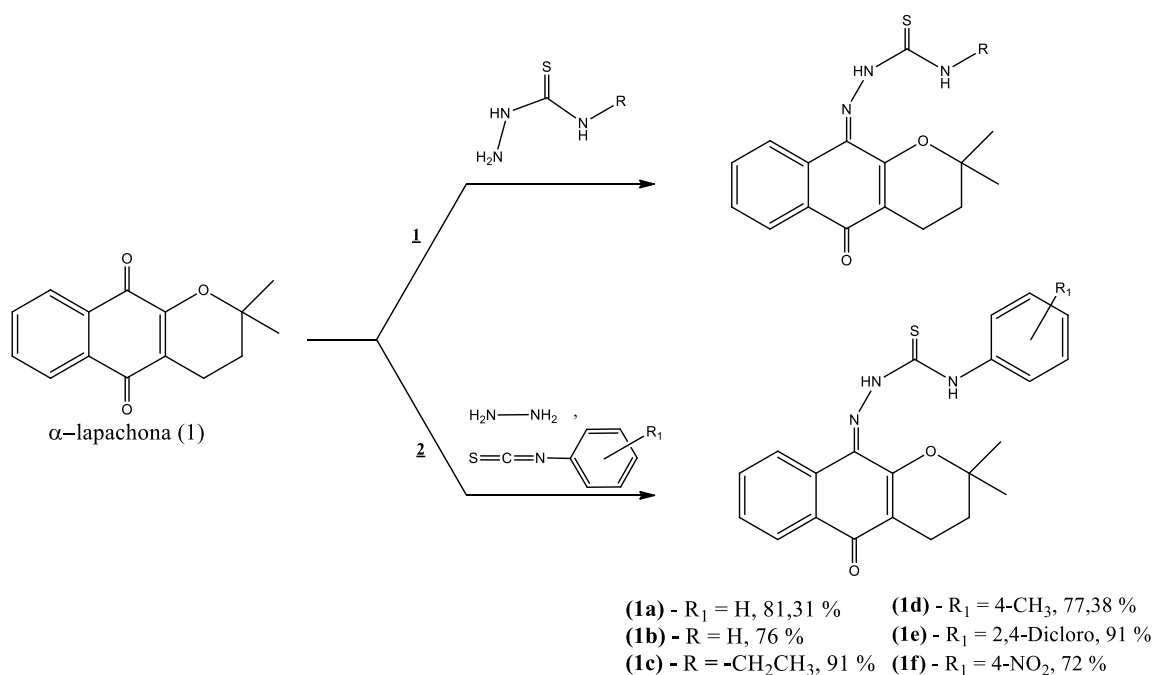
O fator primordial para a obtenção majoritária de um determinado isômero (α ou β -lapachona) não está relacionado com a temperatura reacional e sim com a dureza do ácido utilizado, assim, quanto menor a dureza do ácido mais o equilíbrio reacional é deslocado para formação do isômero α -lapachona (HOOKER, 1936; ETTLINGER, 1950). Em termos mecanísticos, a reação que conduz a formação da α -lapachona a partir do lapachol ocorre em três etapas. Ela se inicia com a adição do ácido concentrado (H₃PO₄ ou HCl) sobre o lapachol (adição eletrofílica), conduzindo a um intermediário carbocátion terciário, que sofre na etapa seguinte uma ciclização decorrente do ataque nucleofílico intramolecular do grupo hidroxila sobre o carbocátion, formando um intermediário oxônio que após o tratamento com água (na última etapa) conduz a formação da α -lapachona (esquema 16).



Esquema 16 - Mecanismo proposto para formação da α -lapachona a partir do lapachol.

7.3 Vias de obtenção das Tiossemicarbazonas (1a-1f)

A síntese dos derivados da α -lapachona ocorreu utilizando duas vias de obtenção diferentes (esquema 17). A primeira (**1**), consistiu na reação da α -lapachona com as tiossemicarbazidas de forma direta, e a segunda (**2**), na reação *one pot* de três componentes da α -lapachona com os respectivos isotiocianatos e a hidrazina, que *in situ* forneceram as correspondentes tiossemicarbazonas.



Esquema 17 - Vias sintéticas para a obtenção das tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona (1a-1f).

As fórmulas estruturais das seis novas tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona (**1a-1f**) estão reunidas na figura 11.

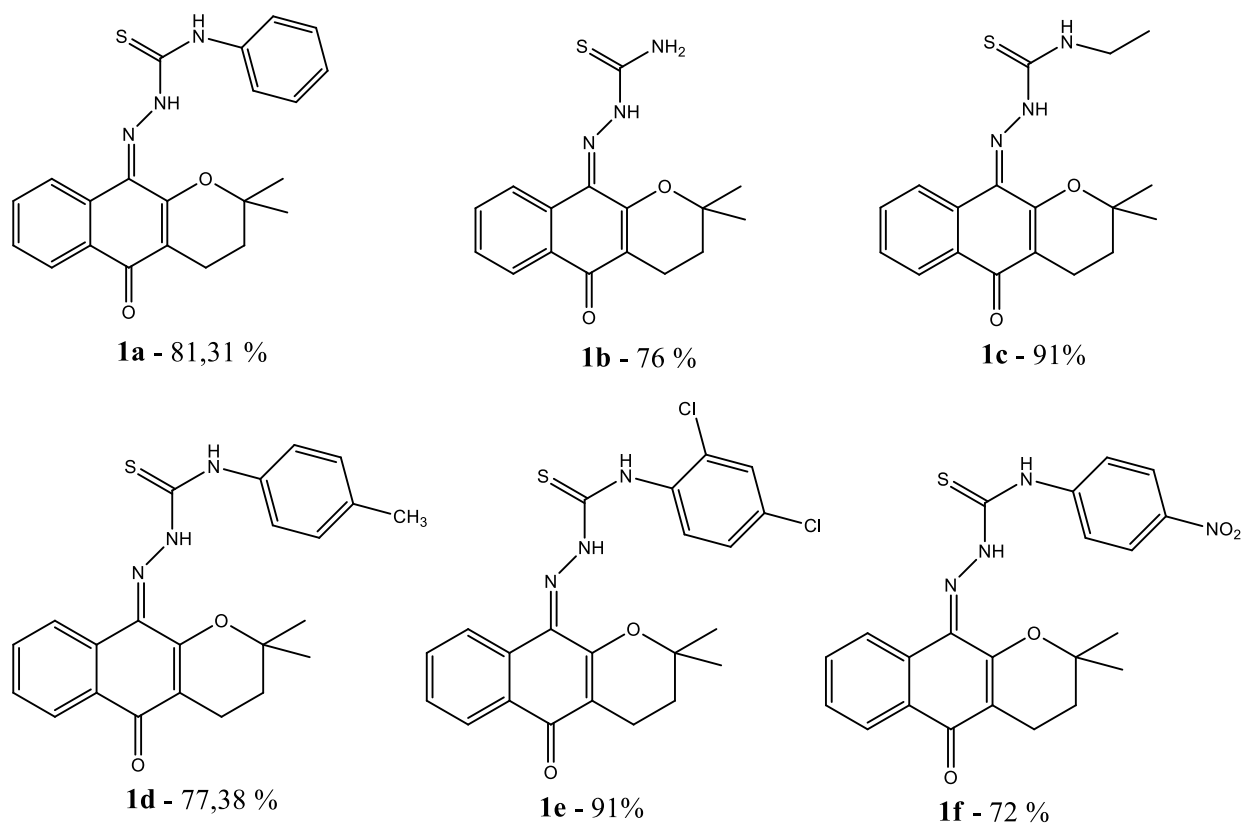
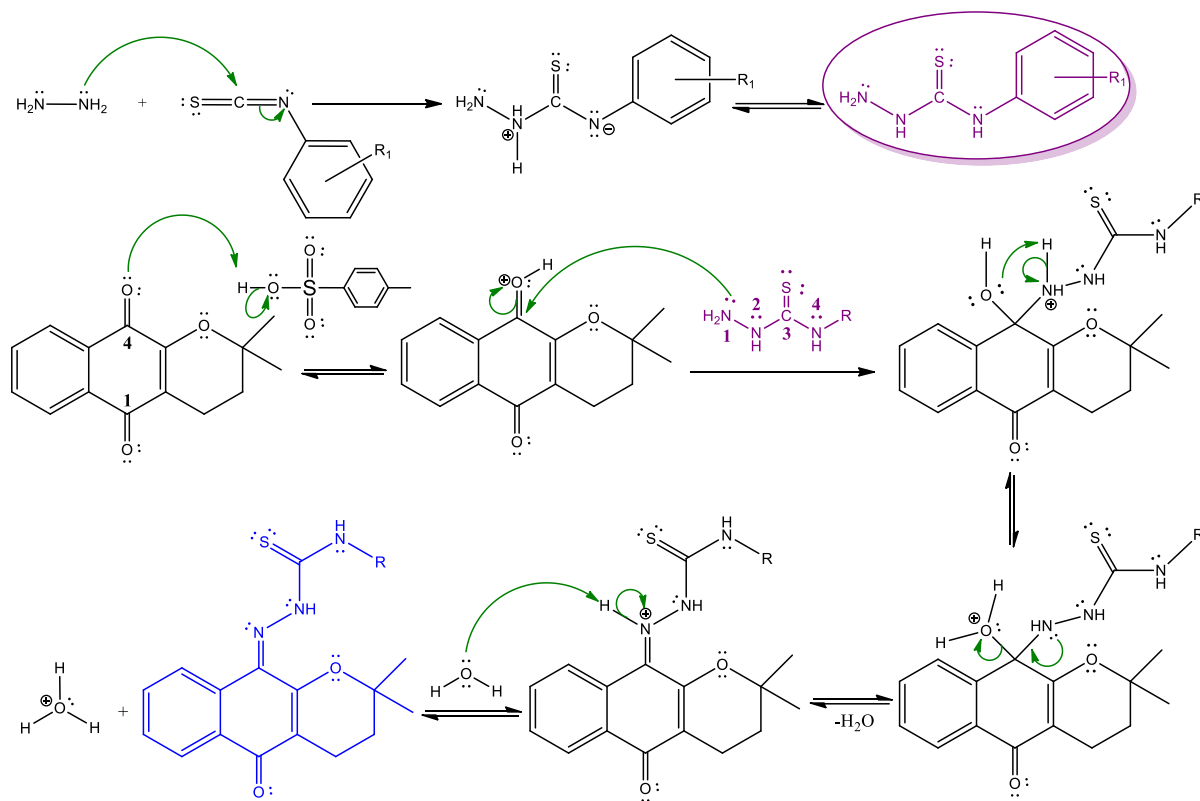


Figura 11 – Fórmulas estruturais das novas tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona (**1a-1f**).

7.3.1 Mecanismo de reação proposto para formação dos compostos (**1a-1f**)

Utilizando a rota sintética **2**, apresentada anteriormente no esquema 17, ocorreu inicialmente uma reação entre a hidrazina e o isotiocianato específico para formação das correspondentes tiossemicarbazidas, configurando assim uma etapa adicional em relação à rota sintética **1** que empregou as respectivas tiossemicarbazidas de forma direta. Como ilustrado no esquema 18, o mecanismo para formação das tiossemicarbazidas começa com uma reação de adição nucleofílica da hidrazina ao carbono $S=C=N$ do isotiocianato, formando um intermediário dipolar que é espontaneamente neutralizado por um rearranjo intramolecular produzindo as respectivas tiossemicarbazidas.

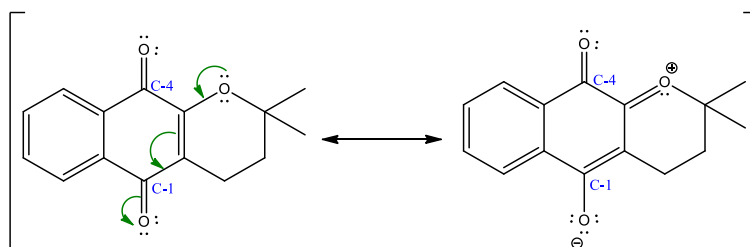


Esquema 18 – Mecanismo de reação para obtenção dos compostos de **1a-1f**. (1a)- R_1 = Fenil; (1b)- R = H; (1c)- R = CH_2CH_3 ; (1d)- R_1 = 4- CH_3 ; (1e)- R_1 = 2,4-dicloro; (1f)- R_1 = 4- NO_2 .

O mecanismo de reação para formação das tiossemicarbazonas (**1a-1f**) se inicia com a protonação do oxigênio da carbonila “C-4” da α -lapachona produzindo um íon oxônio. Em seguida, ocorre um ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio um da tiossemicarbazida ao carbono “C-4”, formando um intermediário hemiaminal N-protonado. Em seguida o par de elétrons da hidroxila captura o próton do nitrogênio para sair como água (desidratação) neutralizando a carga do nitrogênio e formando o grupo imina. A etapa limitante da velocidade, é aquela em que ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio hidrazínico da tiossemicarbazida à carbonila “C-10” (AMARAL, BASTOS, 1971).

O carbono C-4 da carbonila da α -lapachona é mais eletrófilo do que o da carbonila C-1 por isso o ataque nucleofílico da tiossemicarbazida ocorre nesse primeiro. A maior reatividade da carbonila C-4 frente as tiossemicarbazidas se deve, provavelmente, ao efeito de ressonância apresentado pela α -lapachona (esquema 19). O carbono C-1 é estabilizado por ressonância através dos elétrons π da dupla ligação conjugada do anel pirano, gerando uma carga negativa no oxigênio carbonílico e outra positiva no oxigênio do heterocíclo (íon oxônio). No entanto, o carbono C-4 não pode ser estabilizado por esse efeito mesmo estando próximo do anel

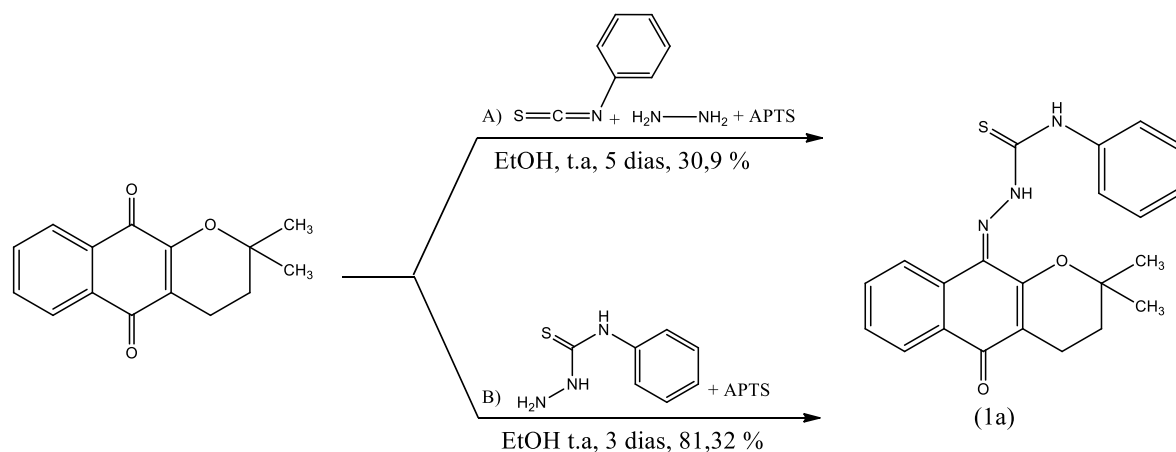
aromático, uma vez que este é muito estável para perder sua aromaticidade nessa estabilização. Em função disso, o carbono da carbonila C-4 é mais suscetível ao ataque da tiossemicarbazida do que o da carbonila C-1.



Esquema 19 – Ressonância apresentada pela α -lapachona.

7.3.2 Ensaios de síntese para a obtenção do derivado **1a**: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2Hbenzo[g]cromen-10(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida

Nos experimentos de síntese do derivado (**1a**), foram utilizadas reações diretas, fazendo reagir a α -lapachona com a 4-fenil-tiossemicarbazida, e reações indiretas utilizando a hidrazina e o isotiocianato de fenila para formar a 4-fenil-tiossemicarbazida *in situ* e reagir em seguida com a α -lapachona. As rotas sintéticas empregadas estão ilustradas no esquema 20.



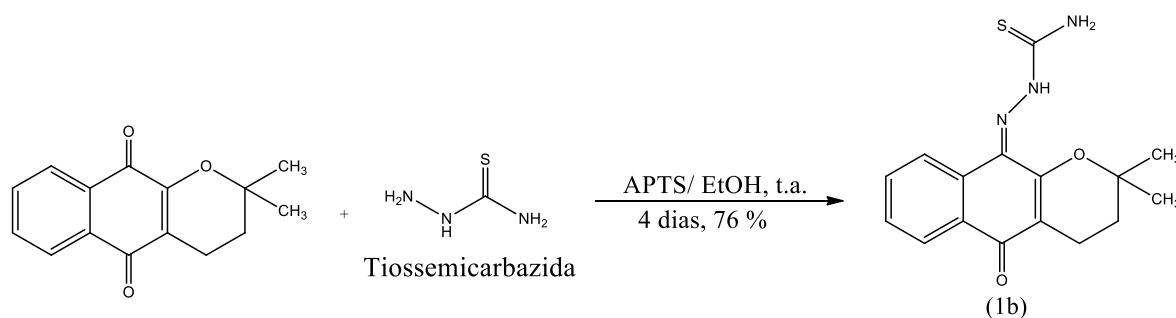
Esquema 20 - Rotas sintéticas utilizadas no estudo de obtenção do derivado **1a**.

Dois métodos (A e B) foram testados para preparar o derivado (**1a**): A) Por tratamento da α -lapachona com isotiocianato de fenila e hidrazina, usando ácido *p*-toluenossulfônico (APTS) em presença de etanol à temperatura ambiente e B) Por tratamento da α -lapachona com 4-fenil-3-tiossemicarbazida utilizando APTS em presença de etanol à temperatura ambiente.

Inicialmente nós utilizamos o método A), mas obtivemos o derivado (**1a**) com um rendimento de 31 % após 5 dias. Na tentativa de aumentar o rendimento dessa reação nós testamos o método B) que consiste em reagir a α -lapachona com a 4-fenil-3-tiossemicarbazida de forma direta, ao invés de formá-la indiretamente *in situ* pela reação da hidrazina com o isotiocianato de fenila. A aplicação da metodologia B) forneceu o derivado (**1a**) com um rendimento de 81,31 % após 3 dias. Em função de sua eficiência sintética, a rota B foi escolhida como padrão para a obtenção do composto (**1a**).

7.3.3 Ensaios de síntese para a obtenção do derivado **1b**: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2Hbenzo[g]cromen-10(5H)-ilideno) hidrazina-carbotioamida

Durante o ensaio de obtenção do derivado (**1b**), nós testamos a reação da α -lapachona com a tiossemicarbazida sob as condições apresentadas no esquema 21.



Esquema 21 – Rota sintética utilizada no estudo de obtenção do derivado **1b**.

Nós utilizamos inicialmente o método apresentado no esquema 21, utilizando APTS em EtOH à temperatura ambiente, o qual forneceu o derivado (**1b**) com um rendimento de 76 % após 4 dias. Devido a sua eficiência sintética, esse método sintético foi tomado como referência para síntese do composto (**1b**).

Ao final de todo o estudo de síntese observamos que, à temperatura ambiente, obtivemos melhores resultados utilizando a 4-fenil-tiossemicarbazida de forma direta, ao invés formá-la *in situ* a partir do isotiocianato de fenila hidrazina.

7.3.4 Obtenção dos derivados (**1c** à **1f**)

Tendo em vista a similaridade estrutural entre os derivados (**1a-1f**), tomamos como base os estudos de síntese dos compostos (**1a**) e (**1b**) para a obtenção dos demais (**1c-1f**). Assim, o derivado (**1c**) foi sintetizado a partir da respectiva tiossemicarbazida e os compostos (**1d-1e**) utilizando a hidrazina e os relativos isotiocianatos sob refluxo (tabela 1).

Como apresentado, com exceção dos derivados (**1a**) e (**1b**), os demais foram obtidos sob aquecimento convencional. Dentre aqueles sintetizados sob aquecimento, os compostos (**1c**) e (**1e**) foram os que mostraram melhor rendimento (91 %) indicando que o método foi eficiente para esse tipo de reação. Observando as reações processadas à temperatura ambiente, constatamos que elas também apresentaram altos rendimentos através de uma metodologia simples de obtenção.

Tabela 1 – Dados reacionais e físico-químicos das tiossemicarbazonas derivadas da α -lapachona.

Der.*	Reagentes (Com a α -lapachona)	Δ (°C)	Cor [‡]	Tempo** (Dias)	PF*** (°C)	Sistema [‡] eluyente	Rend. ** (%)
1a	4-feniltiossemicarbazida, APTS, EtOH	A [†]		3	215-216	8/2	81,31 %
1b	Tiossemicarbazida, APTS, EtOH	A		4	207-209	8/2	76 %
1c	4-etiltiossemicarbazida, APTS, EtOH	R ^{††}		3	140-143	8/2	91 %
1d	Hidrazina, <i>p</i> -toluil isotiocianato, APTS, EtOH	R		2	215-217	8/2	77,38 %
1e	Hidrazina, 2,4-dicloro isotiocianato APTS, EtOH	R		2	193-195	8/2	91 %
1f	Hidrazina, 4-nitrofenil isotiocianato APTS, EtOH	R		5,5	220-223	7/3	72 %

*Derivados sintetizados. ** Tempo reacional. ***Ponto de fusão. [‡] Proporção do sistema eluyente *n*-hexano/acetato de etila. ** Rendimento reacional. [†] Temperatura ambiente. ^{††} Temperatura de refluxo. [‡] Coloração da mistura reacional.

7.4 Caracterização dos compostos sintetizados

Os dados espectrométricos da α -lapachona e seus derivados serão discutidos nesta seção.

7.4.1 Caracterização da α -lapachona

Examinando o espectro de infravermelho da α -lapachona, constatamos absorções correspondentes à deformação axial assimétrica de C-H de aromático em 3076,59 cm⁻¹. As bandas em 2975,00 cm⁻¹ e 2934,47 cm⁻¹ foram atribuídas ao estiramento de deformação axial assimétrica de C-H dos grupos metil e dos grupos metilenos respectivamente. Duas bandas de alta intensidade em 1681,86 cm⁻¹ e 1634,97 cm⁻¹ foram observadas e relacionadas às vibrações de deformação axial de C=O. A absorção em 1575,47 cm⁻¹ foi atribuída à vibração de deformação axial de C=C do anel aromático. As bandas em 1116,76 cm⁻¹ e 1088,03 cm⁻¹ foram atribuídas às vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica de C-O-C respectivamente. Essa análise está de acordo com dados da literatura.

Após análise do espectro de RMN ^1H da α -lapachona, observamos que os dados foram de acordo com aqueles encontrados na literatura (SALAS et al., 2008). Um singlete em $\delta = 1,389$ (6H) foi relacionado aos hidrogênios dos grupos metila. Os hidrogênios metilênicos do C-11 e C-12 aparecem como tripletos em $\delta = 2,561$ (2H) e $\delta = 1,776$ (2H) respectivamente e acoplam entre si J^3 (6,6 Hz). Os hidrogênios aromáticos CH-6 e CH-7 apresentam-se como tripletos em $\delta = 7,599$ (CH) e $\delta = 7,641$ (CH) acoplando J^3 (5,4 Hz) e J^3 (4,8 Hz) respectivamente com $\delta = 7,987$ (d, CH-5) e $\delta = 8,011$ (d, CH-8) e entre si $J^3 = 7,5$ Hz. Desse modo, os dupletos em $\delta = 7,987$ (CH-5) e $\delta = 8,011$ (CH-8) apresentam acoplamento $J^3 = 5,4$ Hz e $J^3 = 4,8$ Hz respectivamente. Os multipletos observados, se deve a uma ligeira distorção que resulta no aparecimento de desdobramentos extras em 300 MHz quando $\Delta\nu/J$ é menor que 10 (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2013).

O espectro de RMN ^{13}C dessa naftoquinona também se mostrou em conformidade com as informações apresentadas na literatura (RIBEIRO, PINTO, PINTO, 1990). Os dois carbonos primários das metilas aparecem em $\delta = 26,360$ ppm. Os carbonos secundários C-11 e C-12 dos grupos metilenos apresentam-se em $\delta = 16,577$ e $31,213$ ppm respectivamente. Os carbonos quaternários do anel alicíclico apresentam-se em $\delta = 78,007$, $119,978$, $154,402$ ppm. Já os carbonos quaternários do anel aromático encontram-se em $\delta = 130,929$ e $131,837$. Identificamos os carbonos do anel aromático ligados à hidrogênio (C-H) em $\delta = 125,770$, $126,121$, $132,776$ e $133,722$ ppm. E por fim, localizamos os dois carbonos das carbonilas em $179,806$ e $184,163$ ppm.

7.4.2 Caracterização dos derivados (1a–1f)

Os resultados espectrométricos dos cinco derivados (**1a–1f**), serão abordados a seguir.

7.4.2.1 Análise dos Espectros de Infravermelho (IV)

Uma análise comparativa dos espectros de infravermelho dos derivados **1a–1f** com o da α -lapachona, revelou uma identidade em relação as principais bandas de absorção presentes no espectro desta última. Essa observação sugere a presença do núcleo da α -lapachona na estrutura dos derivados supracitados (tabela 2).

Analizando os dados da tabela 2 observamos, com exceção da carbonila $\text{C}_4=\text{O}$, a presença dos demais grupos funcionais da α -lapachona na estrutura dos seis derivados obtidos. Assim, constatamos a permanência da porção aromática através das bandas de absorções próximas à 3076 cm^{-1} e 1575 cm^{-1} referentes à deformação axial assimétrica de C-H de

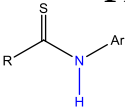
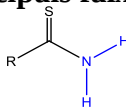
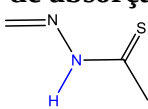
aromático e à vibração de deformação axial de C=C do anel aromático respectivamente. A presença do anel alicíclico na estrutura dos derivados foi indicada pelas absorções na faixa de 2975 cm^{-1} e 1116 cm^{-1} correspondentes ao estiramento de deformação axial assimétrica de C-H alifático e às vibrações de deformação axial assimétrica de C-O-C respectivamente. A carbonila $\text{C}_1=\text{O}$ permaneceu na estrutura dos seis derivados (**1a-1f**) como indicado pelas absorbâncias na faixa de 1635 cm^{-1} relacionadas às vibrações de deformação axial de C=O.

Tabela 2 - Principais bandas de absorção no infravermelho relacionadas ao núcleo da α -lapachona.

Derivados	Principais faixas de absorção no Infravermelho (cm^{-1})					
	C-H (Aromático)	C-H (Alifático)	$\text{C}_4=\text{O}$	$\text{C}_1=\text{O}$	C=C	C-O-C (Assimétrico)
α -lapachona	3076,59	2975,00	1681,86	1634,97	1575,47	1116,76
1a	3061,47	2971,10	-	1630,50	1597,69	1139,60
1b	2980,41	2965,40	-	1622,73	1602,83	1133,10
1c	2974,81	2931,47	-	1632,41	1595,39	1128,34
1d	2984,00	2917,00	-	1627,70	1595,00	1133,87
1e	~3085,71	2964,11	-	1628,87	1595,63	1126,72
1f	3093,63	2899,68	-	1631,91	1592,54	1147,83

A inserção dos substituintes (tiossemicarbazidas) na carbonila $\text{C}_4=\text{O}$ da α -lapachona, foi indicada através de absorções em faixas características que são apresentadas na tabela 3. A presença das aminas terminais substituídas, da porção tiossemicarbazona, foi observada através das absorbâncias entre $3350\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ correspondente às vibrações de deformação axial de aminas secundárias. No caso do derivado **1b**, duas bandas de absorção relacionadas à amina primária terminal, foram observadas em $3400\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$. Em todos os compostos a ligação N-H hidrazínica foi identificada em maiores comprimentos de onda devido, entre outros fatores, à ligação de hidrogênio intramolecular surgindo na faixa de 3280 cm^{-1} . A substituição na carbonila $\text{C}_4=\text{O}$ da naftoquinona pela porção hidrazínica dos substituintes, foi constatada através das absorbâncias na região de 1560 cm^{-1} característica da ligação C=N (grupo imina). Por fim, as absorções na faixa de 1400 cm^{-1} e 1050 cm^{-1} correspondentes à N-C=S e C=S respectivamente, confirmaram a formação das tiossemicarbazonas.

Tabela 3 - Principais bandas de absorção no infravermelho relacionadas à porção tiossemicarbazona.

Derivados	Principais faixas de absorção no Infravermelho (cm ⁻¹)					
				C=N	N-C=S	C=S
1a	3331,38	-	3294,24	1568,02	1438,83	1066,23
1b	-	3394,48 3328,82	3276,53	1564,71	1441,74	1052,82
1c	3318,03	-	3065,42	1567,61	1447,84	1070,56
1d	3298,00	-		1512,53	1449,18	1071,96
1e	3299,55	-	3268,12	1574,88	1451,92	1065,68
1f	3287,78	-	3155,06	1569,48	1440,32	1065,06

7.4.2.2 Análise dos Espectros de Massas de Alta Definição dos compostos (1a–1f)

Devido à similaridade estrutural entre os derivados obtidos, observamos um padrão de quebra (fragmentação) quando comparamos os espectros de massas de todos os compostos sintetizados (1a -1f). A tabela 4 reúne as massas (dos adutos) e as correspondentes fórmulas moleculares da α -lapachona e seus derivados.

Tabela 4 – Dados espectrométricos de Massas de Alta Resolução da α -lapachona e seus derivados.

Compostos	Massa Molecular experimental [M+H] ⁺	Massa Molecular teórica [M+H] ⁺	Fórmula molecular
α-lapachona	243,1016	243,1016	C ₁₅ H ₁₄ O ₃
1a	392,1420	392,1427	C ₂₂ H ₂₁ N ₃ O ₂ S
1b	316,1096	316,1114	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂ S
1c	344,1428	344,1427	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₂ S
1d	406,1580	406,1584	C ₂₃ H ₂₃ N ₃ O ₂ S
1e	460,1201	460,0648	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₂ SCl ₂
1f	437,2209	437,1278	C ₂₂ H ₂₀ N ₄ O ₄ S

7.4.2.3 Análise dos Espectros de RMN ^1H

Os espectros de RMN ^1H dos seis derivados (**1a-1f**) apresentaram um sinal próximo à δ 1,541 (s, 6H) referente às duas metilas da porção naftoquinona e dois outros em δ 1,882 (t, 2H, $J^3 = 6,5$) e δ 2,655 (t, 2H, $J^3 = 6,5$) relativos aos metilenos, os quais acoplam entre si. Adicionalmente para o composto **1c**, observamos outro sinal de metila em δ 1,376 (t, 3H, $J^3=7,5$) que acopla com δ 3,837 (m, 2H, $J^3 = 7,5$) correspondente ao metileno do grupo etil presente na molécula (Figura 12). No derivado **1d**, vemos um sinal em δ 2,399 (s, 3H) relacionado ao grupo metil ligado ao anel aromático da porção tiossemicarbazona (Figura 13).

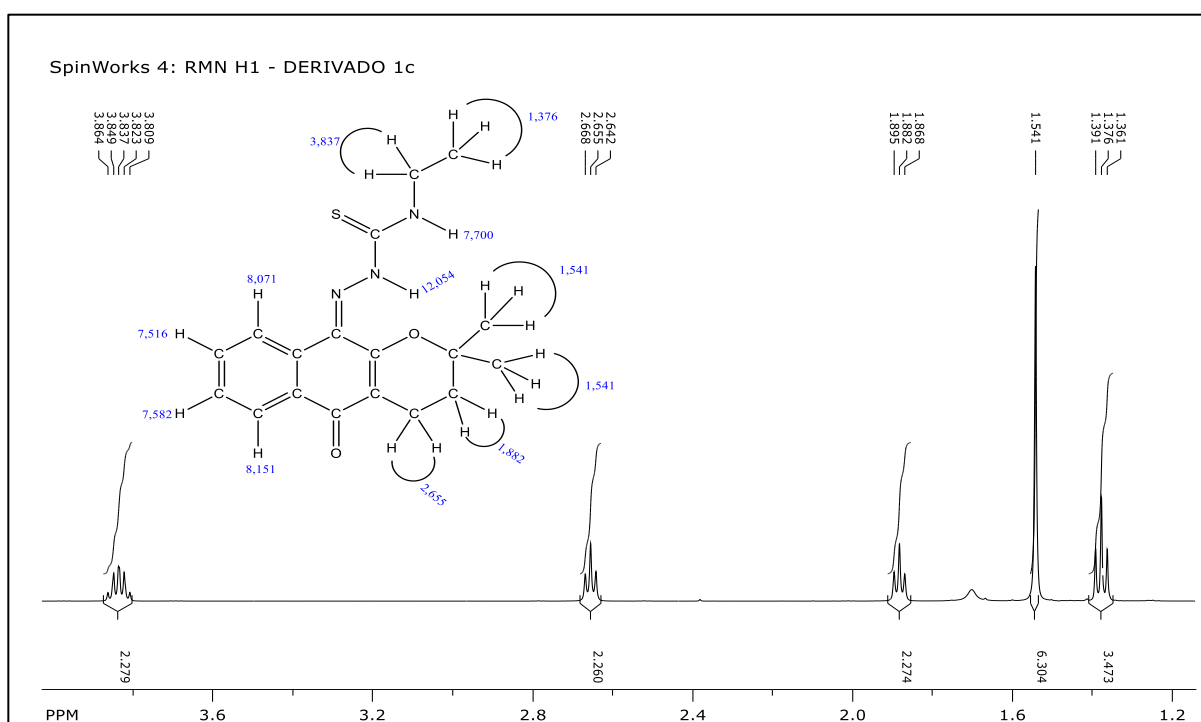


Figura 12 – RMN ^1H do derivado **1c** mostrando os sinais dos grupos metil e metileno.

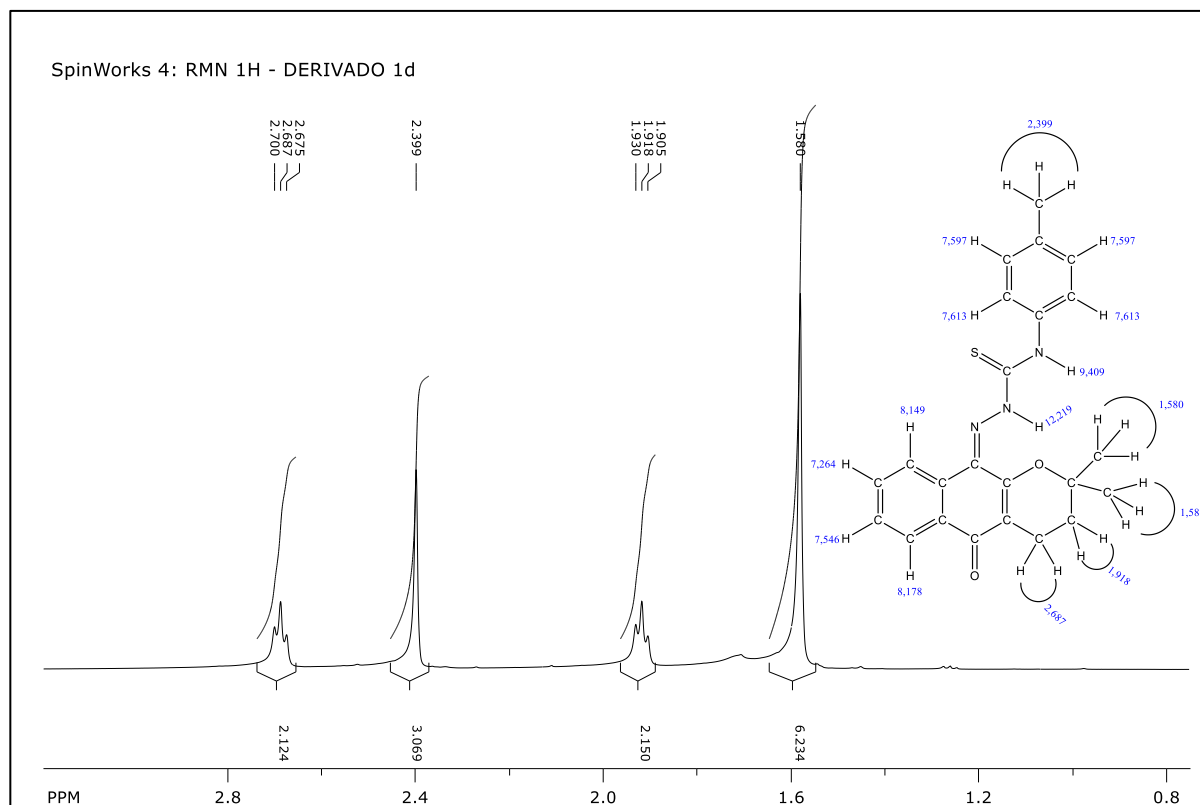


Figura 13 – RMN ^1H do derivado **1d** mostrando todos os sinais abaixo de 5 ppm.

Analisando os sinais acima de 5 ppm, observamos majoritariamente dupletos e tripletos referentes aos hidrogênios ligados diretamente aos anéis aromáticos. Nessa faixa do espectro, o derivado **1a** apresentou um maior número desses sinais devido ao grupo fenil não substituído da porção tiossemicarbazona. O oposto foi constatado para os compostos **1b** e **1c** que não apresentam esse grupo. Nos espectros de RMN ^1H de todos os derivados, o sinal relativo ao resíduo de clorofórmio (CHCl_3) presente no solvente deuterado (CDCl_3), foi observado próximo à δ 7,264 ppm. Os sinais próximos à δ 10,0 (s, 1H) e δ 12,0 (s, 1H) presentes nesses mesmos espectros (**1a-1f**), referem-se respectivamente ao próton ligado ao nitrogênio terminal e hidrazínico. Ampliações do espectro de RMN ^1H do composto **1e**, mostrado a seguir (Figuras 14 e 15), exemplificam essa análise.

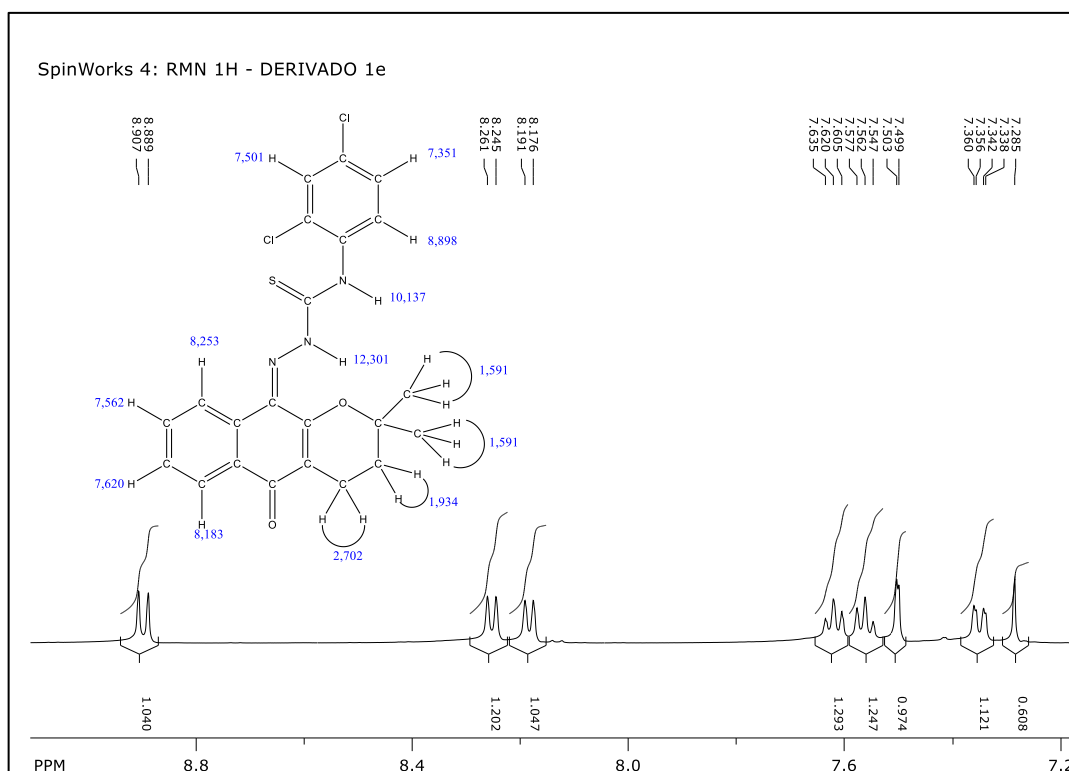


Figura 14 – Ampliação do espectro de RMN ^1H do derivado **1e** na região dos aromáticos.

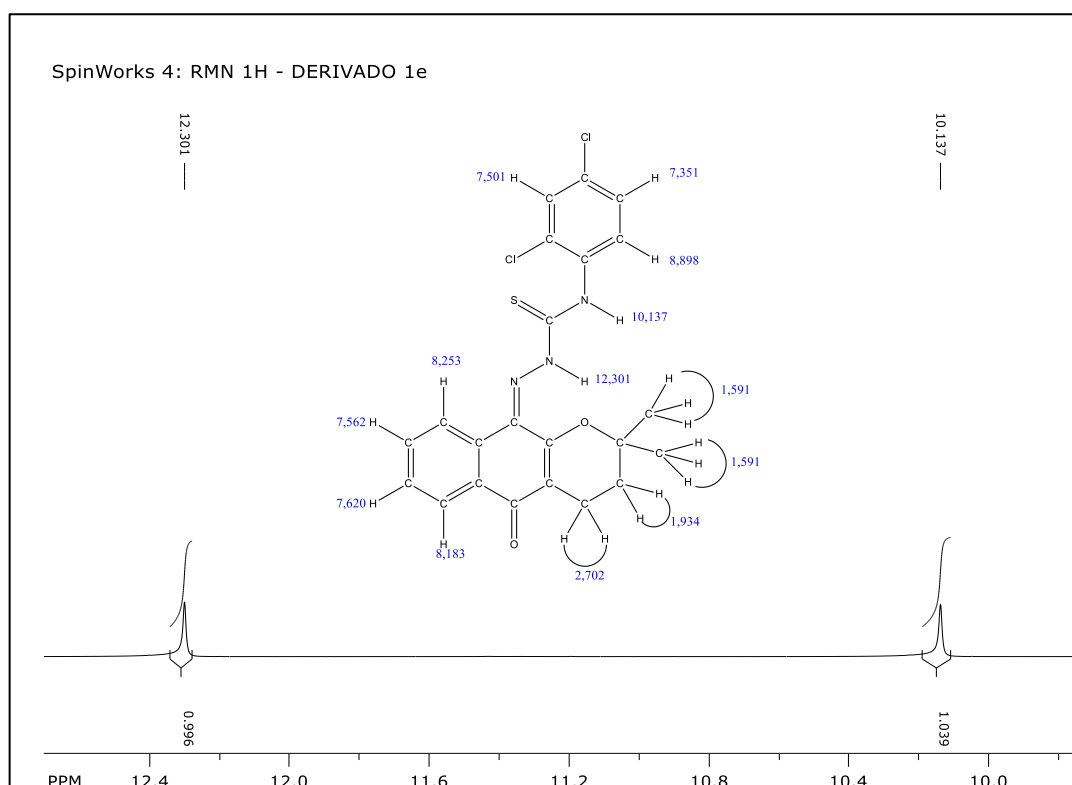


Figura 15 – Ampliação do espectro de RMN ^1H do derivado **1e** mostrando os sinais dos prótons ligados aos nitrogênios.

Figura 16 – Ampliação dos espectros de RMN ^{13}C do derivado **1c** (a esquerda) e **1d** (a direita) apresentando os sinais das metilas e metilenos.

Nos espectros de RMN ^{13}C de todos os compostos (**1a-1f**), observamos que os carbonos dos anéis aromáticos ligados à hidrogênio (C-H) apresentaram deslocamentos na faixa de δ 123-132 ppm, e que os quaternários (C) exibiram sinais entre δ 129-137 ppm. Identificamos também um sinal próximo a δ 130 ppm, correspondente ao carbono do grupo imina e outro próximo a δ 176 relativo ao grupo tiona, os quais adicionado ao desaparecimento do sinal em δ 179,806 ppm da carbonila $\text{C}_4=\text{O}$ da α -lapachona, confirmaram a formação das respectivas tiossemicarbazonas. A figura 17 a seguir exemplifica essa discussão.

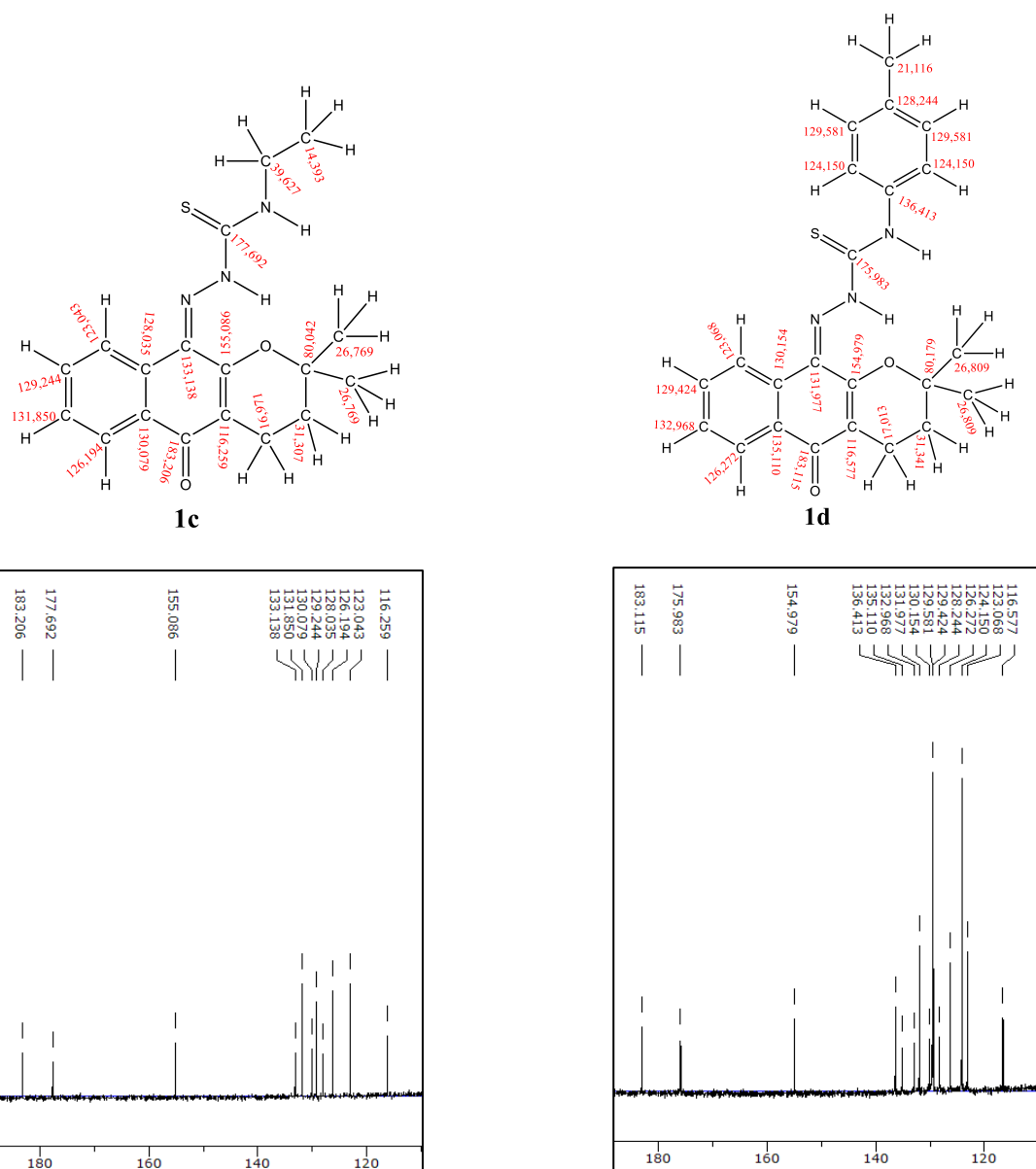


Figura 17 – Ampliação dos espectros de RMN ^{13}C do derivado **1c** (a esquerda) e **1d** (a direita) apresentando os sinais na região dos aromáticos e dos grupos imina e tiona.

7.5 Resultados biológicos

7.5.1 Citotoxicidade (MTT)

Inicialmente foi realizado o MTT por um período de 72 horas de incubação utilizando uma linhagem de câncer de cólon (HCT 116). Os resultados para a α -lapachona e seus derivados (exceto para 1b) podem ser observados nas Figuras de 18 à 18E.

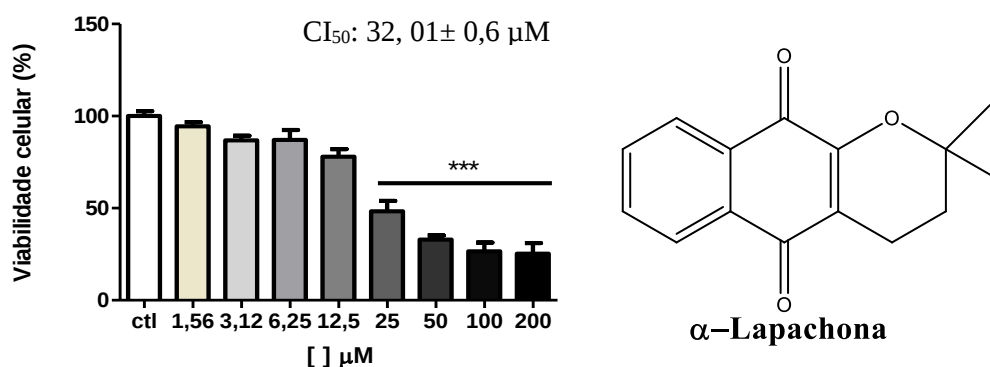


Figura 18 – Efeito citotóxico do composto α -lapachona sobre a linhagem HCT 116 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 em relação ao controle. Ctl: Controle.

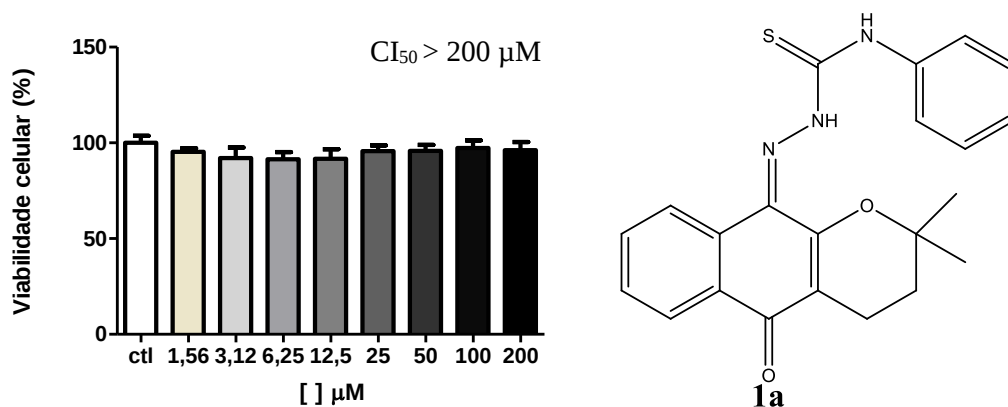


Figura 18 A – Efeito citotóxico do composto 1a sobre a linhagem HCT 116 após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni. Ctl: Controle.



Figura 18 B – Efeito citotóxico do composto **1f** sobre a linhagem HCT 116 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle.

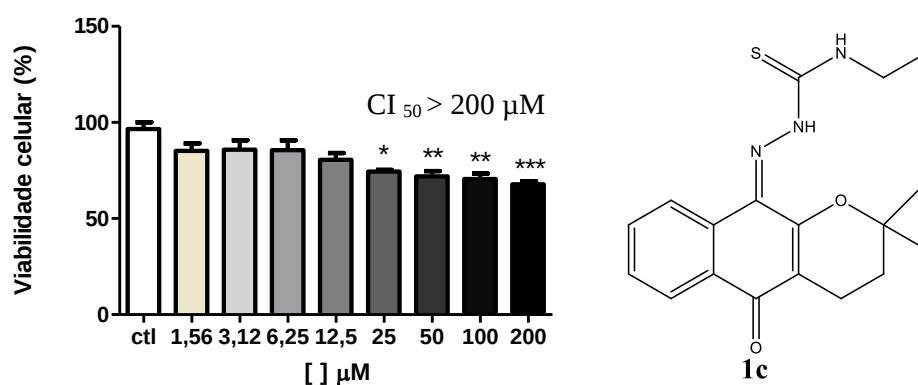


Figura 18 C – Efeito citotóxico do composto **1c** sobre a linhagem HCT 116 após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ em relação ao controle.

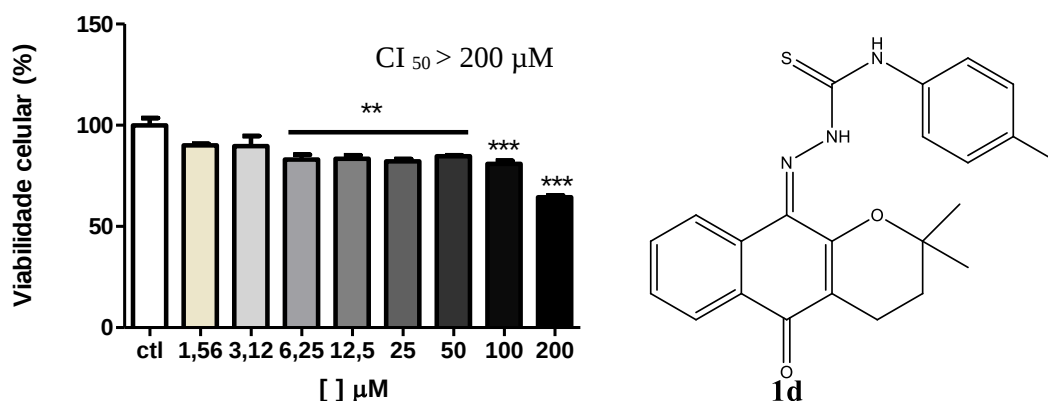


Figura 18 D – Efeito citotóxico do composto **1d** sobre a linhagem HCT 116 após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio de MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

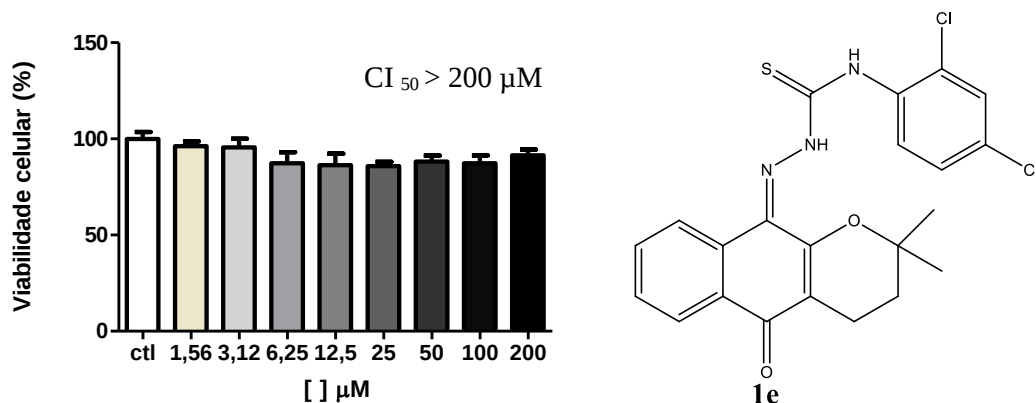


Figura 18 E – Efeito citotóxico do composto **1e** sobre a linhagem HCT 116 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle.

Os resultados de MTT para a α -lapachona e seus derivados (exceto para **1b**) após um período de 72 horas de incubação com a linhagem de leucemia mieloide crônica (K562), podem ser observados nas Figuras de 19 à 19E.

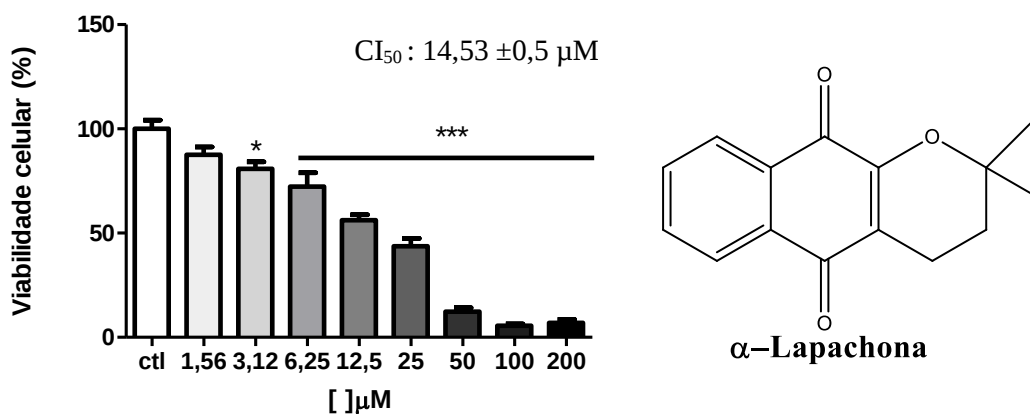


Figura 19 – Efeito citotóxico do composto α -Lapachona sobre a linhagem K562 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

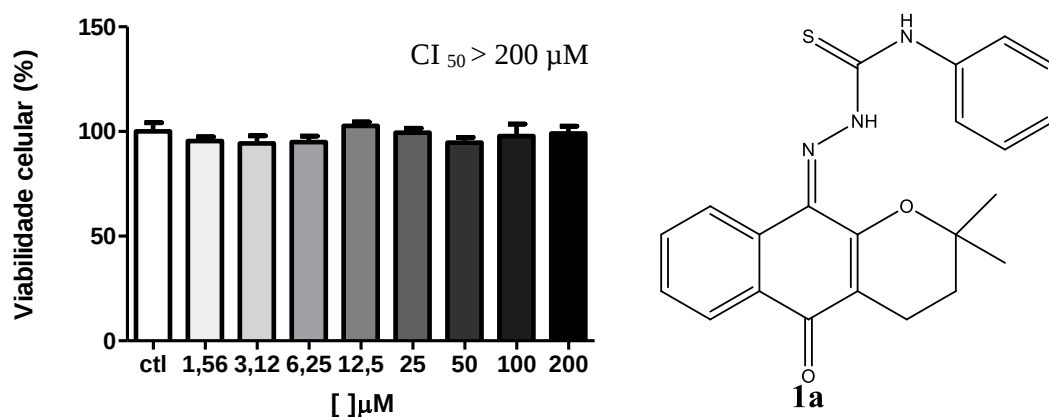


Figura 19 A – Efeito citotóxico do composto **1a** sobre a linhagem K562 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle.

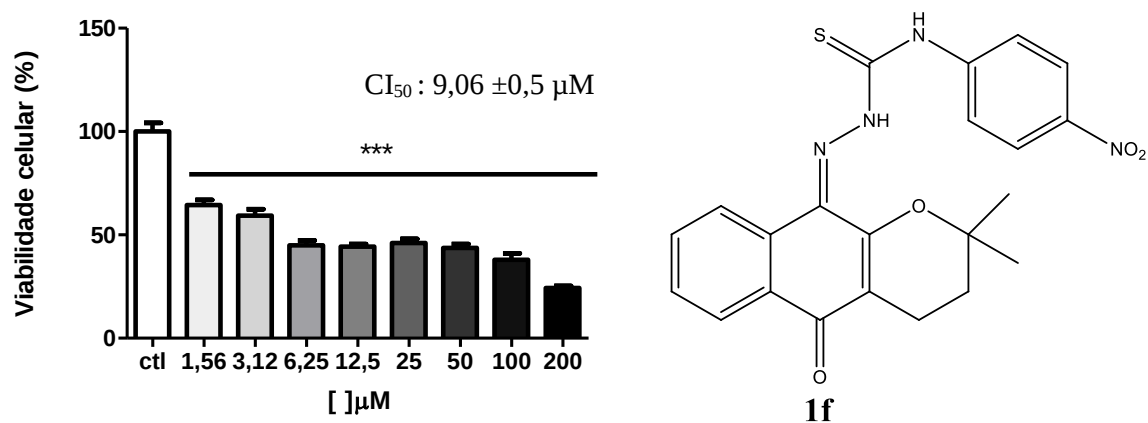


Figura 19 B – Efeito citotóxico do composto **1f** sobre a linhagem K562 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 em relação ao controle. Ctl: Controle.

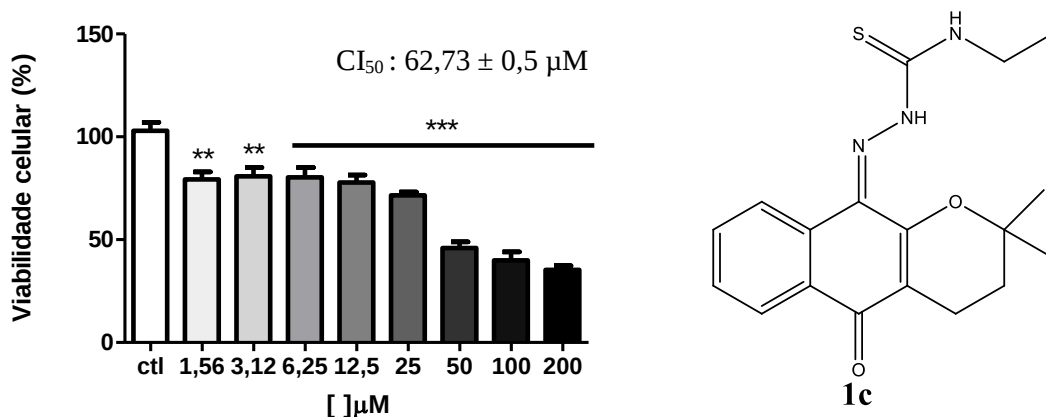


Figura 19 C – Efeito citotóxico do composto **1c** sobre a linhagem K562 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

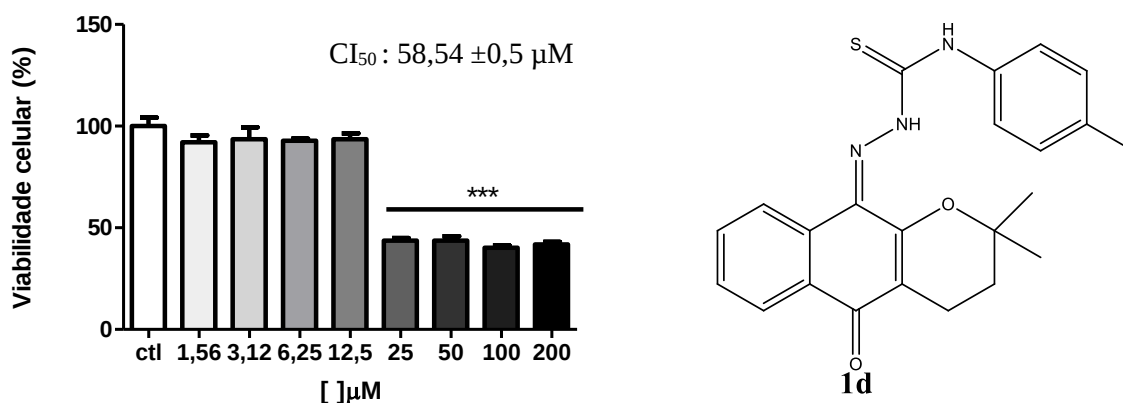


Figura 19 D – Efeito citotóxico do composto **1d** sobre a linhagem K562 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

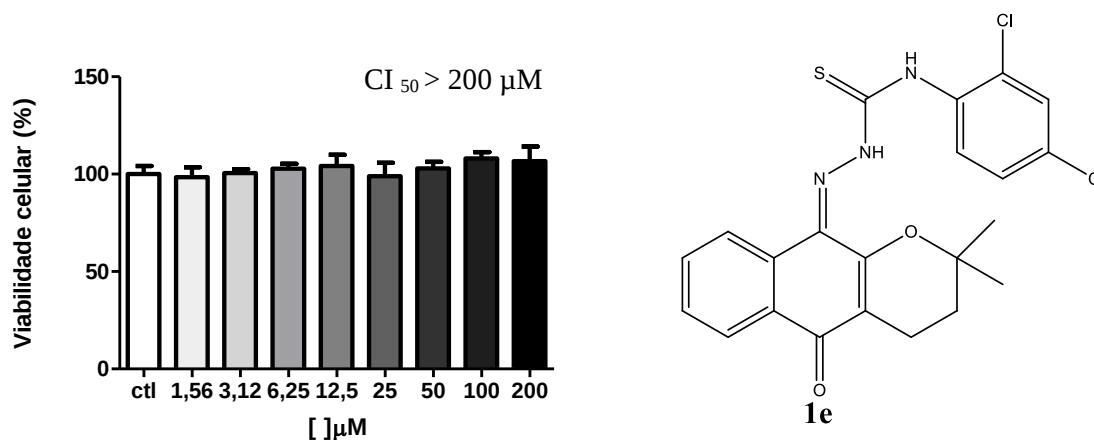


Figura 19 E – Efeito citotóxico do composto **1e** sobre a linhagem K562 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

Os resultados de MTT para a α -lapachona e seus derivados (exceto para 1b) após um período de 72 horas de incubação com a linhagem de fibroblasto murino (L929), podem ser observados nas Figuras de 20 à 20E.

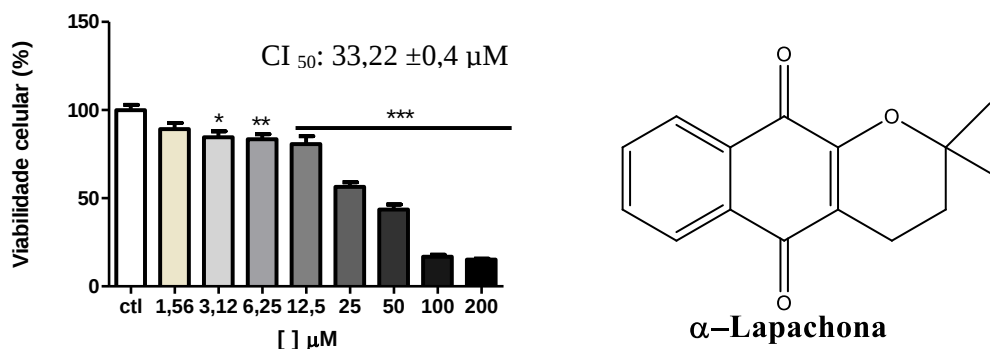


Figura 20 – Efeito citotóxico do composto α -Lapachona sobre a linhagem L929 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $P < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

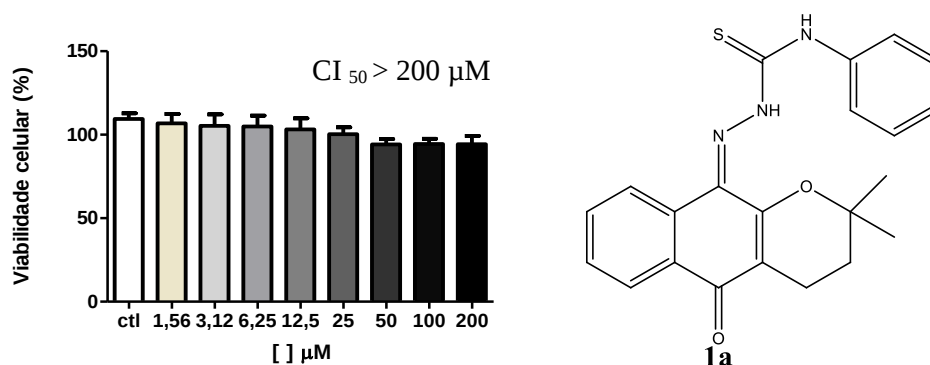


Figura 20 A - Efeito citotóxico do composto **1a** sobre a linhagem L929 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle.

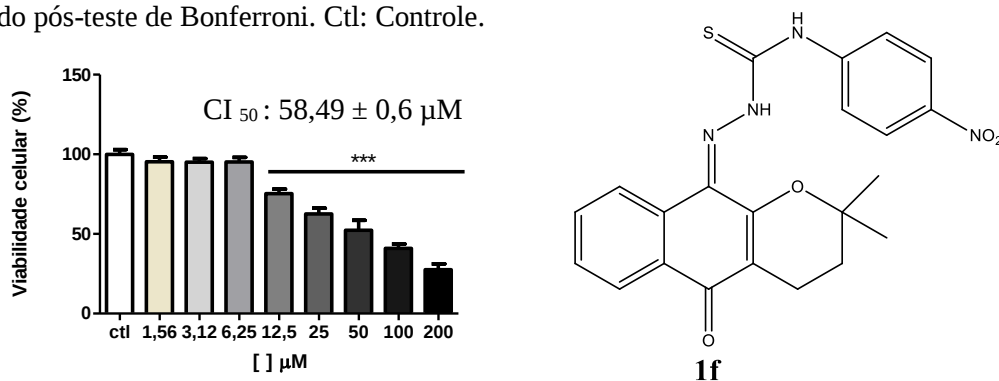


Figura 20 B – Efeito citotóxico do composto **1f** sobre a linhagem L929 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $P < 0,001$ em relação com controle. Ctl: Controle.

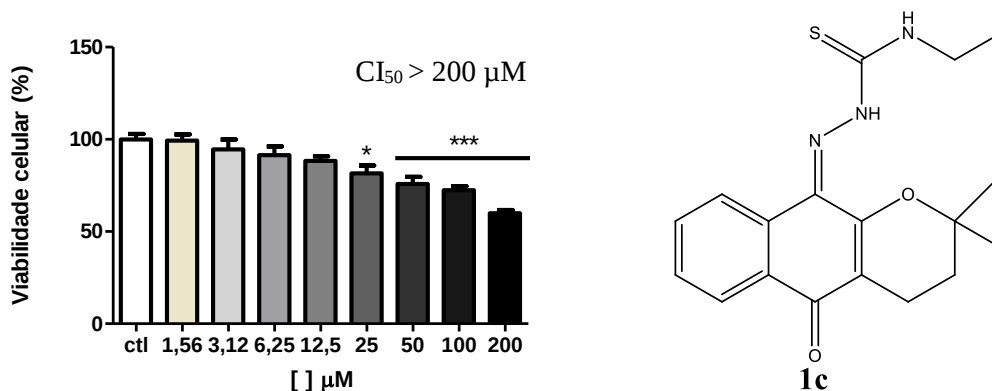


Figura 20 C – Efeito citotóxico do composto **1c** sobre a linhagem L929 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ em relação com controle. Ctl: Controle.

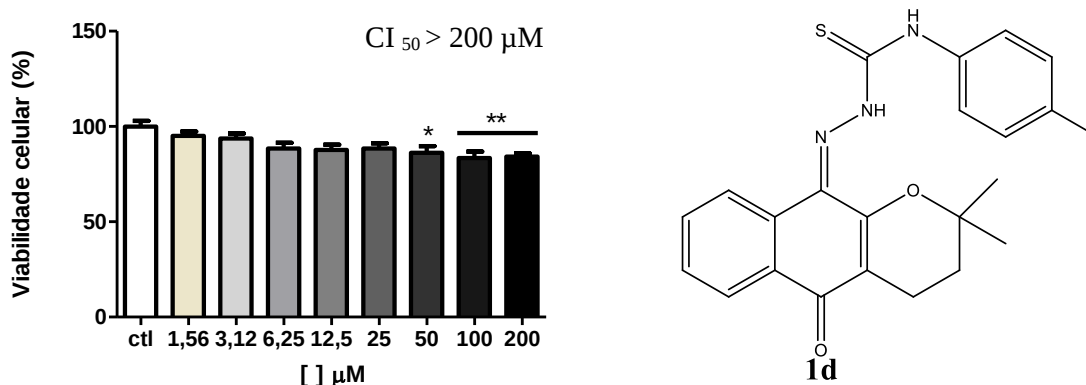


Figura 20 D – Efeito citotóxico do composto **1d** sobre a linhagem L929 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ em relação com controle. Ctl: Controle.

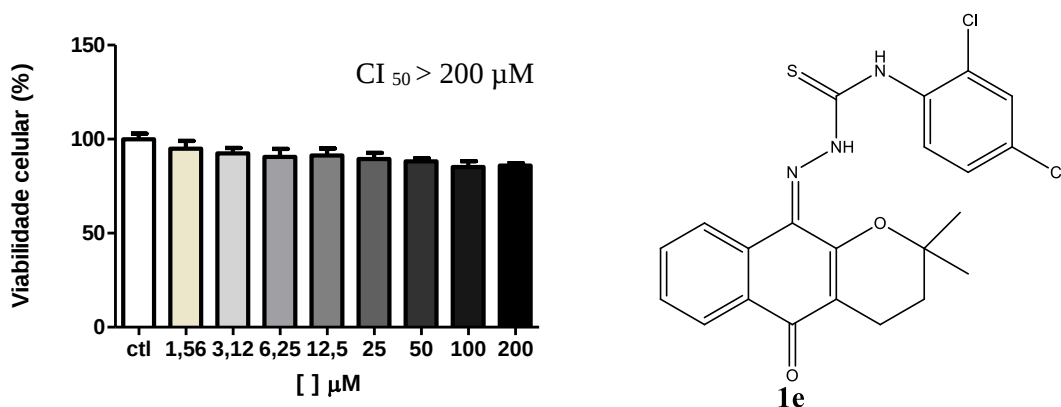


Figura 20 E – Efeito citotóxico do composto **1e** sobre a linhagem L929 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle.

Os resultados de MTT para a α -lapachona e seus derivados (exceto para 1b) após um período de 72 horas de incubação com a linhagem de câncer pulmonar humano (NCI-H292), podem ser observados nas Figuras de 21 à 21E.

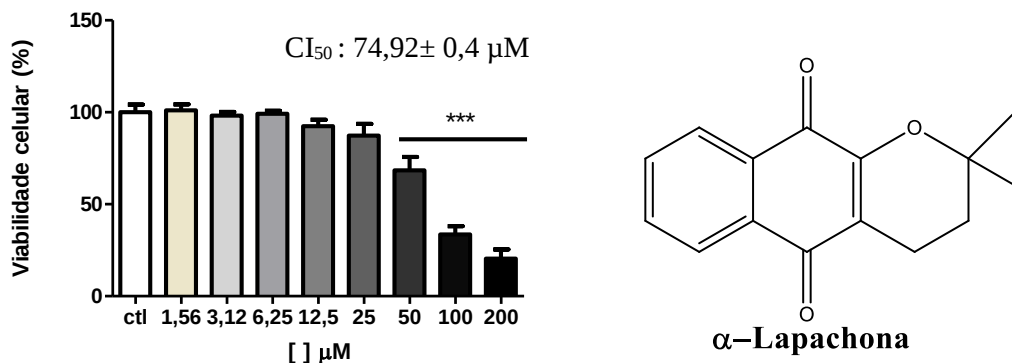


Figura 21 – Efeito citotóxico do composto α -Lapachona sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 em relação ao controle. Ctl: Controle.

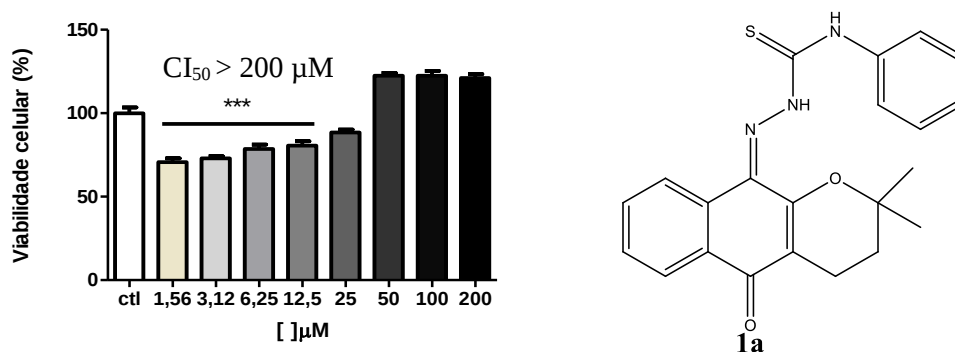


Figura 21 A – Efeito citotóxico do composto **1a** sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 em relação ao controle. Ctl: Controle.

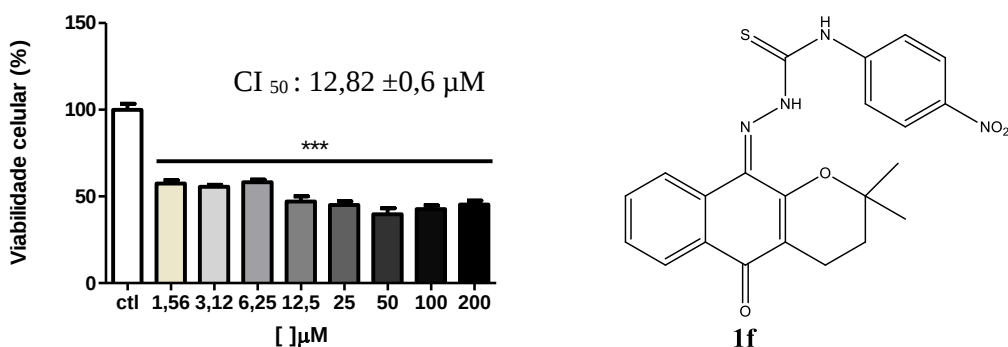


Figura 21 B – Efeito citotóxico do composto **1f** sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p < 0,001 em relação ao controle. Ctl: Controle.

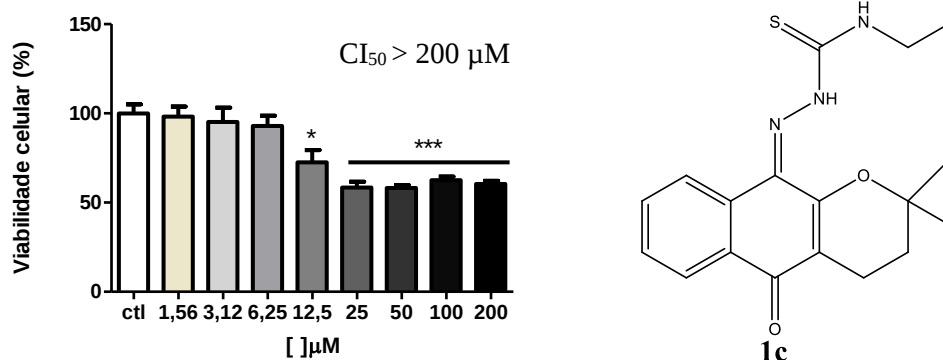


Figura 21 C – Efeito citotóxico do composto **1c** sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

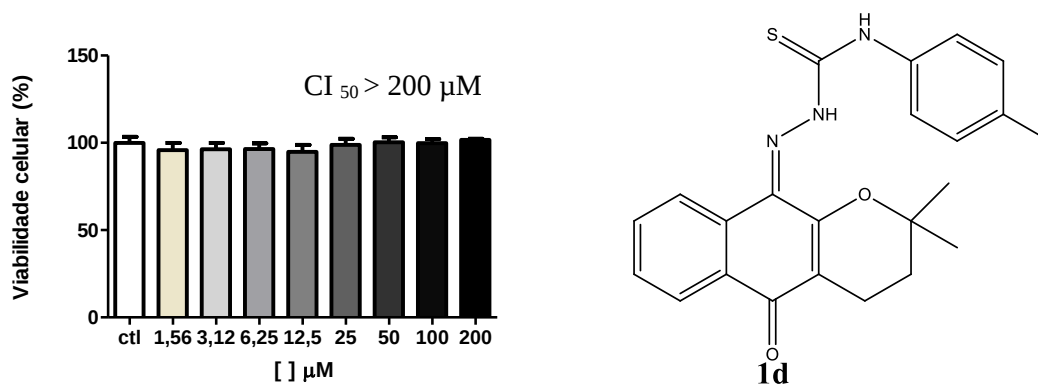


Figura 21 D – Efeito citotóxico do composto **1d** sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle.

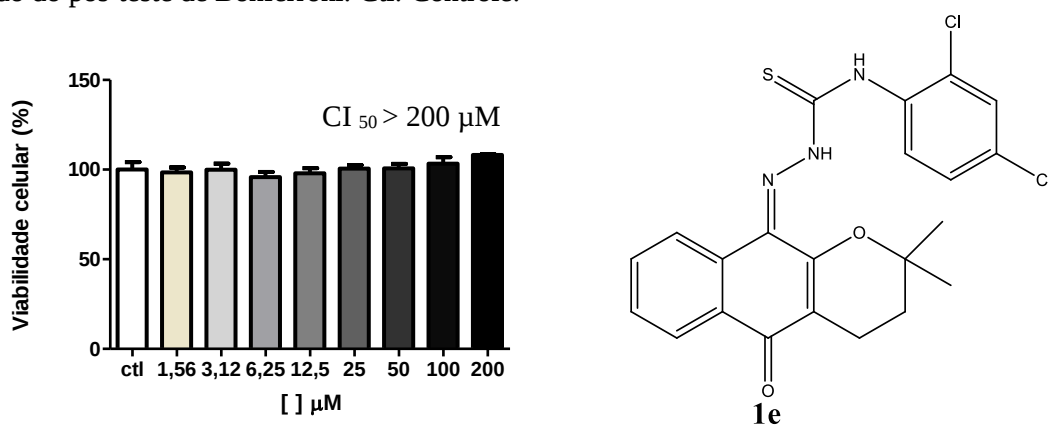


Figura 21 E – Efeito citotóxico do composto **1e** sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle.

Após análises dos dados de MTT das figuras 18 à 21E, observamos que apenas o derivado **1f** apresentou um resultado promissor de citotoxicidade (IC_{50} : $9,06 \pm 0,5 \mu M$), atuando sobre a linhagem de leucemia mieloide crônica K562 após 72 horas de incubação.

O derivado **1f**, sendo um composto nitrobenzênico com atividade antitumoral, parece apresentar o processo de biorredução enzimática do grupo nitro como possível mecanismo de ação. Este último, assim como o mecanismo de ação oxidativo das quinonas, ocorre com formação de várias espécies reativas de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, etc). Isso pode explicar a maior atividade citotóxica de **1f** em relação aos outros derivados já que mais ERO são formados no meio intracelular (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009).

Andrade (2017), estudando o potencial antitumoral de derivados tiossemicarbazonas da β -lapachona, descreveu em 2017 atividade antiproliferativa *in vitro* para o composto BV-3 um isômero do derivado **1f**. Para avaliar essa atividade, foi realizado o método de MTT utilizando várias linhagens de células tumorais (NCI-H292, MCF-7, HEP-2, HL-60, K562, K562 Lucena e MOLT-4) em um período de 72 horas de incubação inicialmente. Após esse período, BV-3 apresentou uma IC_{50} que variou entre 0,12 à $>25 \mu M$.

Comparando a atividade antiproliferativa do derivado **1f** com o seu isômero (BV-3) em relação às linhagens K562 (leucemia mieloide crônica) e NCI-H292 (câncer pulmonar humano), constatamos que **1f** foi menos potente para as referidas linhagens do que seu isômero BV-3, mas, os resultados apresentados pelo derivado **1f** também são considerados promissores incentivando a continuidade dos estudos antiproliferativos com esse composto (Tabela 5).

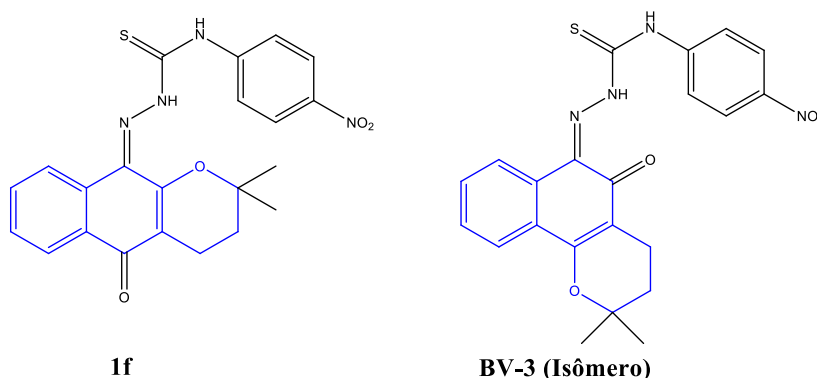


Tabela 5 - Estrutura e concentrações inibitórias (IC_{50}) do derivado **1f** e seu isômero BV-3.

Linhagem tumoral	IC_{50} de 1f (μM)	IC_{50} de BV-3 (μM)
K562	$9,06 \pm 0,5$	0,6 (0,5-0,7)
NCI-H292	$12,82 \pm 0,6$	0,94 (0,6-1,4)

Os valores correspondem ao resultado de MTT após um período de 72 horas de incubação.

7.5.2 Antimicrobiano

Os resultados dos testes de susceptibilidade bacteriana (após 24 horas de incubação) e fúngica (após 48 horas de incubação) aos compostos **1a** à **1f** utilizando a técnica de microdiluição em caldo, podem ser observados nas tabelas de 6 à 11.

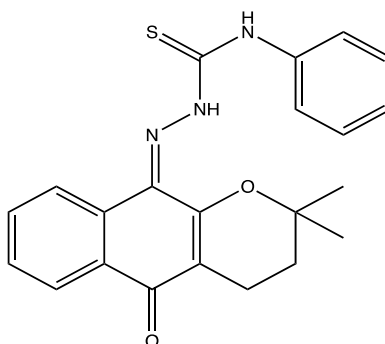


Tabela 6 – Sensibilidade microbiana ao composto **1a** por técnica de microdiluição em caldo.

<u>Micro-organismos</u>	<u>1a</u> (µg / mL)	<u>[α]</u> (µg / mL)	<u>[G]</u> (µg / mL)	<u>[F]</u> (µg / mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02 (G+)	> 1000	250	1,95	
<i>Escherichia coli</i> (G-) UFPEDA 224	> 1000	> 1000	7,8	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 (G-)	> 1000	> 1000	1,95	
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138 (G+)	> 1000	> 1000	62,5	
<i>Candida krusei</i> UFPEDA 1002 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA 213 (G+)	> 1000	500	3,9	

(G+) Gram positivo; (G-) Gram negativo; (FL) Fungo leveduriforme; [α] α-Lapachona; [G] Gentamicina; [F] Fluconazol

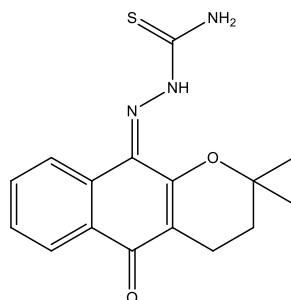


Tabela 7 - Sensibilidade microbiana ao composto **1b** por técnica de microdiluição em caldo.

<u>Micro-organismos</u>	<u>1b</u> (µg / mL)	[α] (µg / mL)	[G] (µg / mL)	[F] (µg / mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02 (G+)	> 1000	250	1,95	
<i>Escherichia coli</i> (G-) UFPEDA 224	> 1000	> 1000	7,8	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 (G-)	> 1000	> 1000	1,95	
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138 (G+)	> 1000	> 1000	62,5	
<i>Candida krusei</i> UFPEDA 1002 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007 (FL)	> 31,25	> 1000		62,5
<i>Candida glabrata</i> URM 6393 (FL)	> 1000	-		62,5
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA 213 (G+)	> 31,25	500	3,9	

(G+) Gram positivo; (G-) Gram negativo; (FL) Fungo leveduriforme; [α] α-lapachona; [G] Gentamicina; [F] Fluconazol

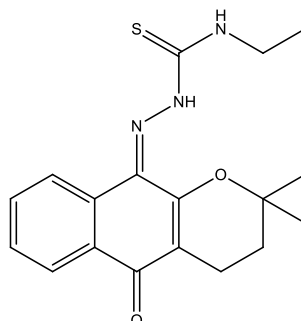


Tabela 8 – Sensibilidade microbiana ao composto **1c** por técnica de microdiluição em caldo.

<u>Micro-organismos</u>	<u>1c</u> (µg / mL)	[α] (µg / mL)	[G] (µg / mL)	[F] (µg / mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02 (G+)	> 1000	250	1,95	
<i>Escherichia coli</i> (G-) UFPEDA 224	> 1000	> 1000	7,8	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 (G-)	> 1000	> 1000	1,95	
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138 (G+)	> 1000	> 1000	62,5	
<i>Candida krusei</i> UFPEDA 1002 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007 (FL)	500	> 1000		62,5
<i>Candida glabrata</i> URM 6393 (FL)	> 1000	-		62,5
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA 213 (G+)	> 1000	500	3,9	

(G+) Gram positivo; (G-) Gram negativo; (FL) Fungo leveduriforme; [α] α-lapachona; [G] Gentamicina; [F] Fluconazol

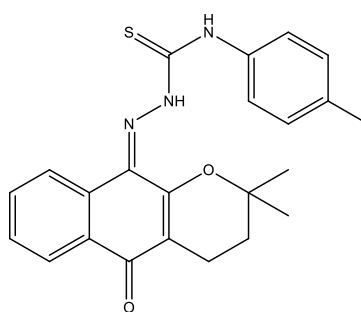


Tabela 9 – Sensibilidade microbiana ao composto **1d** por técnica de microdiluição em caldo.

<u>Micro-organismos</u>	<u>1d</u> ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	$[\alpha]$ ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	[G] ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	[F] ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02 (G+)	> 250	250	1,95	
<i>Escherichia coli</i> (G-) UFPEDA 224	> 1000	> 1000	7,8	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 (G-)	> 1000	> 1000	1,95	
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138 (G+)	> 1000	> 1000	62,5	
<i>Candida krusei</i> UFPEDA 1002 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007 (FL)	> 1000	> 1000		62,5

(G+) Gram positivo; (G-) Gram negativo; (FL) Fungo leveduriforme; $[\alpha]$ α -lapachona; [G] Gentamicina; [F] Fluconazol

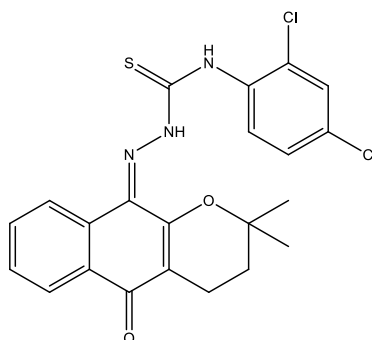


Tabela 10 – Sensibilidade microbiana ao composto **1e** por técnica de microdiluição em caldo.

<u>Micro-organismos</u>	<u>1e</u> ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	$[\alpha]$ ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	[G] ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	[F] ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02 (G+)	> 1000	250	1,95	
<i>Escherichia coli</i> (G-) UFPEDA 224	> 1000	> 1000	7,8	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 (G-)	> 1000	> 1000	1,95	
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138 (G+)	> 1000	> 1000	62,5	
<i>Candida krusei</i> UFPEDA 1002 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA 213 (G+)	> 31,25	500	3,9	

(G+) Gram positivo; (G-) Gram negativo; (FL) Fungo leveduriforme; $[\alpha]$ α -lapachona; [G] Gentamicina; [F] Fluconazol

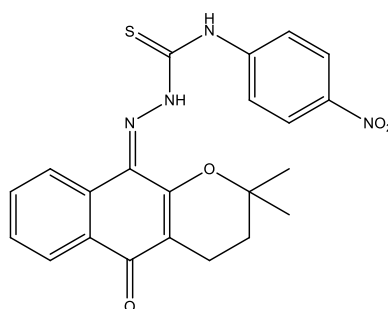


Tabela 11 – Sensibilidade microbiana ao composto **1f** por técnica de microdiluição em caldo.

<u>Micro-organismos</u>	<u>1f</u> (µg / mL)	[α] (µg / mL)	[G] (µg / mL)	[F] (µg / mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02 (G+)	> 1000	250	1,95	
<i>Escherichia coli</i> (G-) UFPEDA 224	> 1000	> 1000	7,8	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 (G-)	> 1000	> 1000	1,95	
<i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138 (G+)	> 1000	> 1000	62,5	
<i>Candida krusei</i> UFPEDA 1002 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007 (FL)	> 1000	> 1000		62,5
<i>Candida glabrata</i> URM 6393 (FL)	> 1000	-		62,5
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA 213 (G+)	> 1000	500	3,9	

(G+) Gram positivo; (G-) Gram negativo; (FL) Fungo leveduriforme; [α] α-lapachona; [G] Gentamicina; [F] Fluconazol

Os compostos **1a**, **1d** e **1e**, dissolvidos em acetato de etila, apresentaram um problema no momento das diluições. Isso ocasionou uma redução na quantidade desses derivados impossibilitando os testes de susceptibilidade fúngica envolvendo a *Candida glabrata*.

Os testes de sensibilidade microbiana realizados por método de microdiluição em caldo, demonstraram que dentre os derivados sintetizados, **1b** e **1e** foram os que apresentaram melhor atividade inibitória contra alguns micro-organismos utilizados, ambos com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) > 31,25 µg/ mL. O derivado **1b** apresentou uma CIM inferior ao do fluconazol (fármaco de escolha no tratamento da candidíase) sobre a espécie *Candida albicans* e o composto **1e** foi mais ativo contra a espécie *Bacillus cereus* do que a α-lapachona, porém menos efetivo que a gentamicina (antibiótico comercial). Os demais derivados (**1a**, **1c**, **1d** e **1f**) assim como a α-lapachona não demonstraram atividade inibitória significativa contra os micro-organismos testados, exibindo uma CIM superior a 250 µg/ mL.

Barbosa (2014), relatou atividade antimicrobiana para derivados tiossemicarbazonas da β-lapachona sendo estruturalmente relacionados aos obtidos no presente trabalho (**1a-1f**), diferindo apenas na disposição dos anéis da porção naftoquinona (angular ou linear). Em seu

trabalho foi descrito uma CIM maior ou igual à 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todos os derivados obtidos, os quais foram avaliados contra diversos micro-organismos como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Comparando os valores das concentrações inibitórias de todos esses derivados tiossemicarbazonas (da α - e β -lapachona), constatamos que os compostos **1b** e **1e** (CIM > 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram mais efetivos do que seus correspondentes isômeros (CIM $\geq$ 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 22).

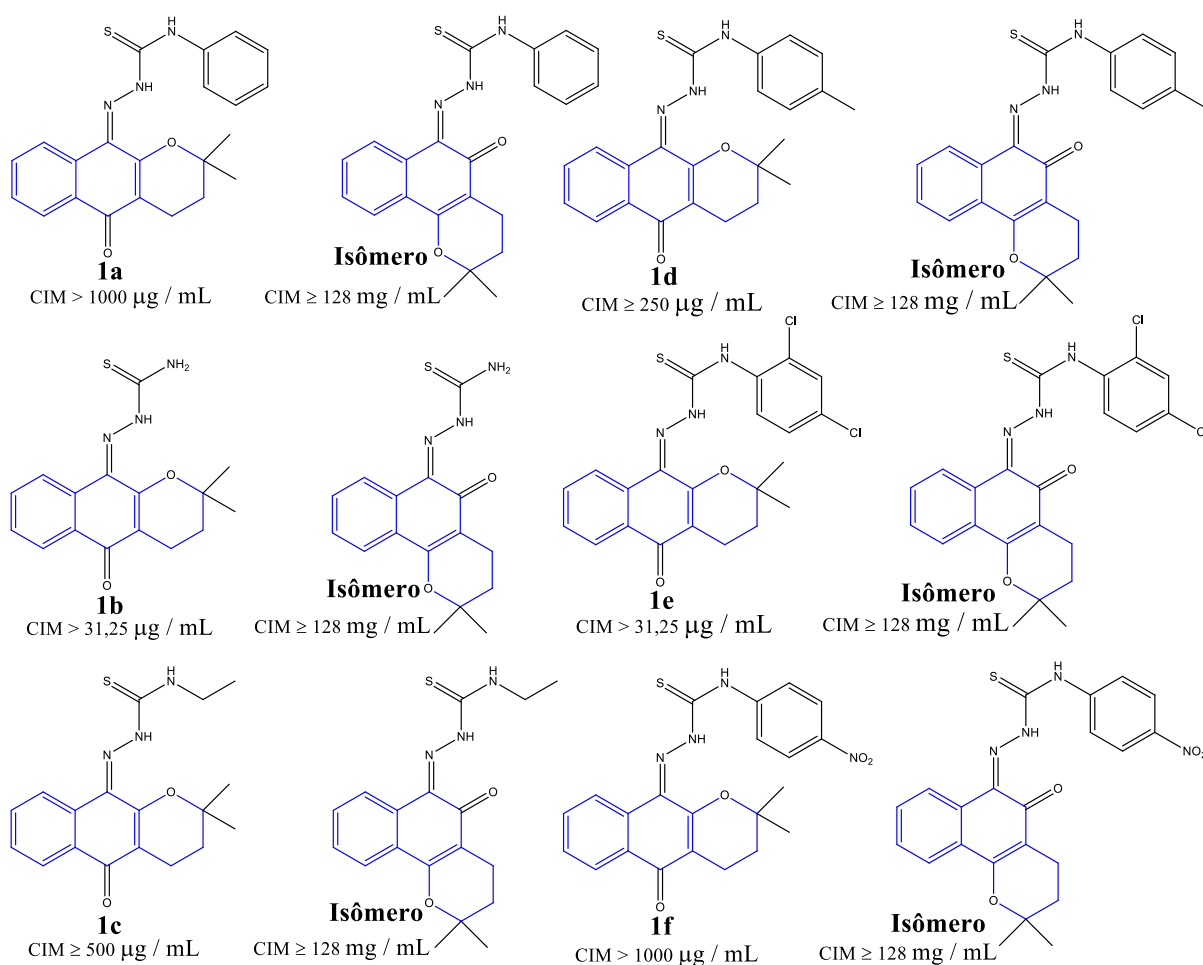


Figura 22 – Estruturas e concentrações inibitórias mínimas dos derivados **1a** - **1f** e seus correspondentes isômeros.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O lapachol foi extraído e purificado a partir da serragem do ipê roxo, através de dois métodos: 1) ácido-base e 2) utilizando o aparelho Góes. Porém, apenas o segundo foi utilizado para a obtenção do lapachol puro, uma vez que apresentou um melhor rendimento.

Para a síntese e purificação da α -lapachona a partir do lapachol, foram utilizados dois métodos: 1) utilizando HCl concentrado e 2) utilizando H₃PO₄. Entretanto, o segundo forneceu um rendimento mais alto e não formou o isômero β -lapachona, por isso foi escolhido para obtenção da α -lapachona na quantidade necessária.

Os seis derivados tiossemicarbazonas da α -lapachona (**1a–1f**) foram sintetizados por duas metodologias distintas de aplicação das tiossemicarbazidas: 1) empregando-as diretamente e 2) formando-as *in situ* a partir da hidrazina e isotiocianatos. Contudo, o primeiro método foi mais efetivo à temperatura ambiente e os rendimentos reacionais variaram de 72 à 91 %.

A caracterização dos compostos foi realizada por espectrometria de infravermelho, espectrometria de massas de alta resolução, espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C.

Os testes de susceptibilidade microbiana por método de microdiluição em caldo, revelaram que os derivados **1b** e **1e** apresentaram melhor atividade inibitória, ambos com uma CIM > 31,25 µg/ mL. O derivado **1b** apresentou uma CIM inferior ao do fluconazol sobre a espécie *Candida albicans* e o composto **1e** foi mais ativo contra a espécie *Bacillus cereus* do que a α -lapachona, porém menos efetivo que a gentamicina.

Os ensaios de citotoxicidade (MTT) demonstraram que dentre os seis derivados tiossemicarbazonas avaliados, apenas **1f** apresentou um resultado promissor de citotoxicidade (IC₅₀ = 9,06 ± 0,5 µM) atuando sobre a linhagem de leucemia mieloide crônica K562 e um resultado expressivo (IC₅₀ = 12,82 ± 06) sobre a linhagem de câncer pulmonar humano NCI-H292 após 72 horas de incubação.

Por fim, observamos que o núcleo da β -lapachona, com disposição angular dos anéis, parece contribuir mais para a atividade antimicrobiana e citotóxica de algumas tiossemicarbazonas do que o núcleo linear da α -lapachona. Todavia, alguns derivados tiossemicarbazonas da α -lapachona apresentaram melhores resultados biológicos do que seus correspondentes isômeros, demonstrando que pesquisas com a α -lapachona para o desenvolvimento de novos fármacos também são necessárias.

Como perspectivas, avaliaremos a atividade citotóxica do derivado **1f** frente à diferentes linhagens de células tumorais e também normais (células mononucleares do sangue periférico) para melhor entendimento do seu potencial antiproliferativo e de sua seletividade.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, L.; BASTOS, M. P. Kinetics and Mechanism for benzaldehyde phenylhydrazone formation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 36, p. 3412-3417, nov. 1971.
- AMATORE, C. et al. Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization. **ChemBioChem**. v. 7, p. 653-661, abr. 2006.
- ANDRADE, J. K. F. D. **Potencial antitumoral de novos derivados da β -lapachona**. 2017. 147 f. Tese. (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2017.
- BALA, B. D.; RAJESH, S. M.; PERUMAL, S. An eco-friendly sequential catalyst-and solvent-free four-component stereoselective synthesis of novel 1,4-pyranonaphthoquinones **Green Chemistry**. v. 14, p. 2484-2490, jul. 2012.
- BARBOSA, T. P. et al. New 1,2,3,4-tetrahydro-1-aza-anthraquinones and 2-aminoalkyl compounds from norlapachol with molluscicidal activity. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 6464-6469, dez. 2005.
- BARBOSA, T. P.; NETO, H. D. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de química orgânica experimental. **Química Nova**. v. 36, p. 331-334, jun. 2013.
- BARBOSA, V. X. **Obtenção por irradiação de micro-ondas, caracterização e avaliação esquistossomocida e antimicrobiana de novas tiossemicarbazonas derivadas de 1,2-naftoquinonas**. 2014. 197 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2014.
- BOURGUIGNON, S. C. et al. Trypanosoma cruzi: *in vitro* activity of Epoxy- α -Lap, a derivative of α -lapachone, on trypomastigote and amastigote forms. **Experimental Parasitology**. v. 122, p. 91-96, mar. 2009.
- _____. Trypanosoma cruzi: insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. **Experimental parasitology**, v. 127, p. 160–166, jan. 2011.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**. v. 473, p. 298–307, mai. 2011.
- CARNEIRO, P. F. et al. Synthesis and antimalarial activity of quinones and structurally-related oxirane derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 134-140, jan. 2016.
- CASTRO, S. L. D.; EMERY, F. S.; SILVA Jr, E. N. D. Synthesis of quinoidal molecules: Strategies towards bioactive compounds with an emphasis on lapachones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 678-700, set. 2013.

CAVALCANTE, F. A. et al. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, α and β -lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, p. 183-189, abr./Jun. 2008.

CAVALCANTI, B. C. et al. Preclinical genotoxicology of nor- β -lapachone in human cultured lymphocytes and chinese hamster lung fibroblasts. **Chemistry Research Toxicology**. v. 19, p. 1560-1574, set. 2011.

_____. Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 24, p. 145-163, jan. 2013.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2008). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational: M27-A3.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational: M7-A10.

COSTA, E. C. B. et al. Synthetic 1,4-Pyran Naphthoquinones Are Potent Inhibitors Of Dengue Virus Replication. **PLoS One**, v.8, p. e82504, dez. 2013.

CROFT, S. L.; OLLIARO P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities, **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, p. 1478-1483, out. 2011.

CRUZ, E. H. G. D. et al. 1,2,3-Triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: Potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. v. 22, p. 1608-1619, jan. 2014.

D'ALBUQUERQUE, I. L., Termorreação da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. **Revista do Instituto de Antibióticos, Recife** v. 8, n. 1/2, p. 73-88, dez. 1968.

DELARMELINA, M. et al. Vibrational spectroscopy of lapachol, α - and β -lapachone: Theoretical and experimental elucidation of the Raman and infrared spectra. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 311-323, ago. 2016.

DIOGO, E. B. T. et al. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of naphthoquinone-containing triazoles: Electrochemical studies on the effects of the quinoidal moiety. **Bioorganic e Medicinal chemistry**. v. 21, p. 6337-6348, set. 2013.

ESMAIL, V. et al. A theoretical study of the intramolecular proton transfer and calculation of the nucleus independent chemical shift in jugione and some of its derivatives. **Journal of the Serbian Chemistry Society**. v. 76, p. 879-890, 2011.

ETTLINGER, M. G. Hydroxynaphthoquinones. II. Cyclization and the basicity and interconversion of ortho and para quinones. **Chemical Laboratory of Harvard University**, v. 72, p. 3090-3095, jul. 1950.

FAHEINA-MARTINS, G. V. **Avaliação do potencial citotóxico das lectinas de *Canavalia ensiformes*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda***. 2009. 124 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba. 2009.

FERREIRA, D. C. M. et al. Ex vivo Activities of β -lapachone and α -lapachone on macrophages: A quantitative Pharmacological analysis based on amperometric monitoring of oxidative bursts by single cells. **ChemBioChem**. v. 10, p. 528-538, fev. 2009.

FERREIRA, V. F. Aprendendo sobre os conceitos ácido e base. **Química Nova na Escola**, v. 4, p. 1–2, nov. 1996.

_____. et al. Trypanocidal agentes with low cytotoxicity to mammalian cell line: A comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. v. 14, p. 5459-5466, mai. 2006.

_____. _____. Novel 1*H*-1,2,3-, 2*H*-1,2,3-, 1*H*-1,2,4- and 4*H*-1,2,4-triazole derivatives: a patente reiew (2008-2011) **Expert Opinion Therapeutc Patents** v. 23, p. 319–331, jan. 2013.

_____.; FERREIRA, S. B.; SILVA, F. C. C. D. Strategies for the synthesis of bioactive pyran naphthoquinones. **Organic and Biomolecular Chemistry**. v. 8, p. 4793–4802, set. 2010.

FIOROT, R. G. et al. A simple and convenient method for synthesis of new aminonaphthoquinones derived from lawsone by catalytic multicomponent Mannich reaction. **Tetrahedron Letters**. v. 55, p. 4373–4377, jul. 2014.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 84, p. 9-16, fev. 2003.

GARCEZ, W. S. et al. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**. v. 5, p. 363-393, jan. 2013.

GARKAVTSEV, I. et al. Dehydro- α -lapachone, a plant product with antivasular activity. **Política Nacional de Assistência Social**. v. 108, p. 11596-11601, jul. 2011.

GONÇALVES DE LIMA, O.; et al. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores – Comunicação XX: Atividade antimicrobiana de alguns derivados do Lapachol em comparação com a xiloidona nova o-naftoquinona natural isolada do extrato do cerne do “Pau D’Arco” roxo, *Tabebuia avellaneda* Lor. ex Griseb. **Revista do instituto de antibióticos, Recife**. v. 4, n. 1/2, p. 3-17, 1962.

GUEDES, P. M. M. et al. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 9, p. 609-620, mai. 2011.

GUIMARÃES, T. T. et al. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant *Leishmania* parasites: Synthesis of novel α - and nor- α -lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 63, p. 523-530, mai. 2013.

HOOKE, C. The constitution of Lapachol and its derivatives. Part V. The structured of Paternò’s “Isolapachone.” **Journal of the Chemical Society, Transactions**. v. 68, n. 8, p. 1190-1197, jul. 1936.

IMWONG, M. et al. A review of mixed malária species infections in anopheline mosquitoes. **Malaria Journal**. v. 10, p. 253, ago. 2011.

JARDIM, G. A. M. et al. On the investigation of hybrid quinones: synthesis, electrochemical studies and evaluation of trypanocidal activity. **RSC Advances**. v. 5, p. 78047-78060, jan. 2015.

JORQUEIRA, A. et al. Oxyrane derivative of α -lapachone is potent growth inhbihor of *Trypanossoma cruzi* epimastigote forms. v. 99, p. 429-433, set. 2006.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Recent developments in the mechanism of anticancer agents based on electron transfer, reactive oxygen species and oxidative stress. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 11, p. 658-668, set. 2011.

KUMAGAI, Y. et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**. v. 52, p. 221-247, fev. 2012.

LÓPEZ, L. I.; LEYVA, E.; CRUZ, R. F. G. Las naftoquinonas: mas que pigmentos naturales. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**. v. 42, p. 6-17, mar. 2011.

MACEDO, L. et al. β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**. v. 21, p. 25-29, dez. 2013.

MORI, B. A. et al. The first catalytic application of copper aluminate nanoparticles in C–C and C–O coupling reaction: green synthesis of some new α -lapachone derivatives. **Monatshefte für Chemie**, v. 147, p. 1849-1854, out. 2016.

NDJONKA, D. et al. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 3395-3439, fev. 2013.

NIEHUES, M. et al. Biomimetic *in vitro* oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the *in vivo* phase I metabolismo of bioactive compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 54, p. 804-812, ago. 2012.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**. v. 32, p. 1013-1020, mar. 2009.

RAHMOUN, N. M. et al. Antimicrobial activities of henna extract and some syn-thetic naphthoquinones derivatives. **American Journal of Medical and Biological Reserch**. v. 1, p. 16-22, fev. 2013.

RAMOS-PERALTA, L. et al. Naphthoquinone: bioactivity and green synthesis. **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**. v. 1, p. 542-550, dez. 2015.

REIS, M. I. P. et al. A new and eficiente procedure for the synthesis of hexahidropirimidine-fused 1,4-naphthoquinones. **Beilstein Journal Organic. Chemistry**. v. 11, p. 1235–1240, jul. 2015.

RIBEIRO, F. W.; PINTO, M. C. F. R.; PINTO, A. V. ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance study of 1,2- and 1,4-naphthoquinones and their derivatives. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v. 1, n.1, dez. 1990.

ROMAGNOLI, M. et al. Wood colour in Lapacho (*Tabebuia serratifolia*): Chemical composition and industrial implications. **Wood science Technology**. v. 47, p. 701-716, fev. 2013.

SALAS, C. et al. *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and α - and β - lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 668-674, jan. 2008.

SALUSTIANO, E. J. S. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational New Drugs**. v. 28, p. 139-144, abr. 2010.

SANTOS, S. R. A atual classificação do antigo gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae), sob o ponto de vista da anatomia da madeira. **Bauduinia**. v. 58, p. 10-24, jun. 2017.

SCHUCK, D. C. et al. Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as antimalarials. **Malaria Journal**. v. 12, p. 234, jul. 2013.

SHARMA, A. et al. Addition of thiols to *o*-quinone methide: New 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 59, p. 48-53, jan. 2013.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites e Vectors**. v. 5, p. 160, ago. 2012.

SILVA Jr, E. N. D. et al. Synthesis and anti- *Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 5030-5038, mar. 2008.

_____. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, p. 399-410, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos 7ª**. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

SOTERO, M. N. C.; CASTRO, S. L. D. Screening do potencial anti-tripanosoma cruzi candidates: *In vitro* and *in vivo* studies. **The Open Medicinal Chemistry Journal**. v. 5, p. 21-30, mar. 2011.

SOUZA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. D. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**. v. 32, p. 486-495, fev. 2016.

SOUZA-SILVA, F. et al. Epoxy- α -lapachone has *in vitro* and *in vivo* anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* effects and inhibits serina proteinase activity in this parasite. **AAC**

Journal American Society for Microbiology. v. 59, p. 1910-1918, jan. 2015.

_____. Evidences for leishmanicidal activity of the naphthoquinone derivate epoxy- α -lapachone. **Experimental Parasitology**. v. 147, p. 81-84, out. 2014.

SUNASSEE, S. N. et al. Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal Medicinal Chemistry**. v. 62, p. 98-110, abr. 2013.

SUNDAR, S.; SINGH, A. What steps can be taken to counter the increasing failure of miltefosine to treat visceral leishmaniasis? **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 11, p. 117-119, fev. 2013.

TAVARES, S. R. D. C. et al. Influência da polaridade do solvente na extração de lapachol bruto. **BBR- Biochemistry And Biotechnology Reports. Edição Especial**. v. 2, p. 79-81, jun. 2013.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S. Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**. v. 28, nº. 6, p. 1030-1037, ago. 2005.

VIEIRA, A. A. et al. Hybrid compounds with two redox centres: Modular synthesis of chalcogen-containing lapachones and studies on their antitumor activity. **European Journal Medicinal Chemistry**. v. 101, p. 254-265, jun. 2015.

WEI, P. et al. New potential inhibitors of DNA topoisomerase. Part II: Design and synthesis of α -lapachone derivatives under microwave irradiation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, p. 828-830, fev. 2009.

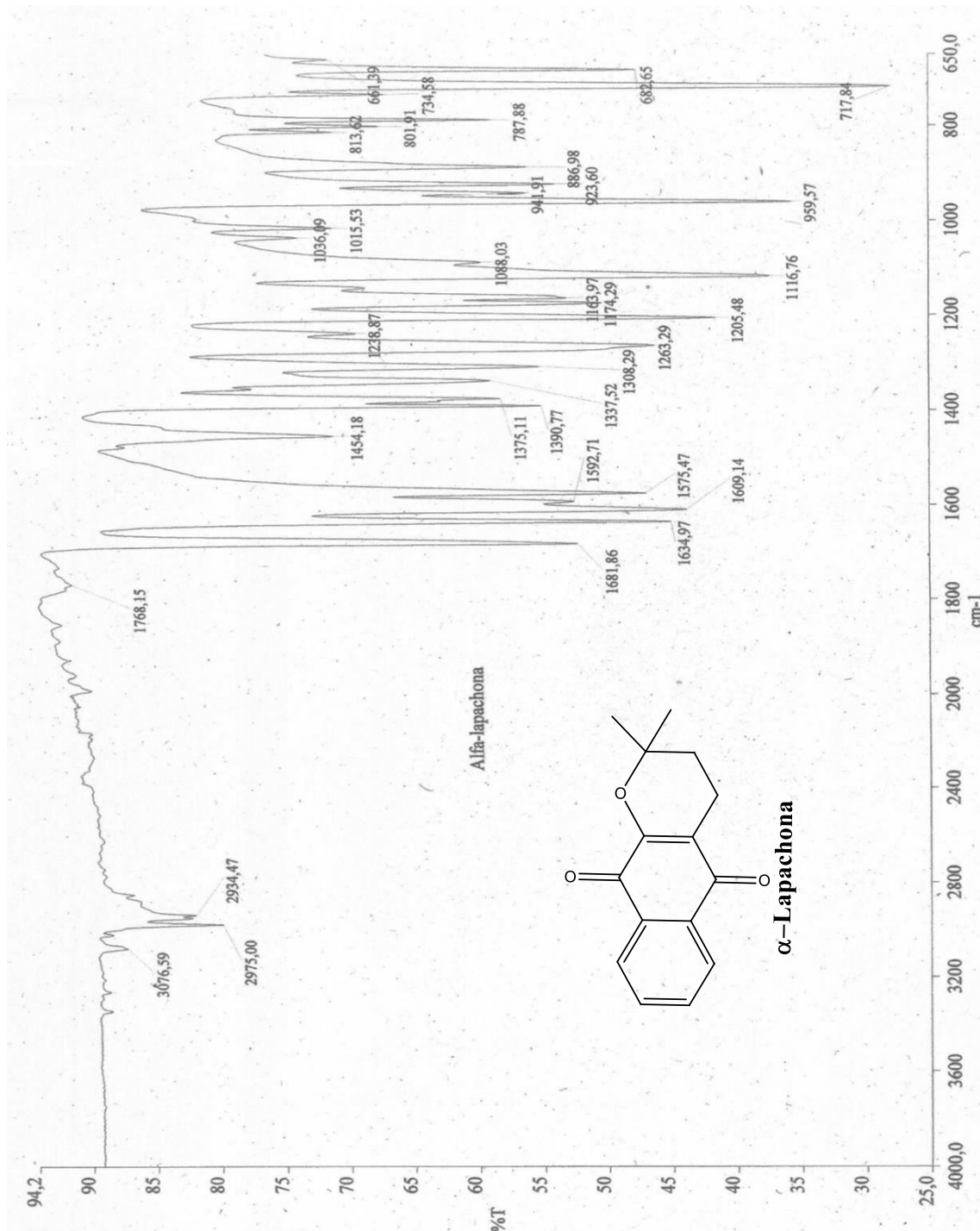
WINK, M.; ASHOUR, M. L.; EL-READI, M. Z. Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agentes. **Frontiers in Microbiology**. v. 3, p. 1-15, abr. 2012.

World Health Organization, World Malaria Report 2015, Genebra: WHO, 2015.

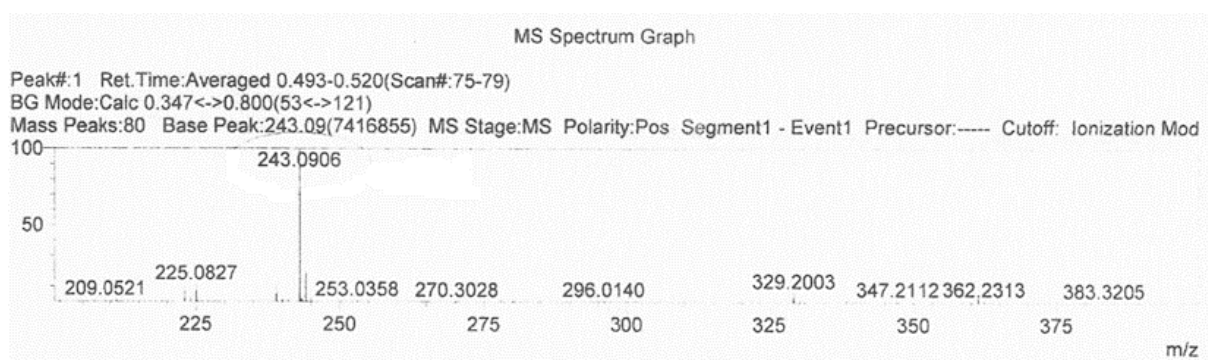
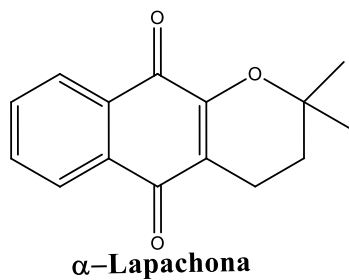
ANEXOS

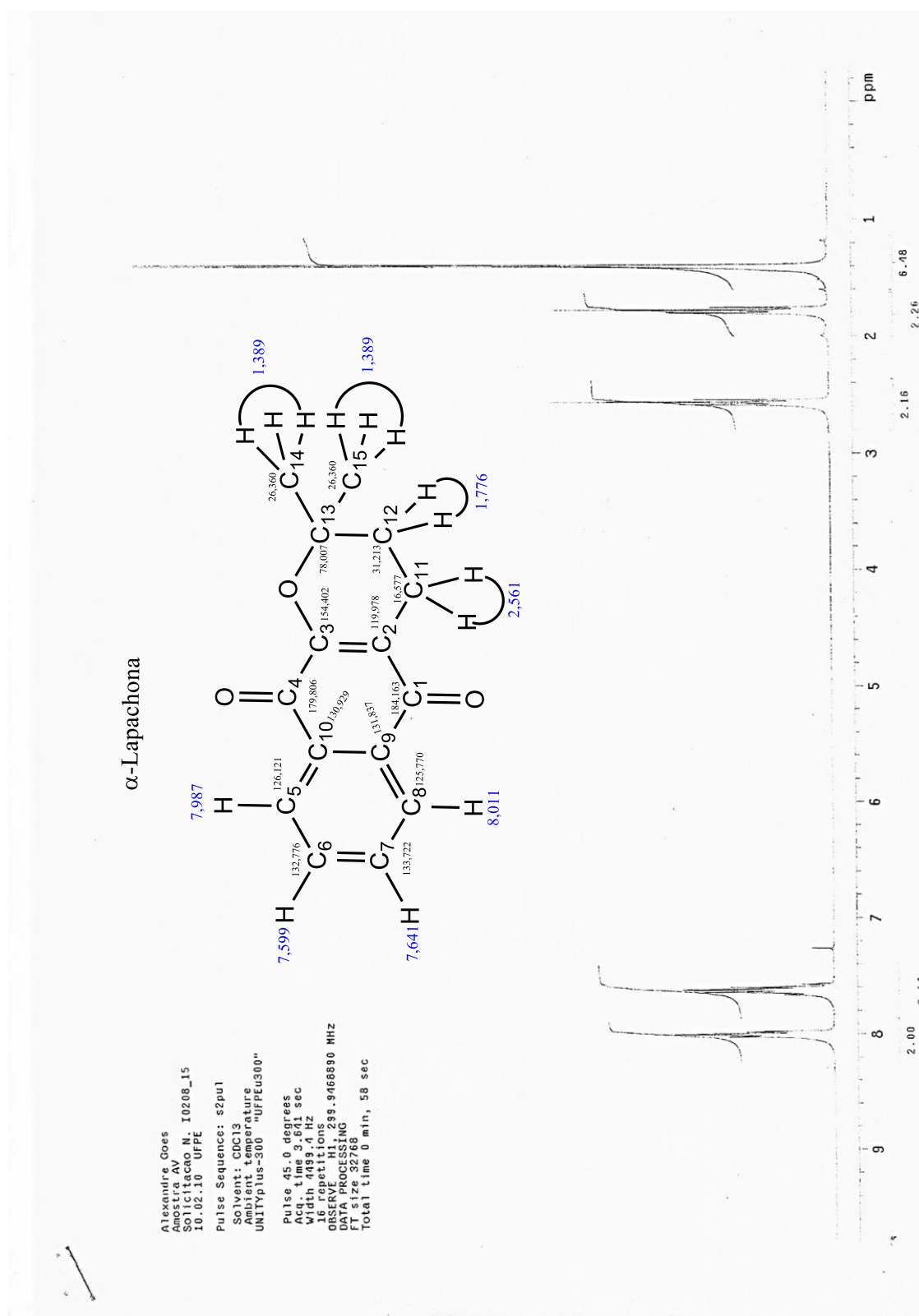
ANEXO A – ESPECTROS DA A-LAPACHONA

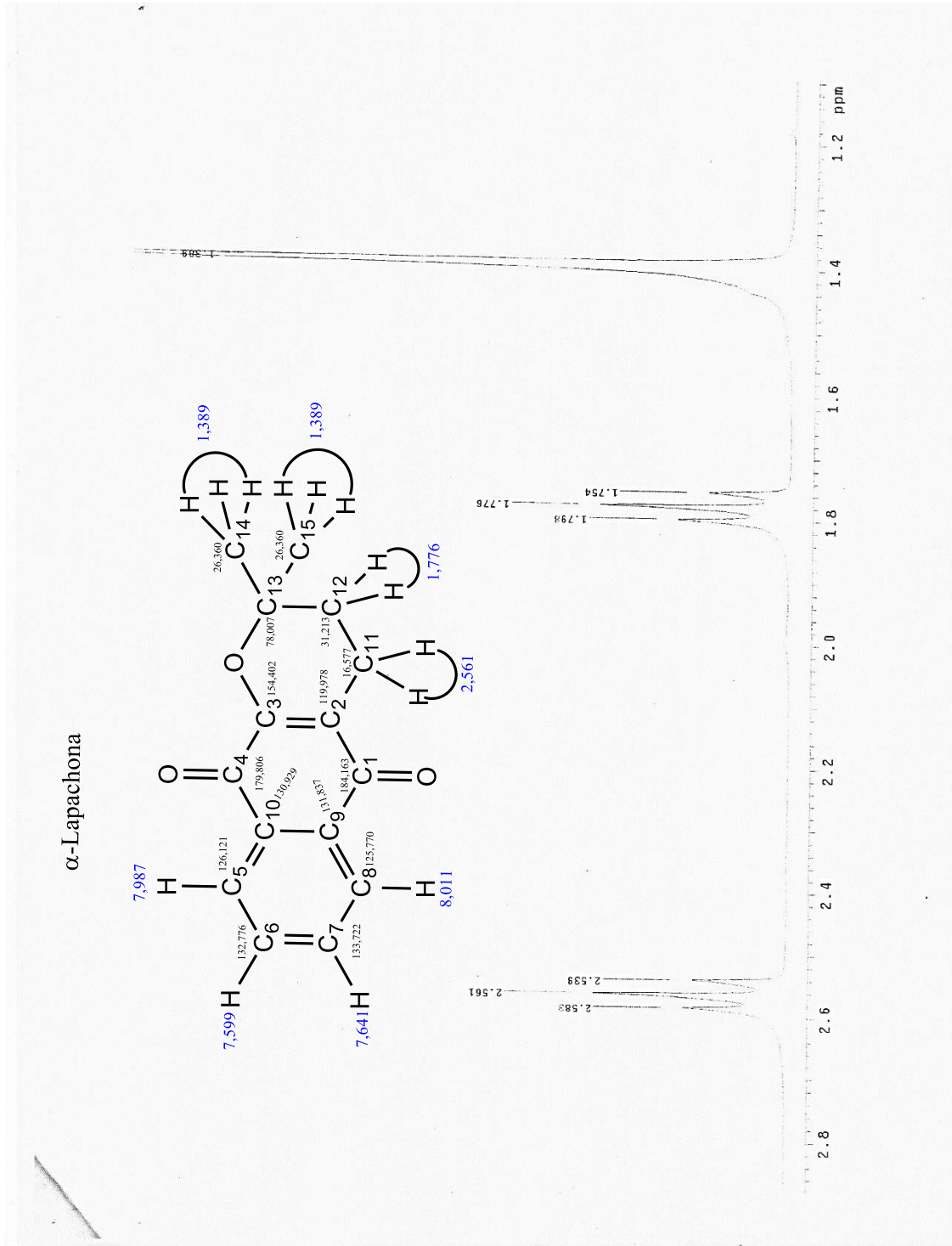
Espectrometria de Infravermelho (IV)



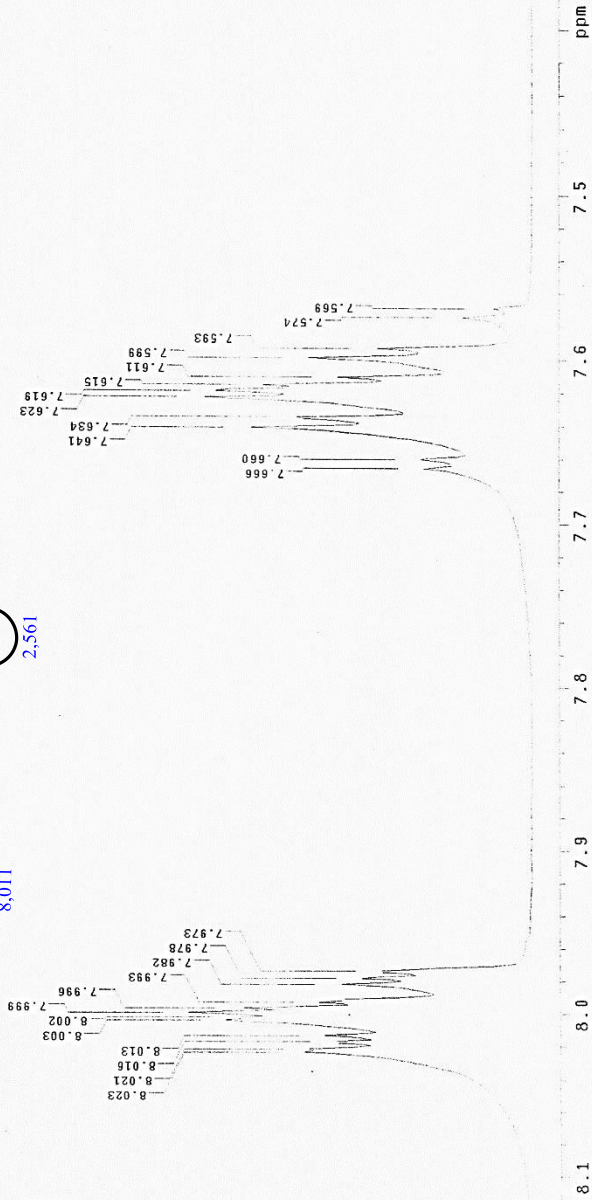
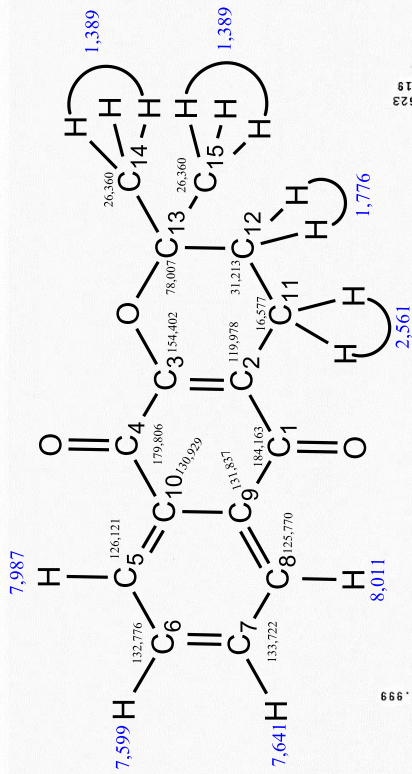
Espectrometria de massas em alta definição



Espectrometria de RMN ^1H , (300 MHz, CDCl_3)

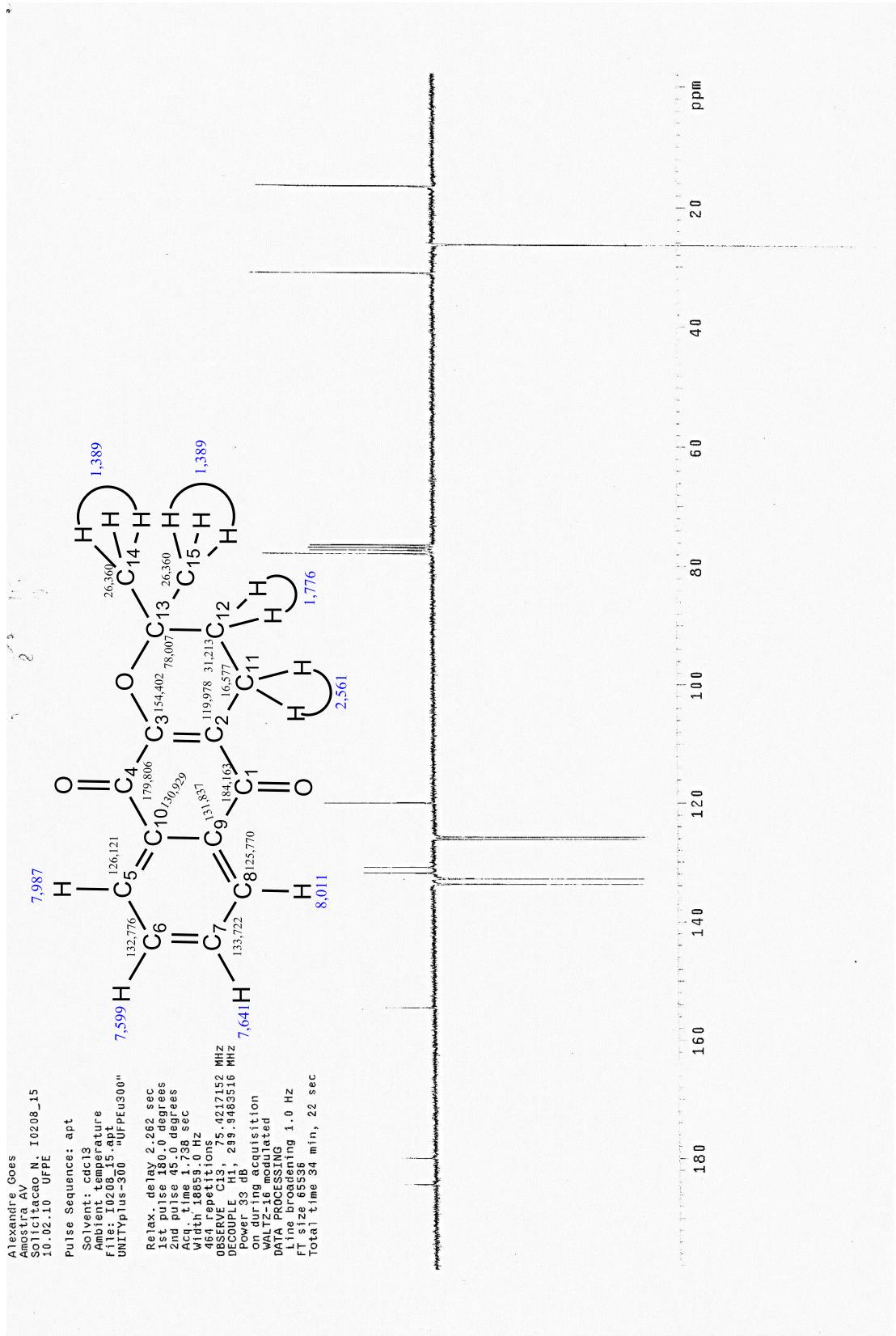


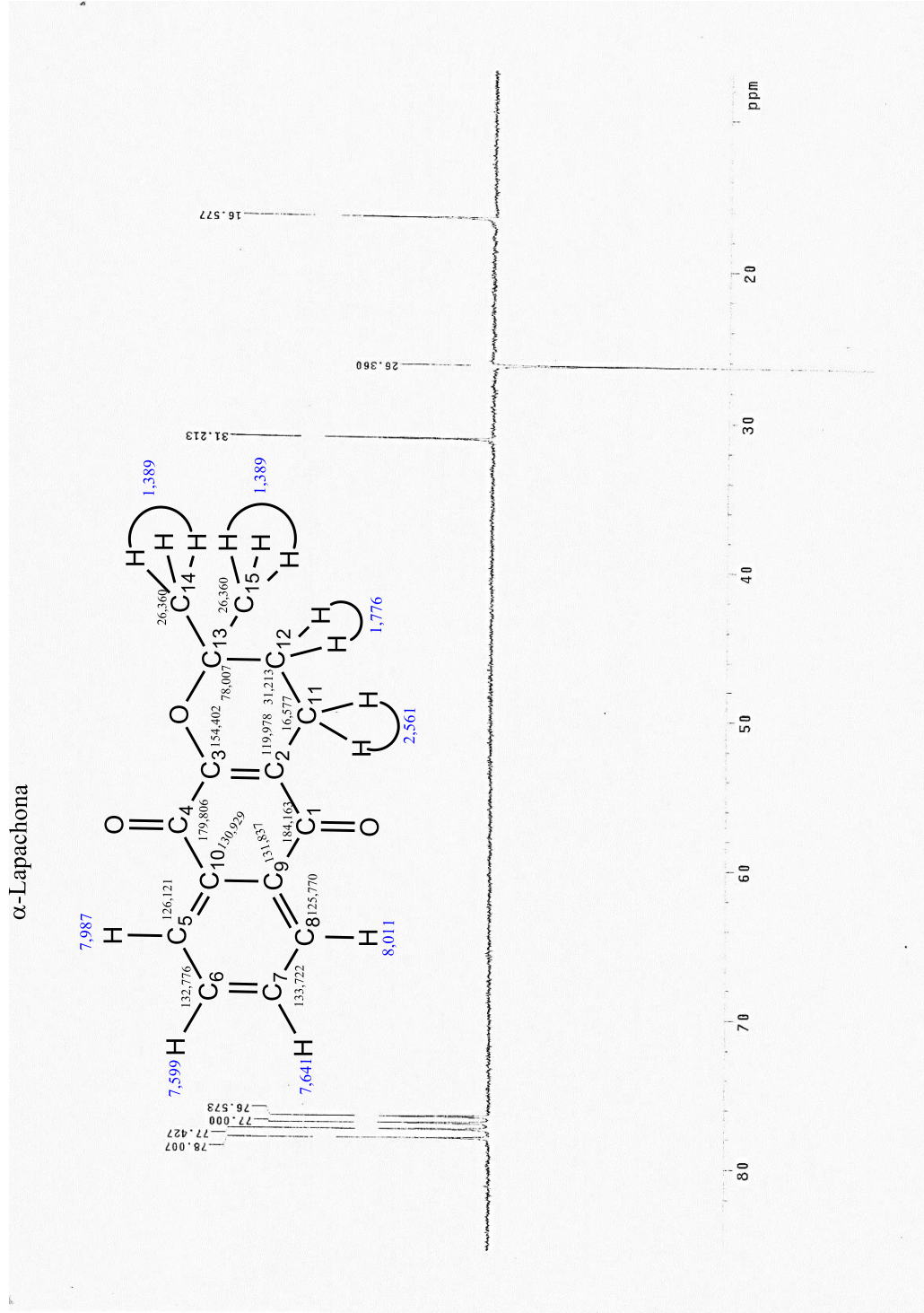
α -Lapachona



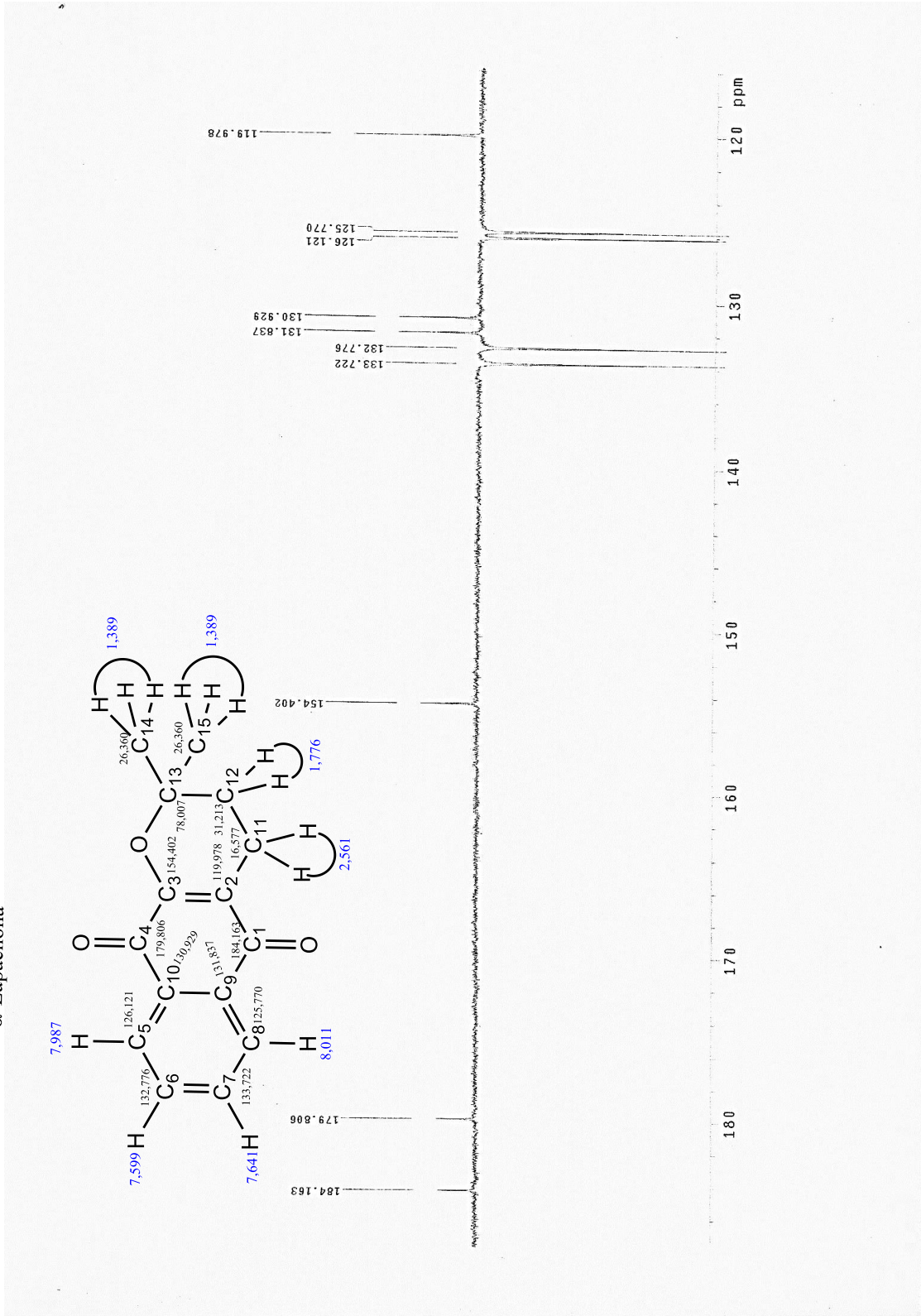
Espectrometria de RMN C¹³ (150 MHz, CDCl₃)

α-Lapachona



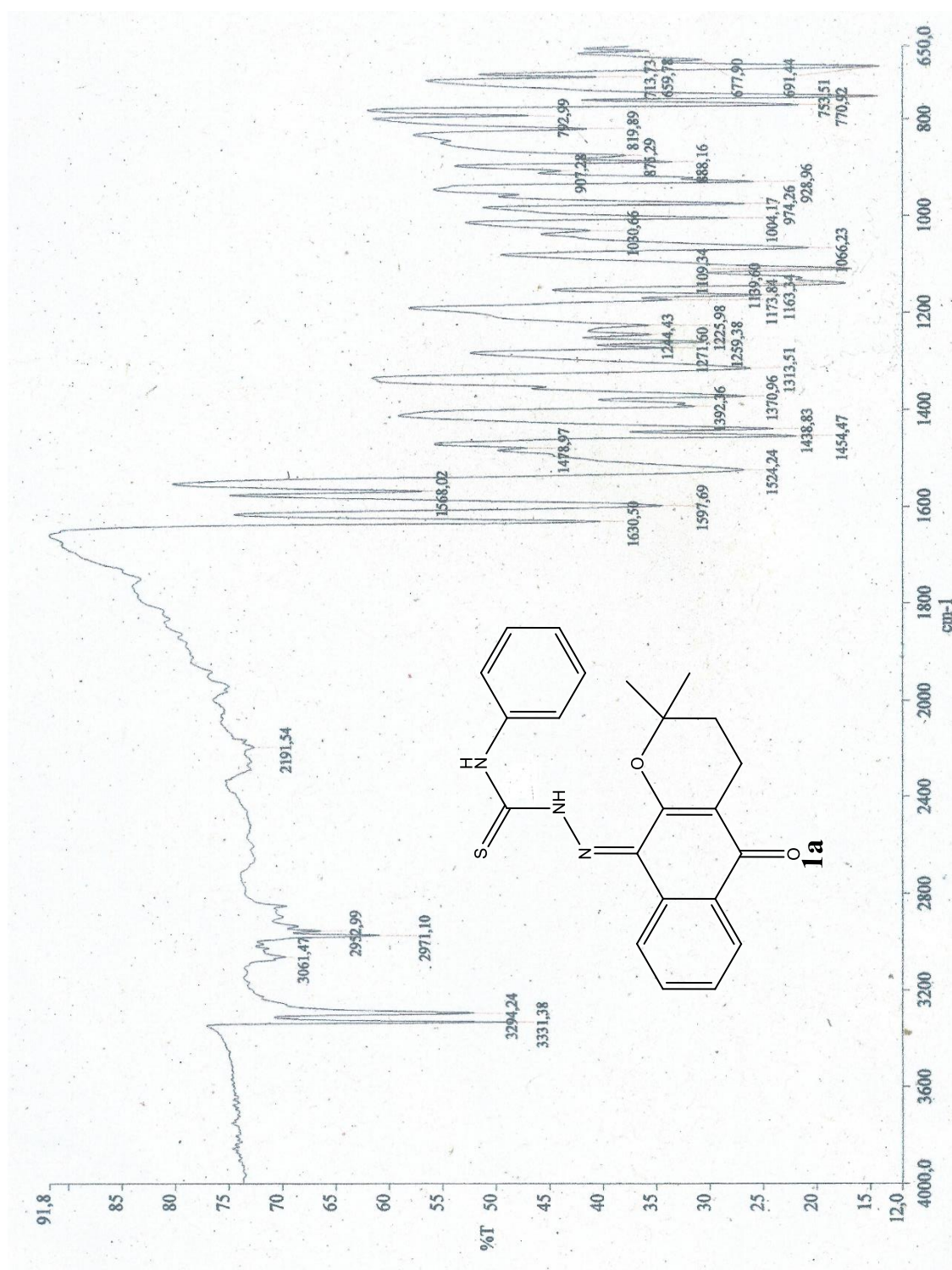


α -Lapachona

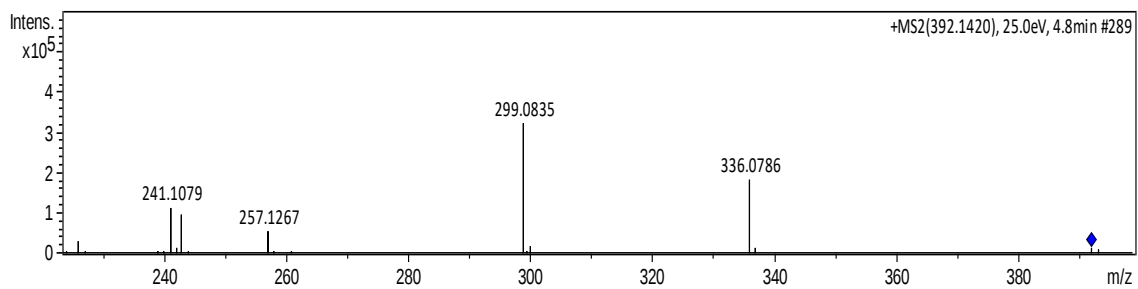
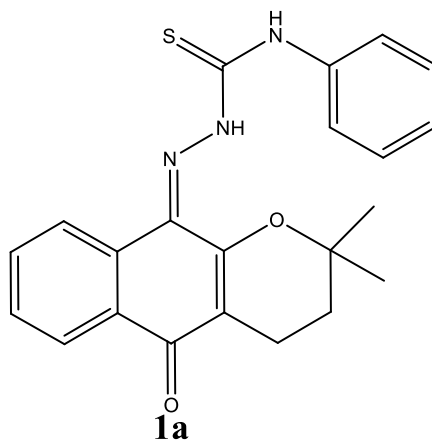


ANEXO B – ESPECTROS DO DERIVADO 1A: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIHIDRO-2H-BENZO[G]CROMEN-10(5H) - ILIDENO)-N-FENIL-HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA

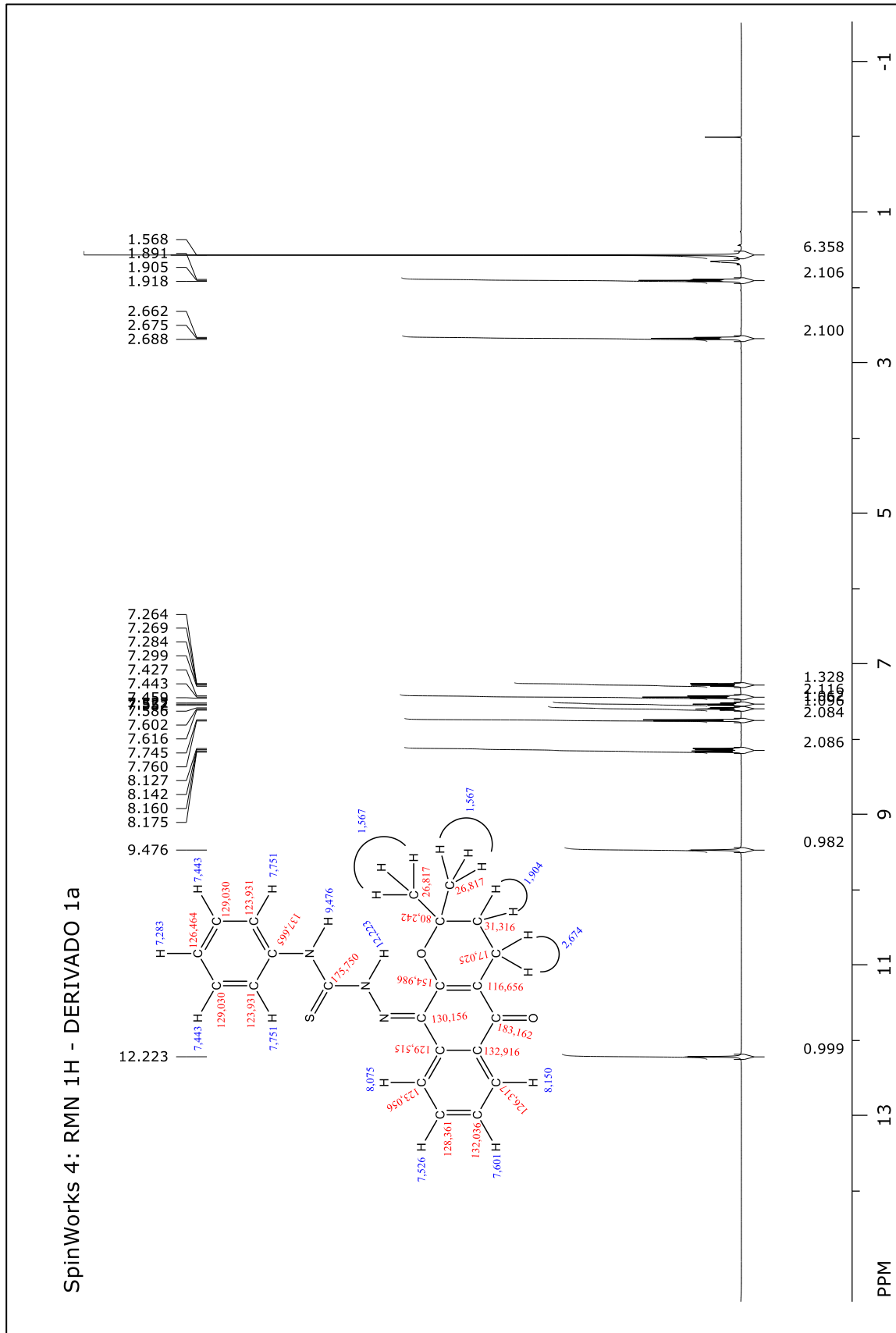
Espectrometria de Infravermelho (IV)



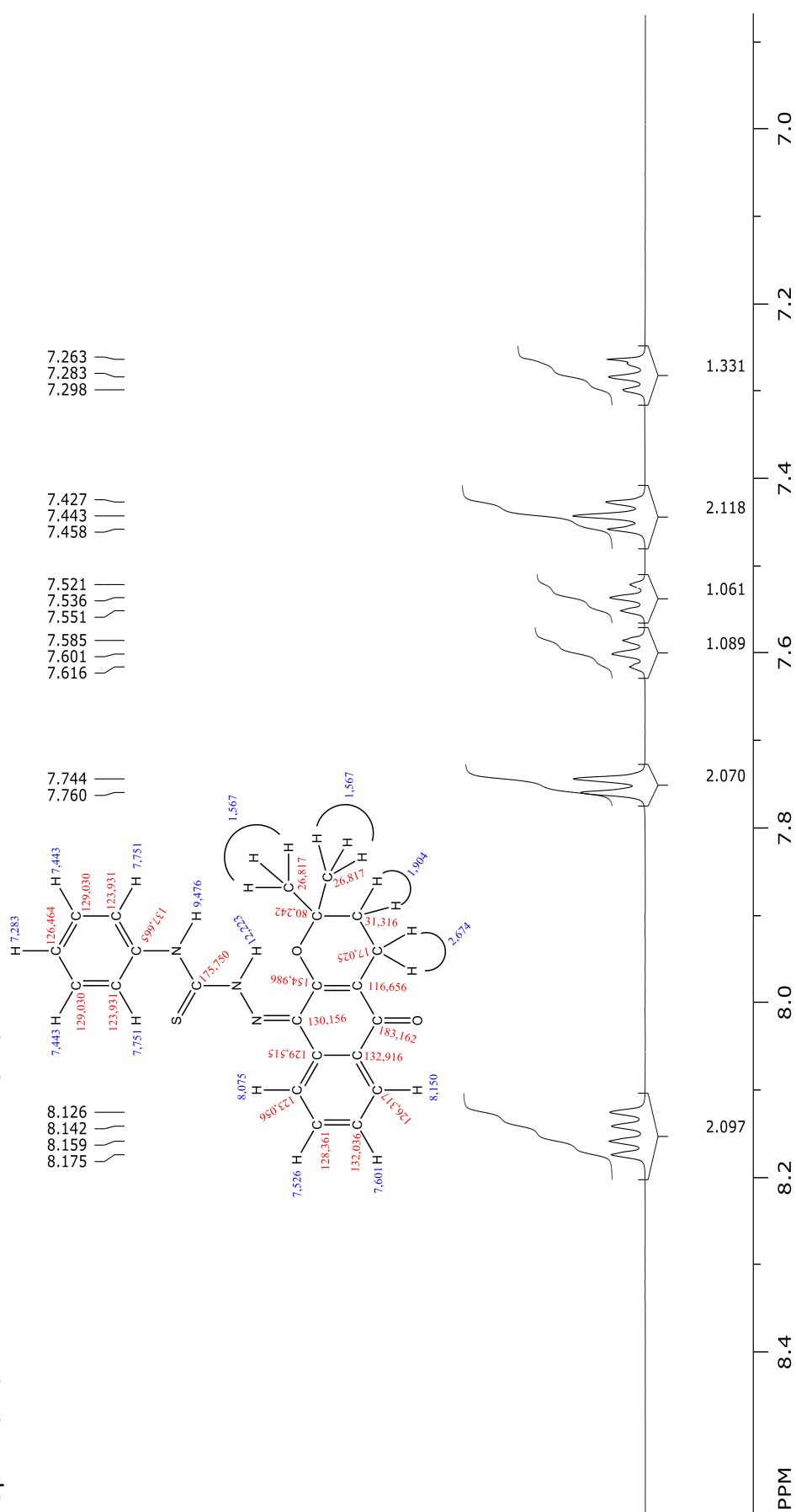
Espectrometria de massas de Alta definição

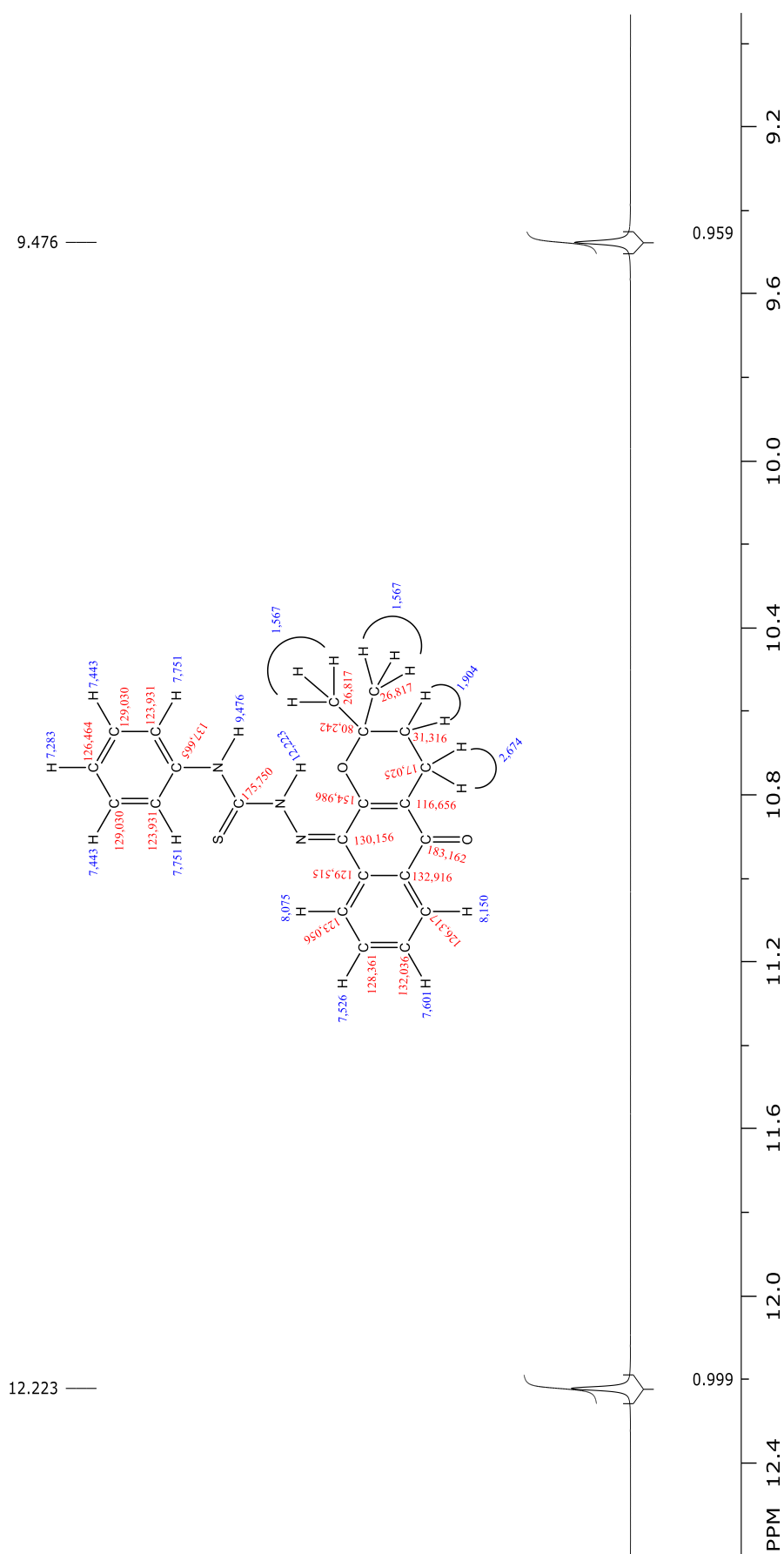


Espectrometria de RMN ¹H

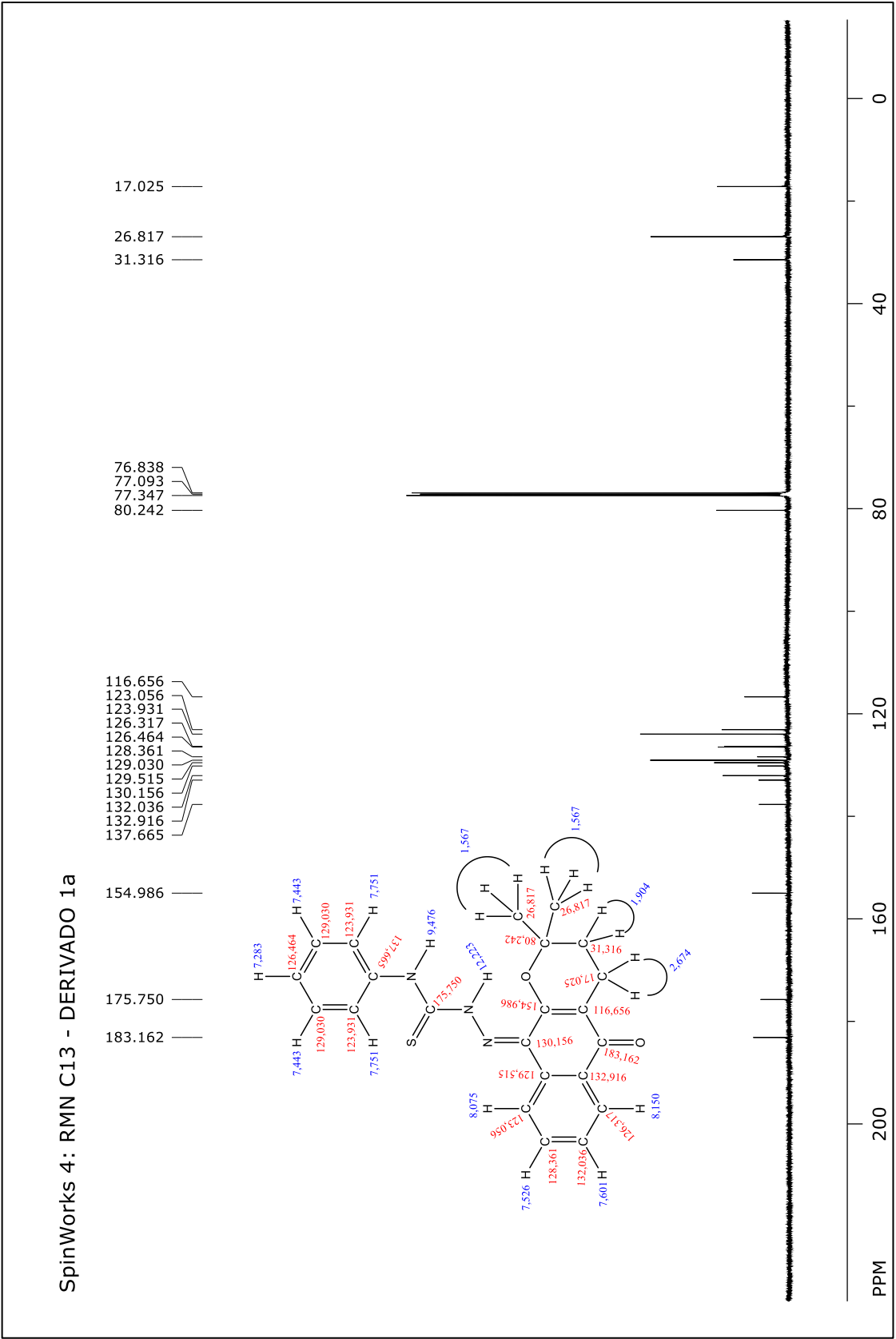


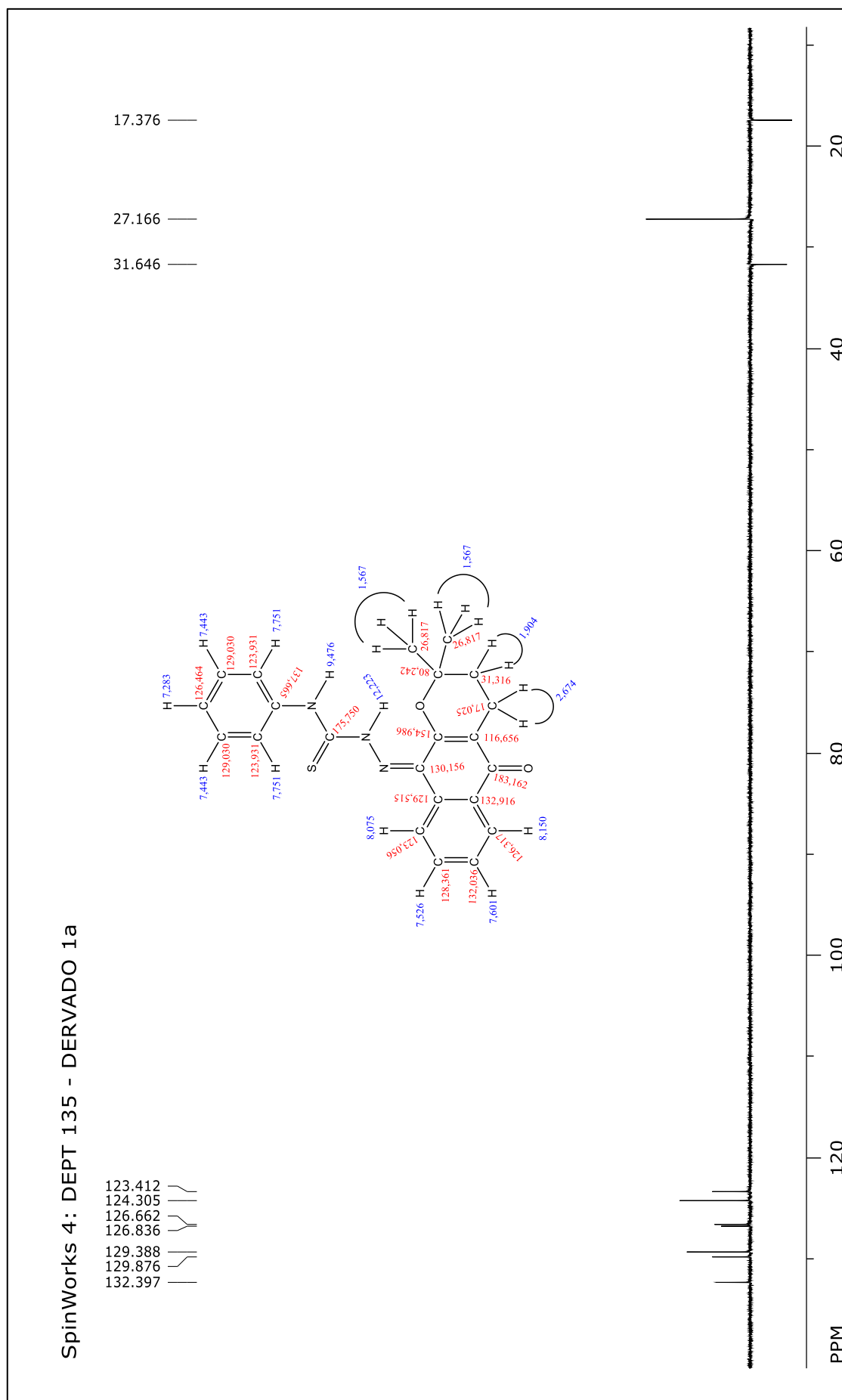
SpinWorks 4: RMN H1 - DERIVADO 1a





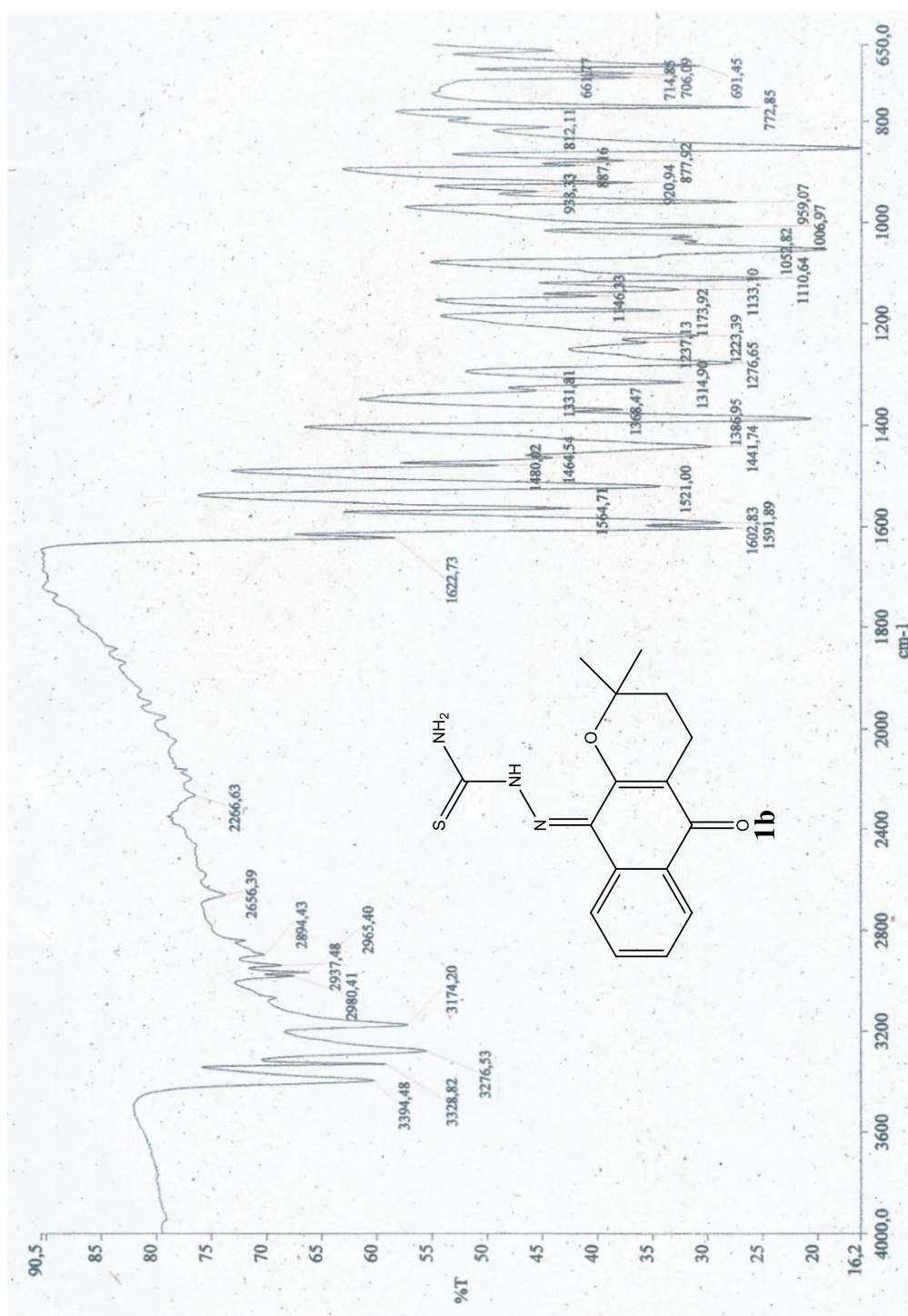
Espectrometria de RMN C¹³



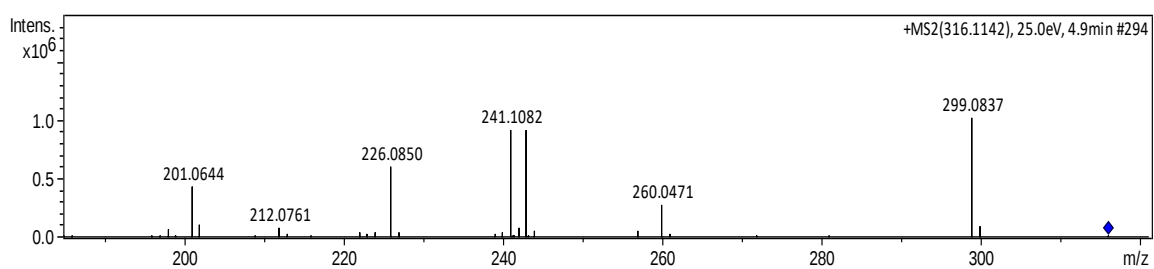
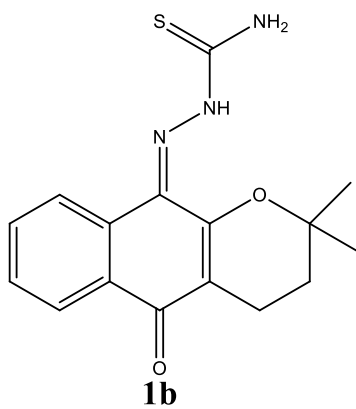


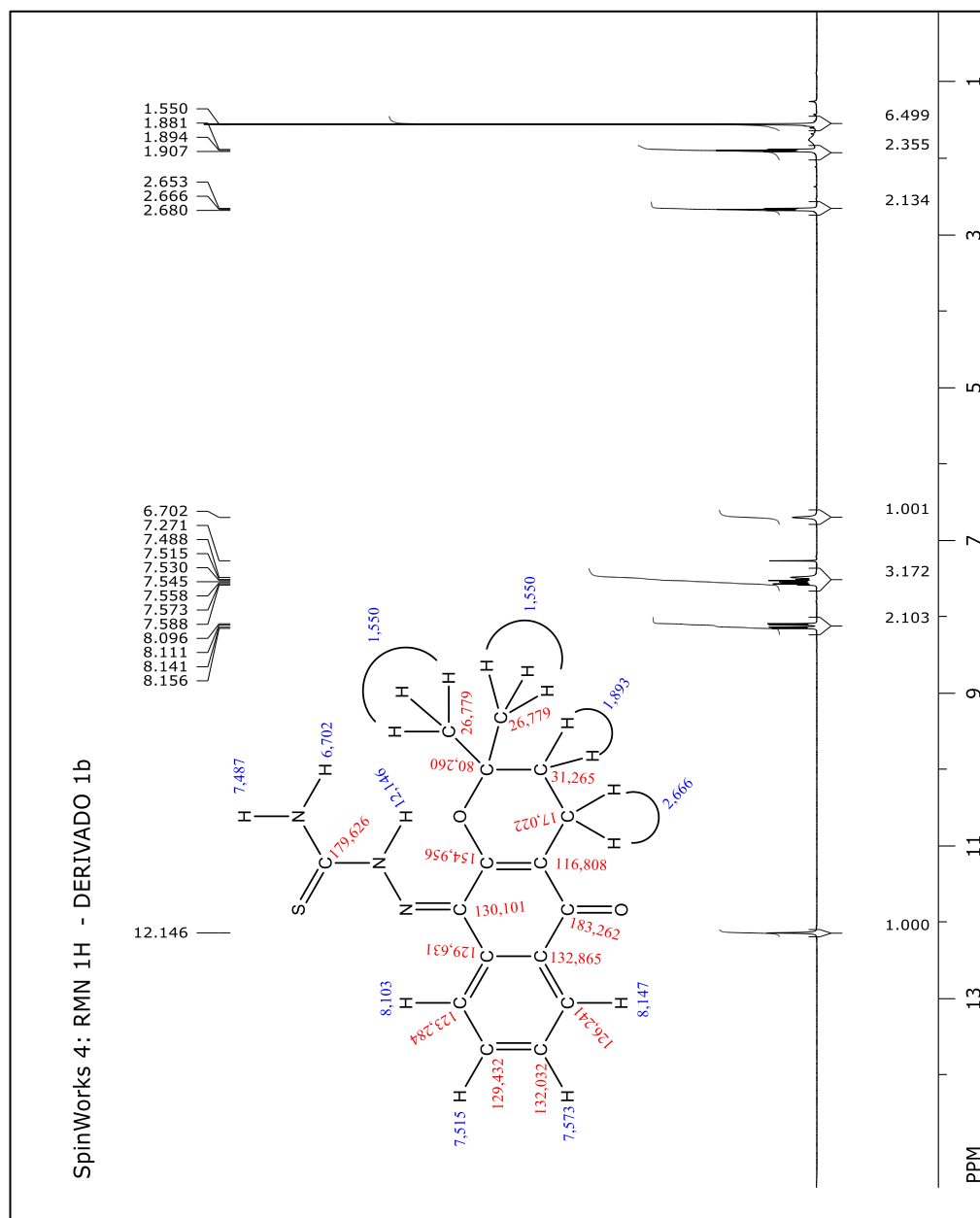
ANEXO C – ESPECTROS DO DERIVADO 1B: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO - 2HBENZO[G]CROMEN - 10(5H) - ILIDENO)HIDRAZINA - CARBOTIOAMIDA

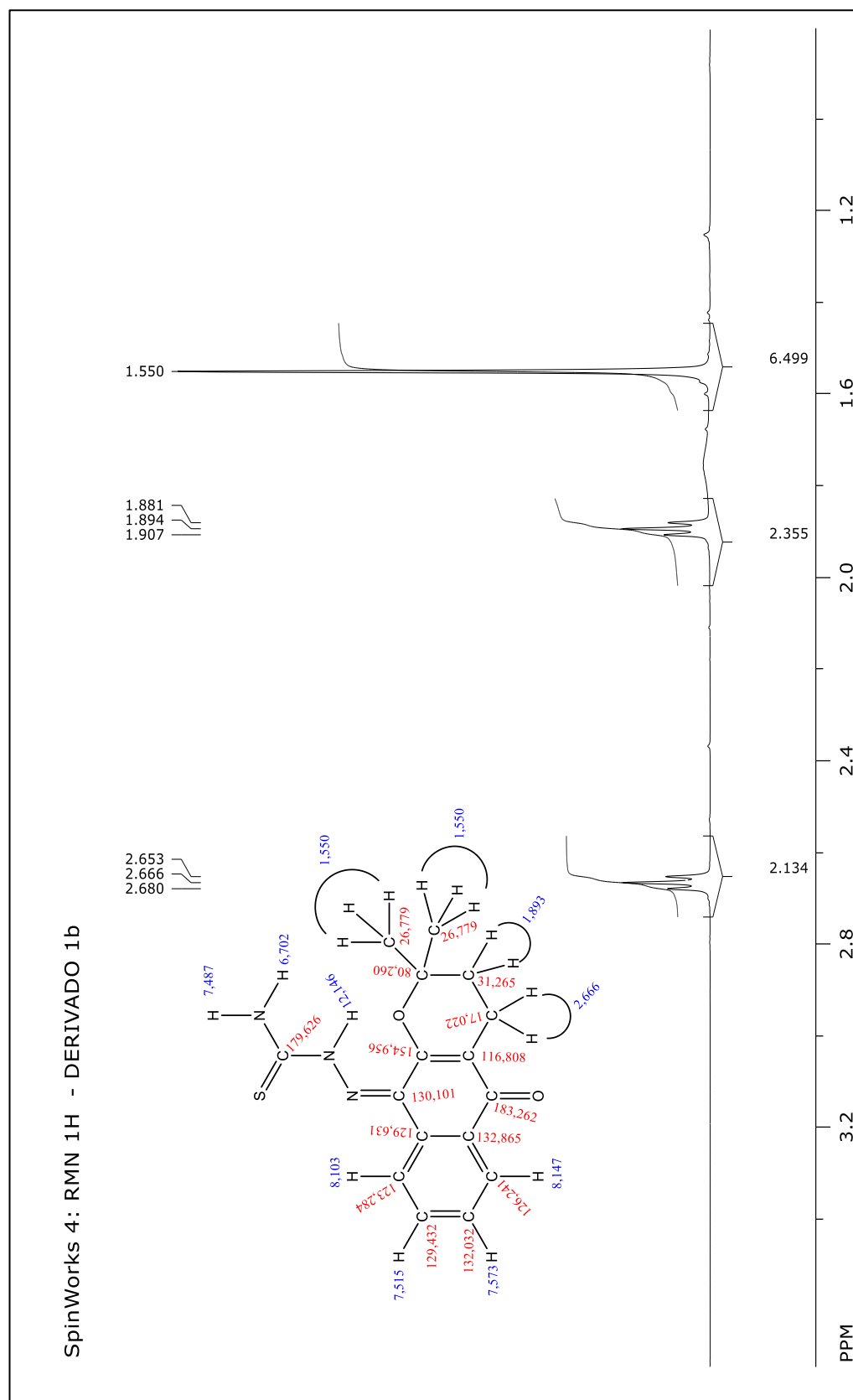
Espectrometria de Infravermelho (IV)

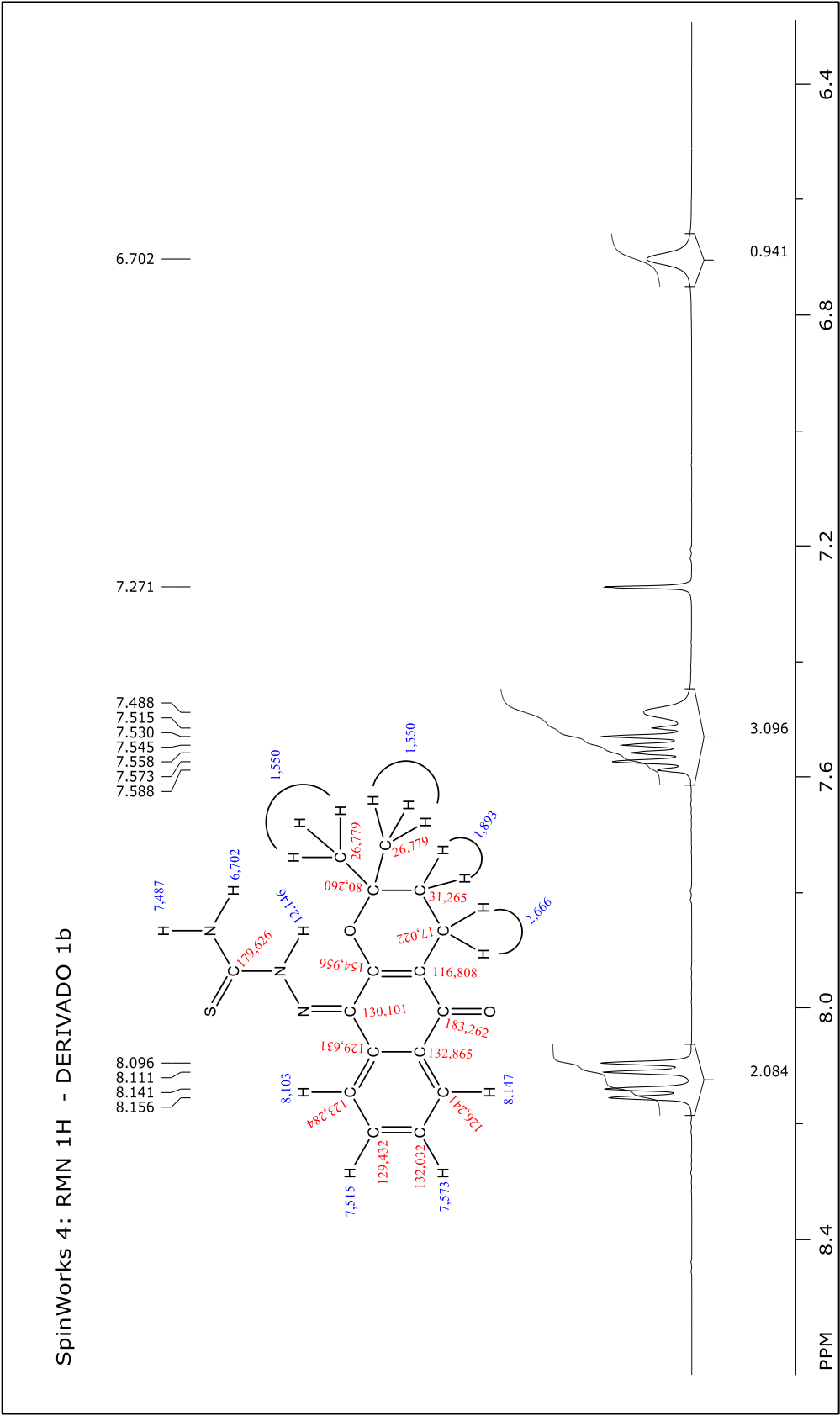


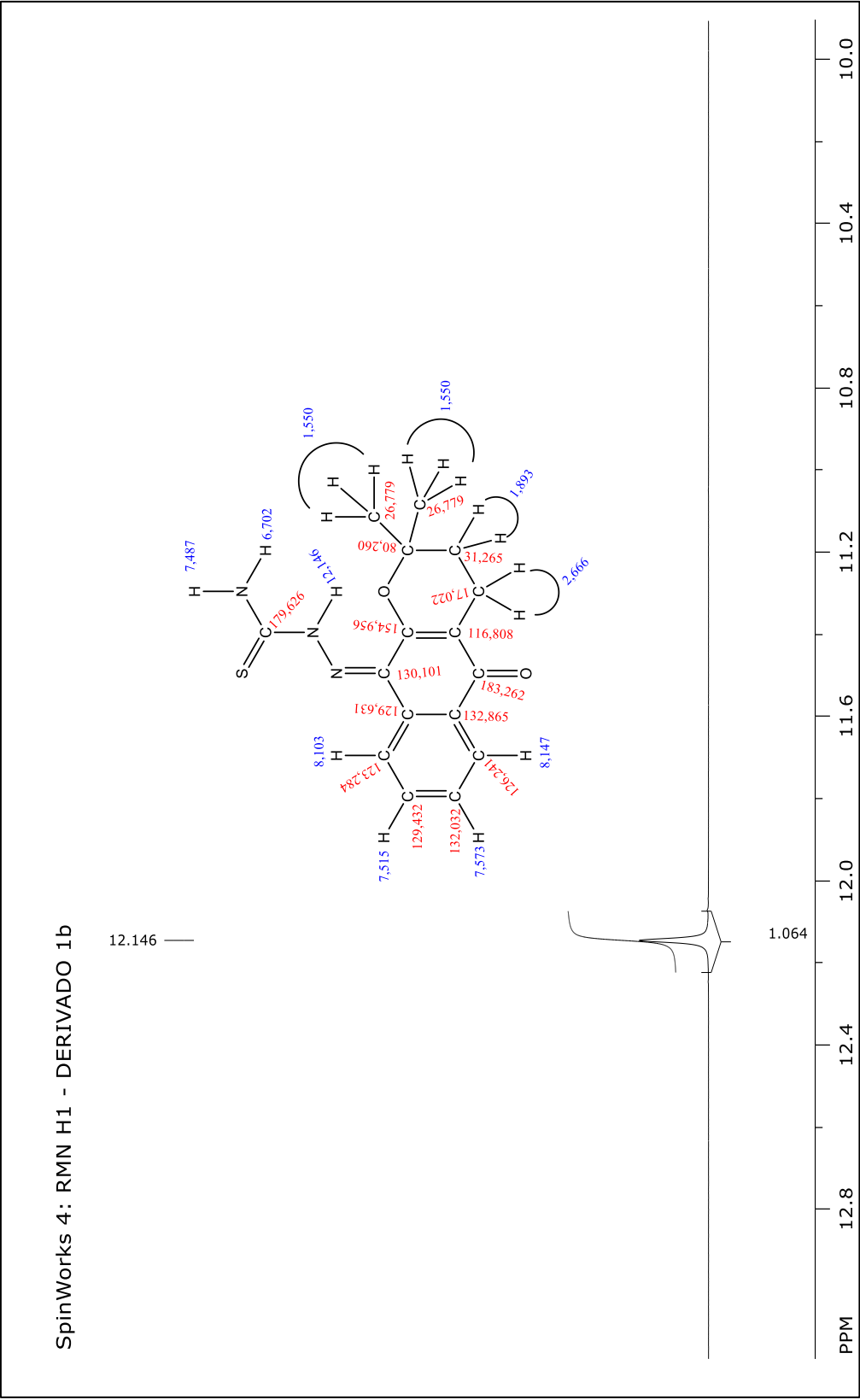
Espectrometria de massas de Alta definição



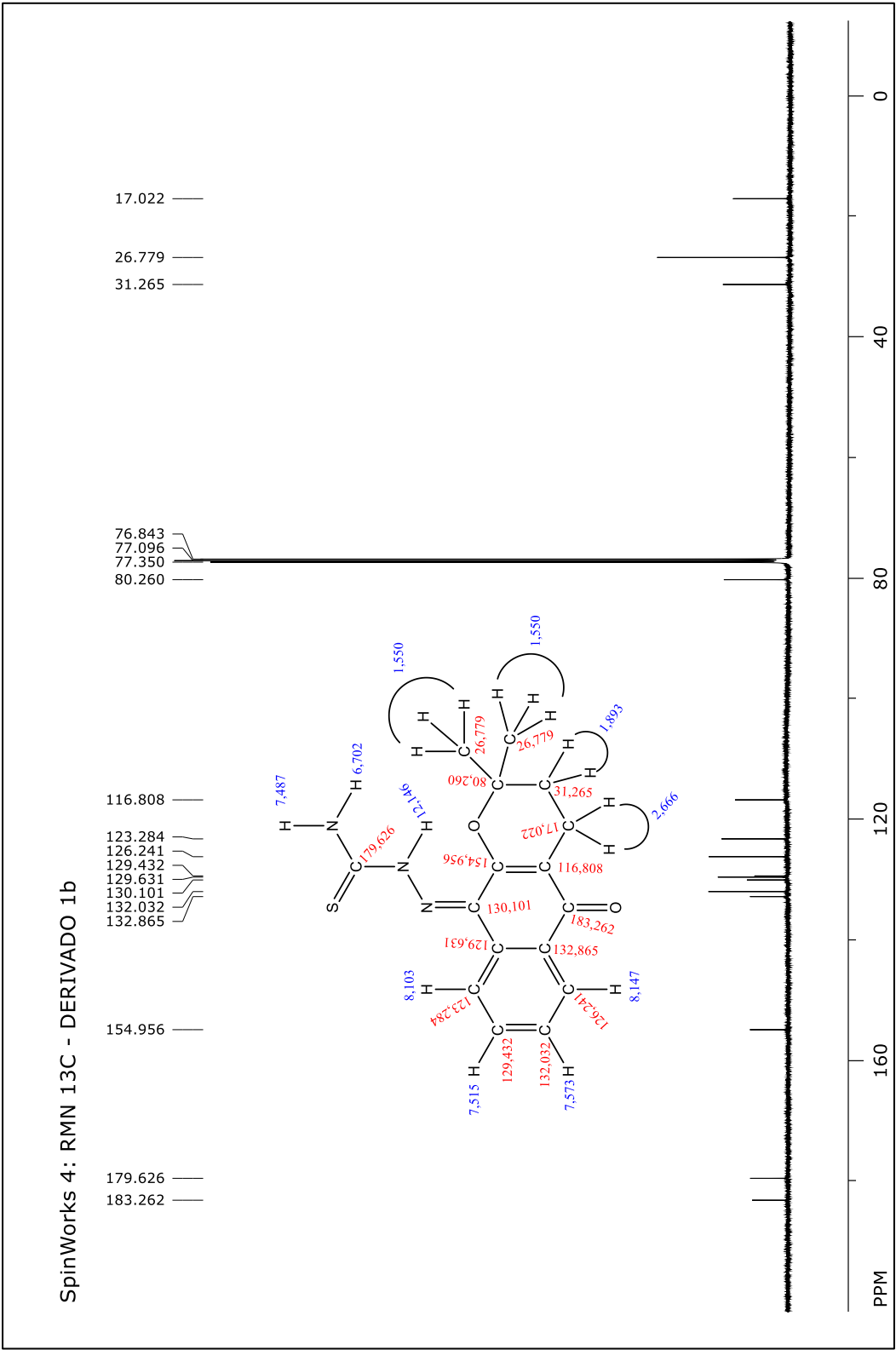




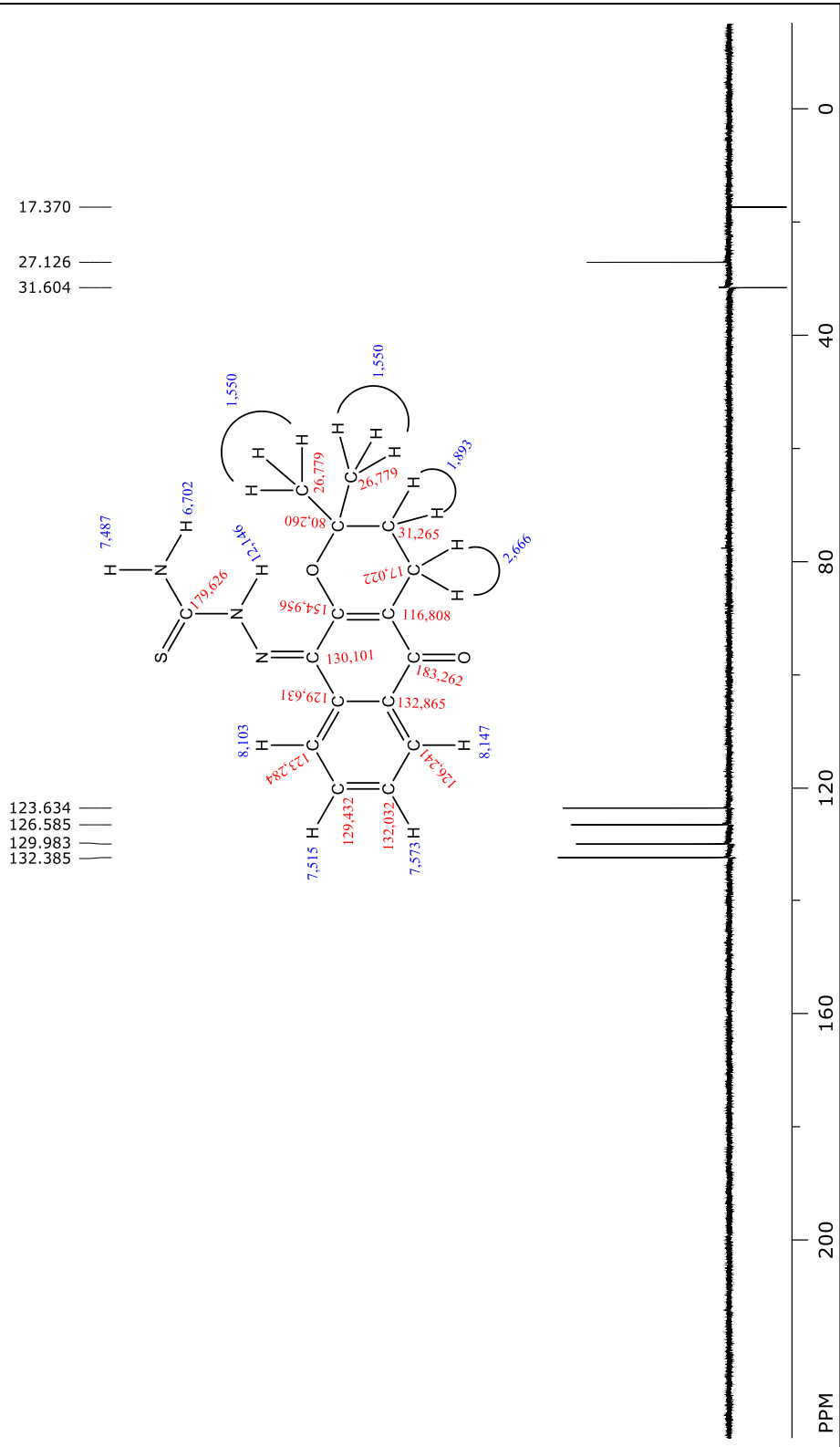




Espectrometria de RMN ¹³C

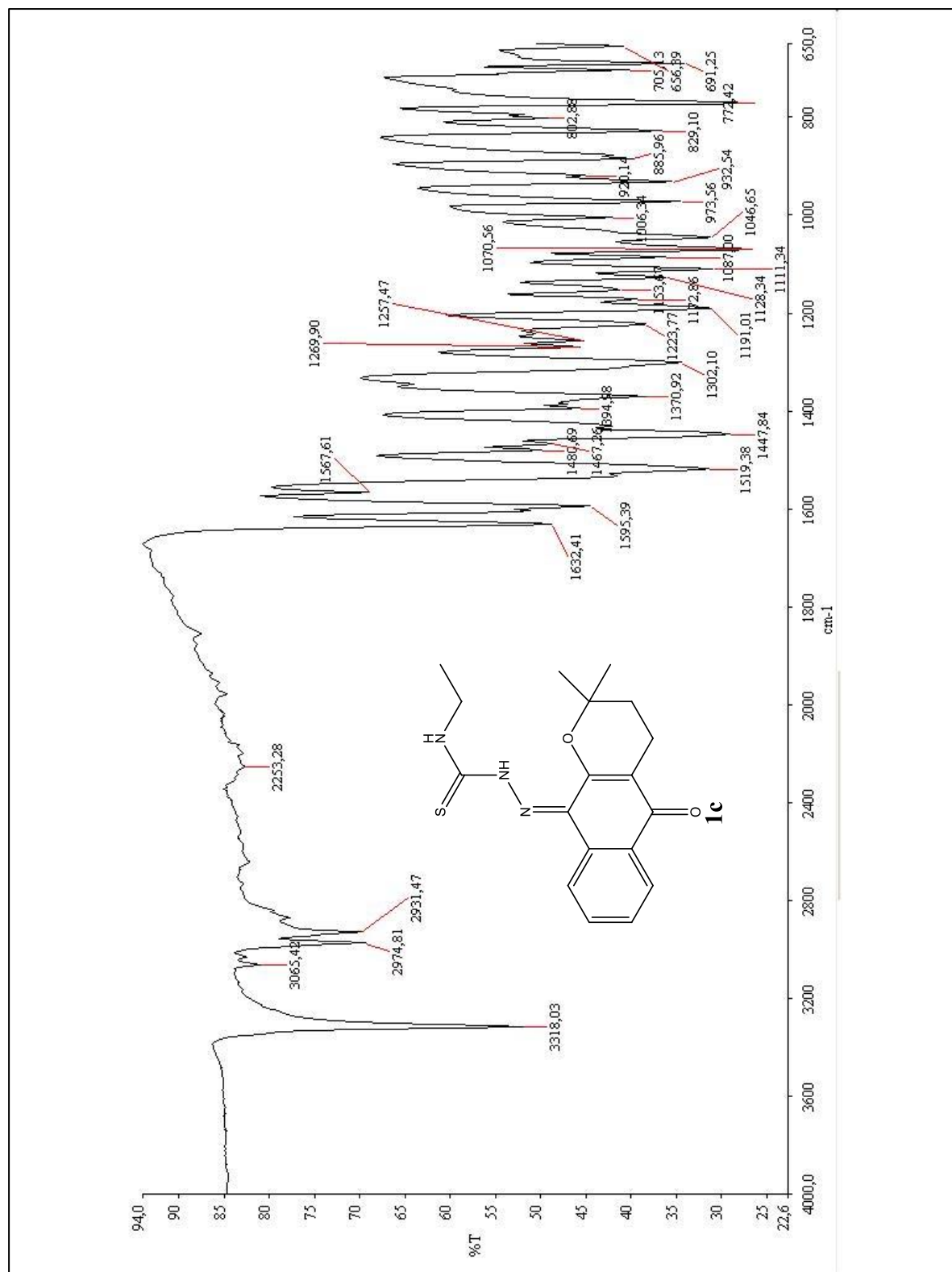


SpinWorks 4: DEPT 135 - DERIVADO 1b

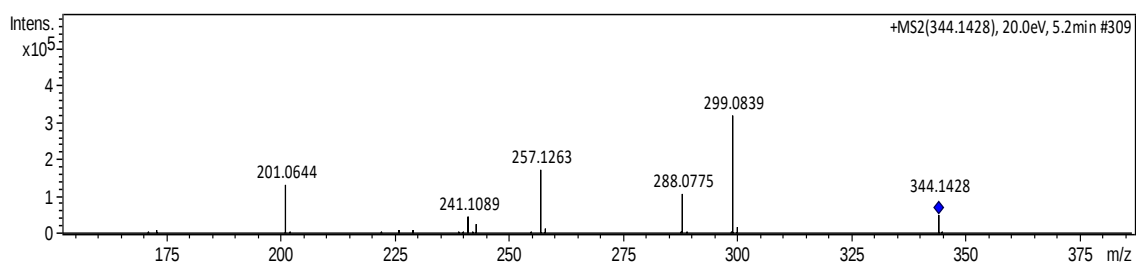
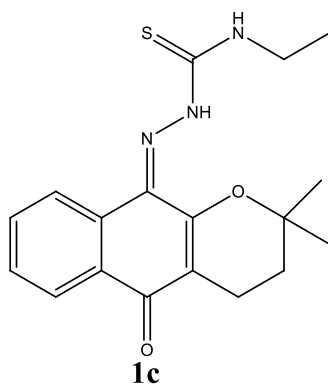


ANEXO D – ESPECTROS DO DERIVADO 1C: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO- 2H-BENZO[G]CHROMEN - 10(5H) - ILIDENO) – N – ETIL – HIDRAZINA - CARBOTIOAMIDA

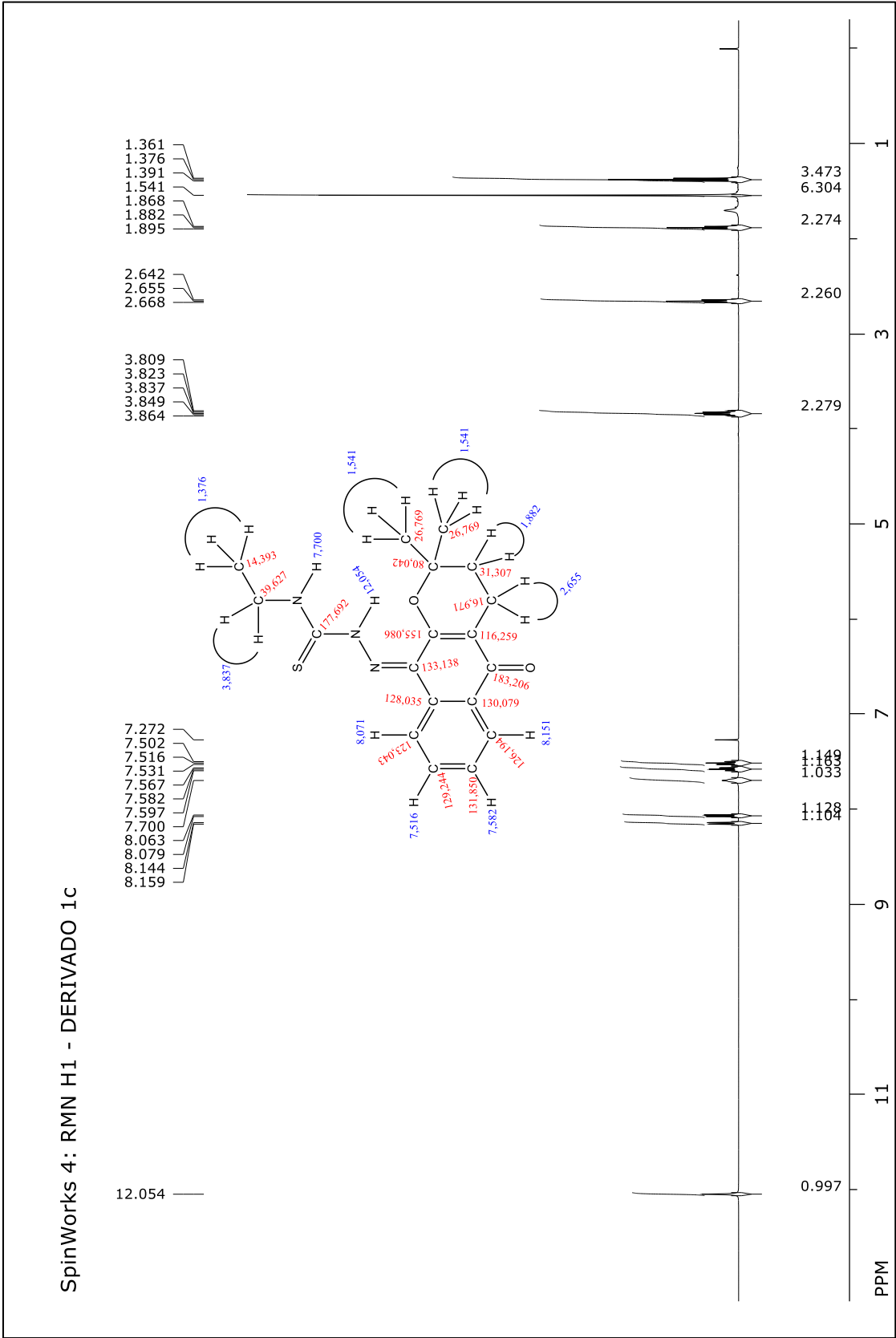
Espectrometria de Infravermelho (IV)

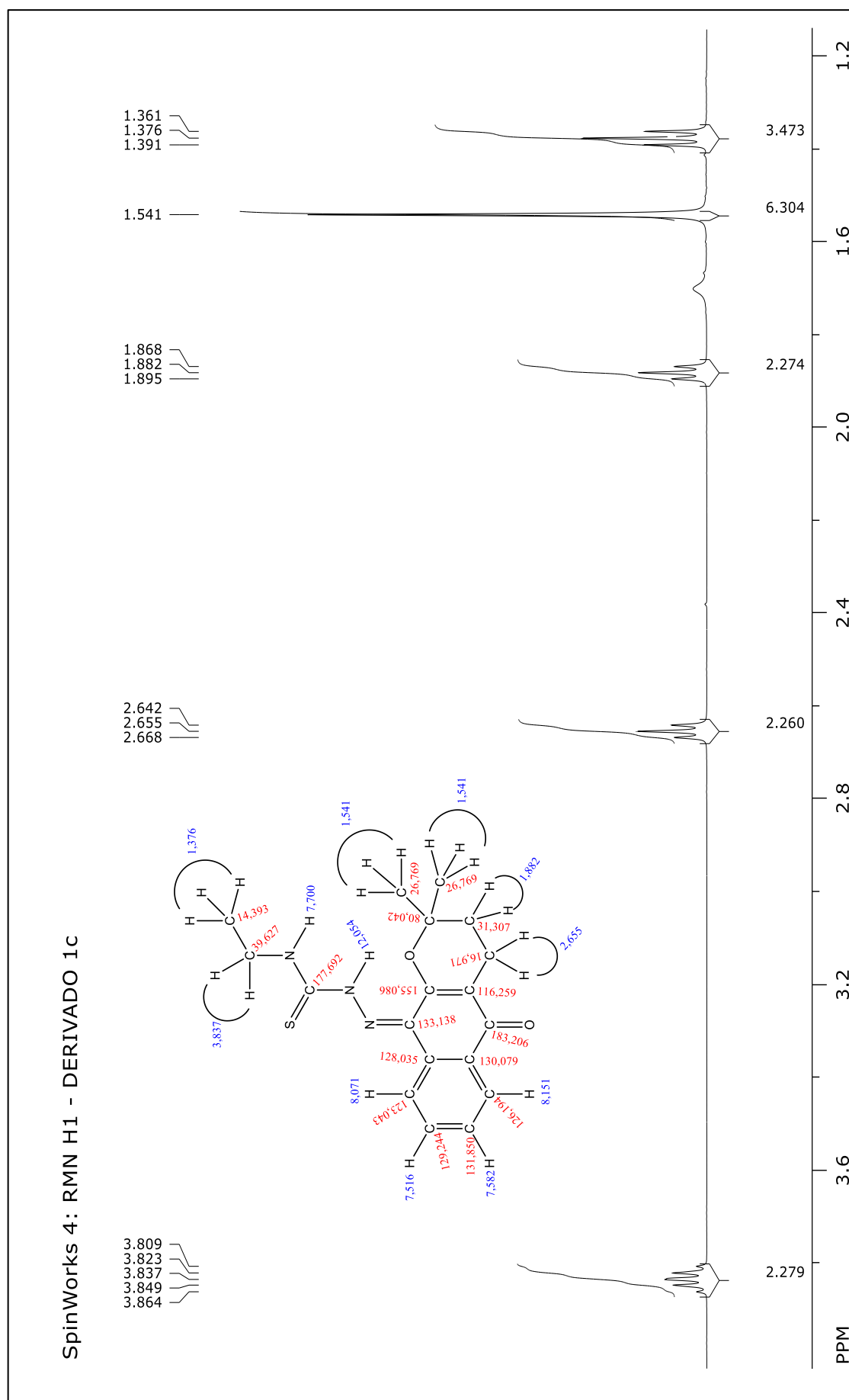


Espectrometria de massas de Alta definição

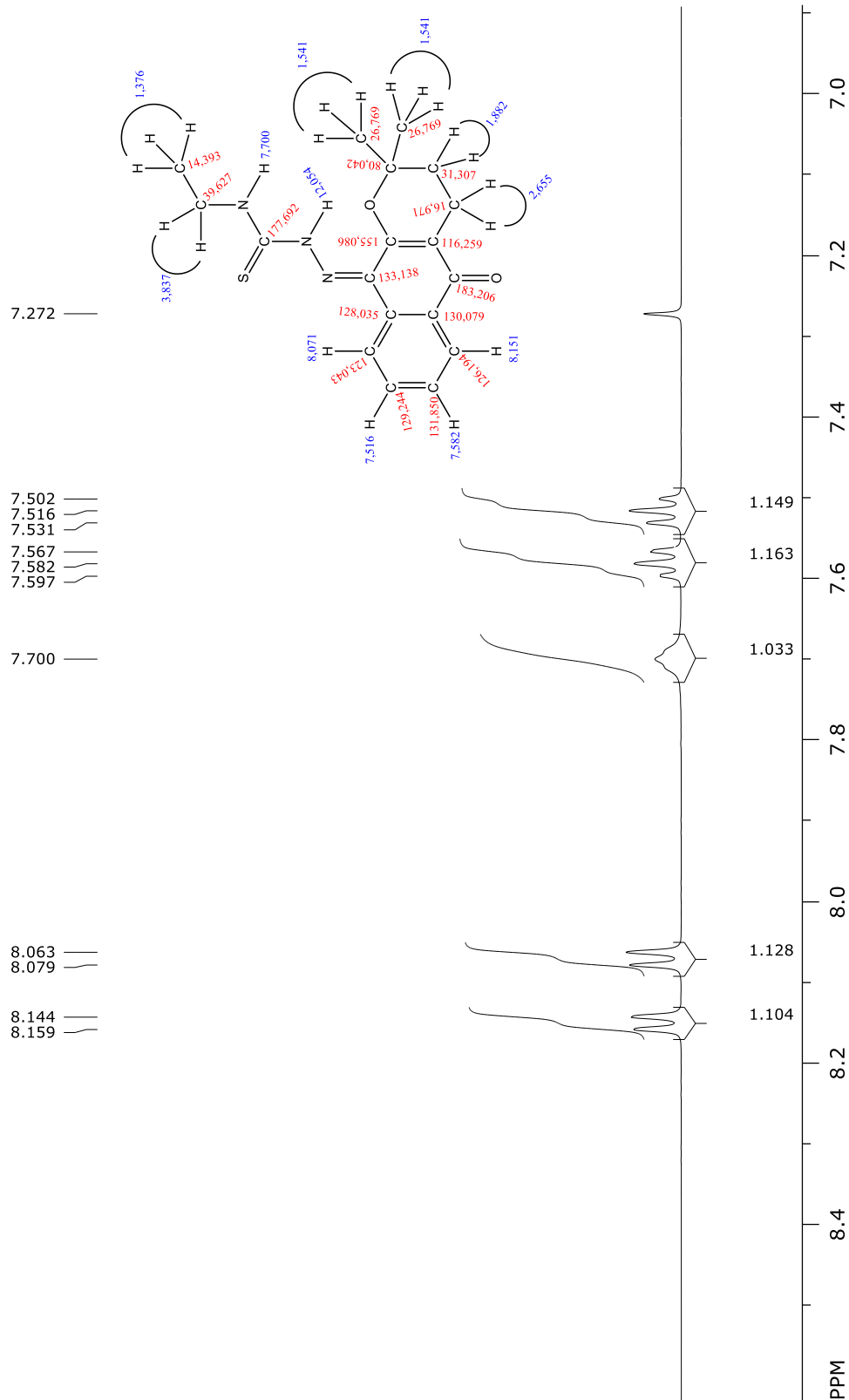


Espectrometria de RMN ¹H

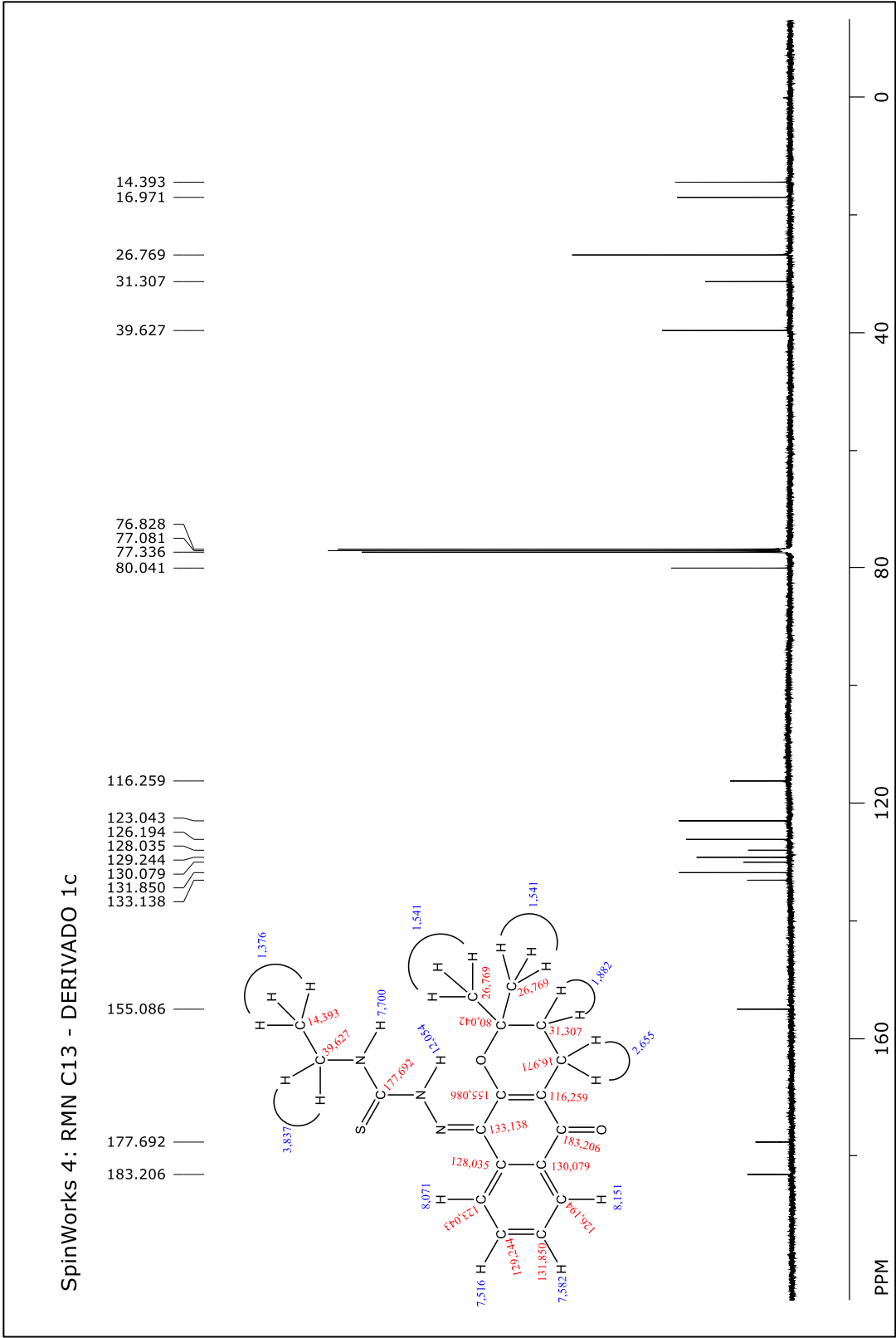




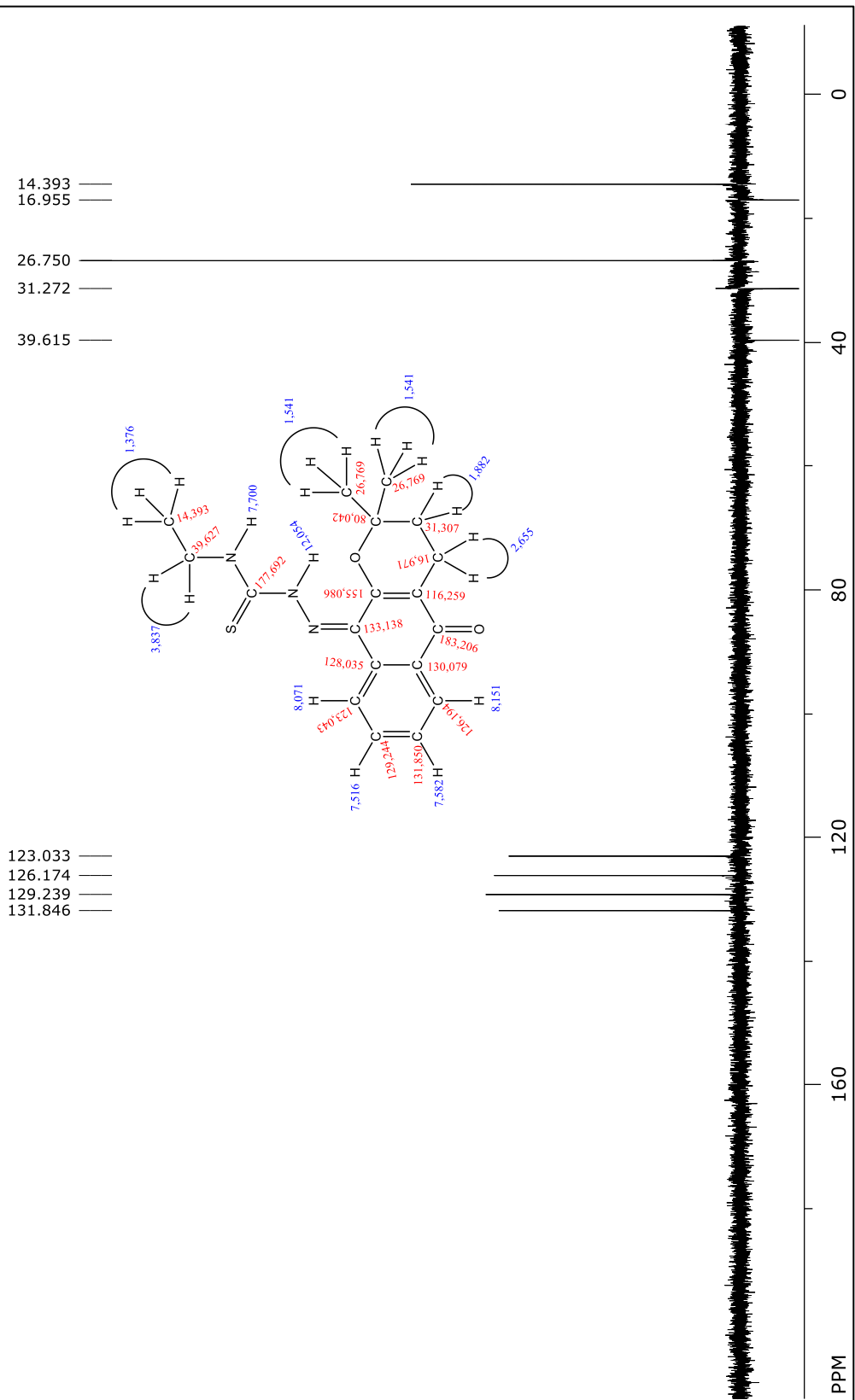
SpinWorks 4: RMN H1 - DERIVADO 1c



Espectrometria de RMN C¹³

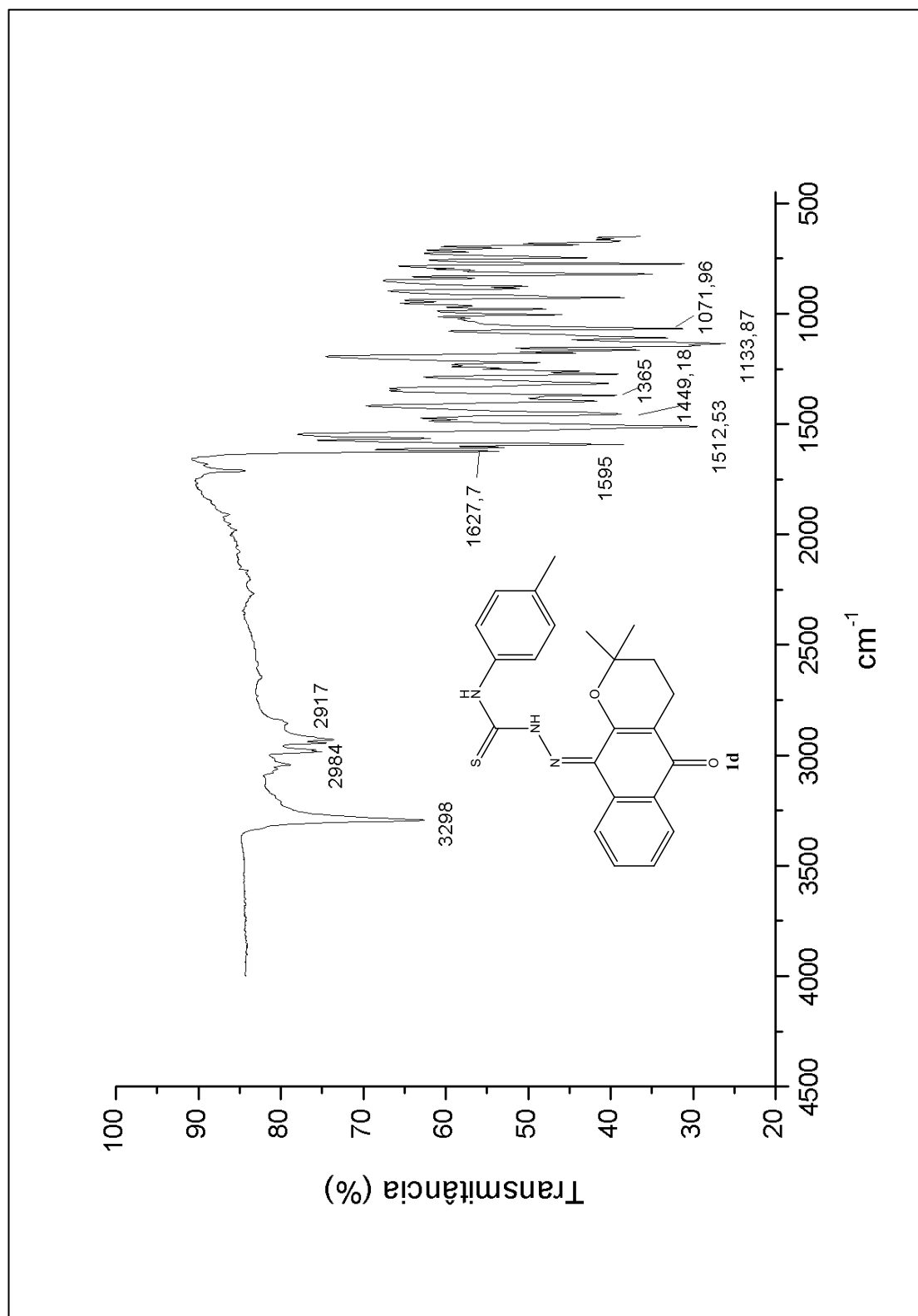


SpinWorks 4: DEPT 135 -DERIVADO 1c

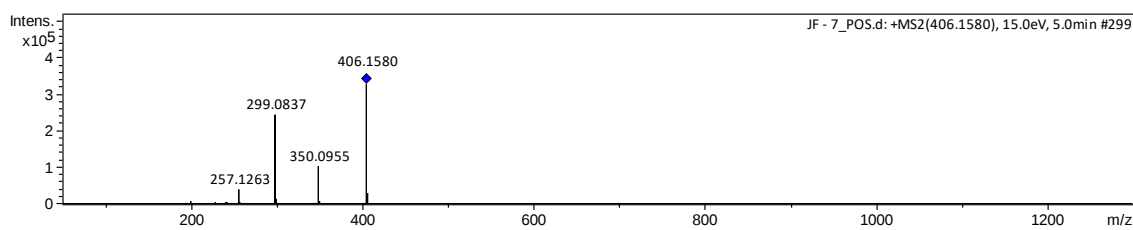
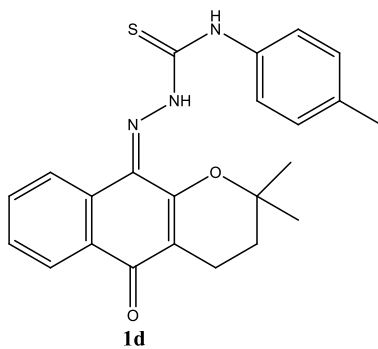


ANEXO E – ESPECTROS DO DERIVADO 1D: (Z)-2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO-2H-BENZO[G]CROMEN-10(5H) - ILIDENO) – N - (P-TOLUIL)HIDRAZINACARBOTIOAMIDA

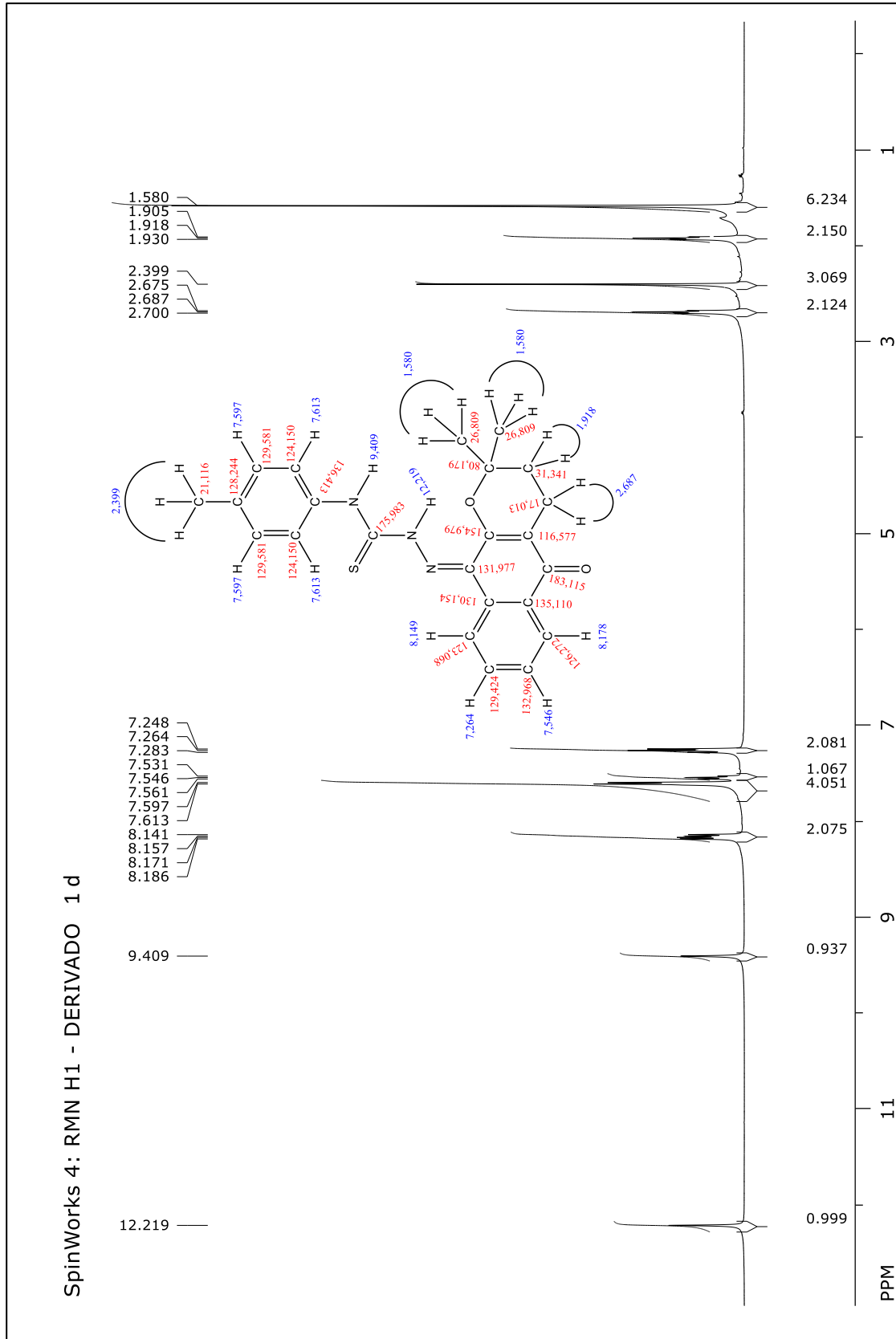
Espectrometria de Infravermelho (IV)

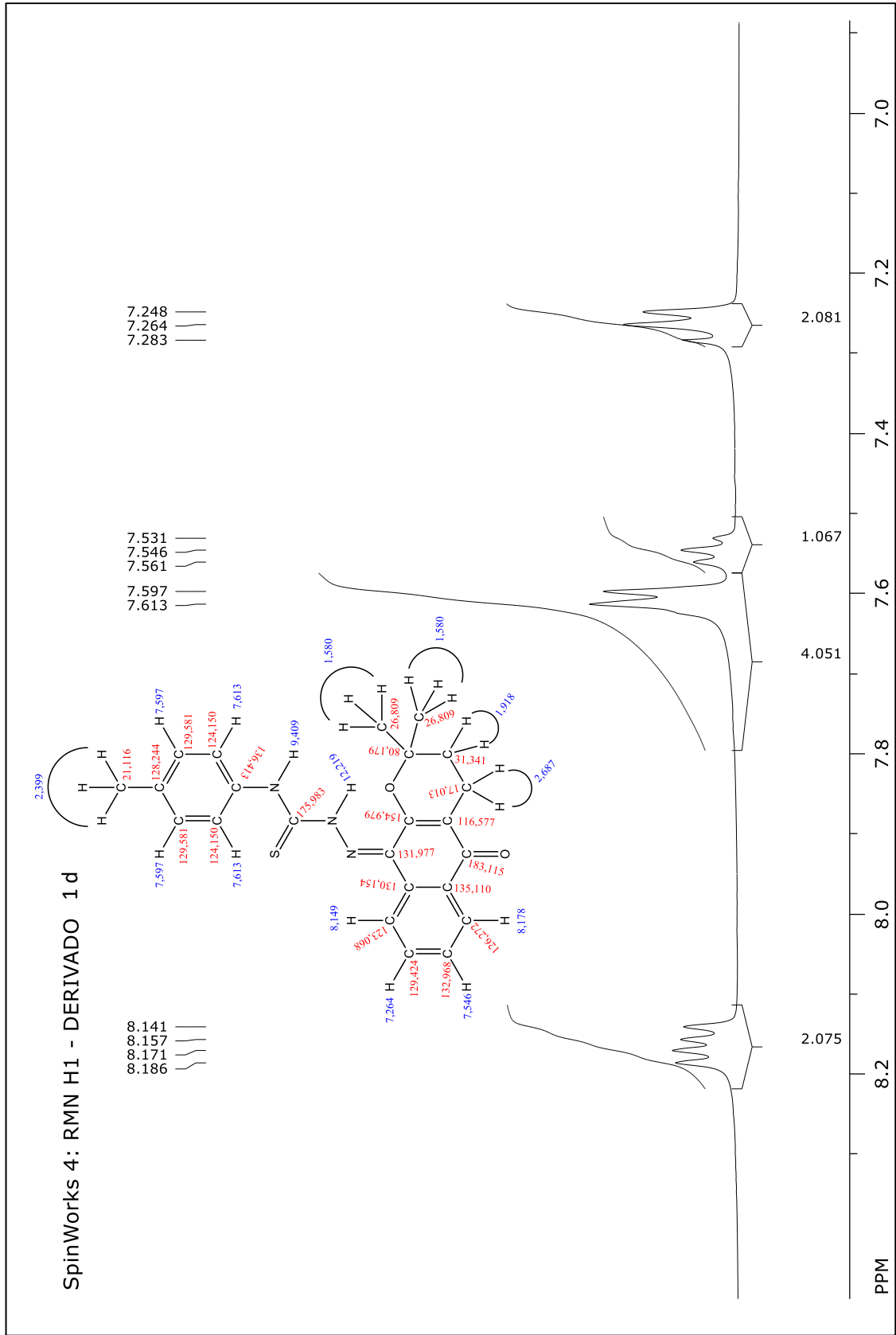


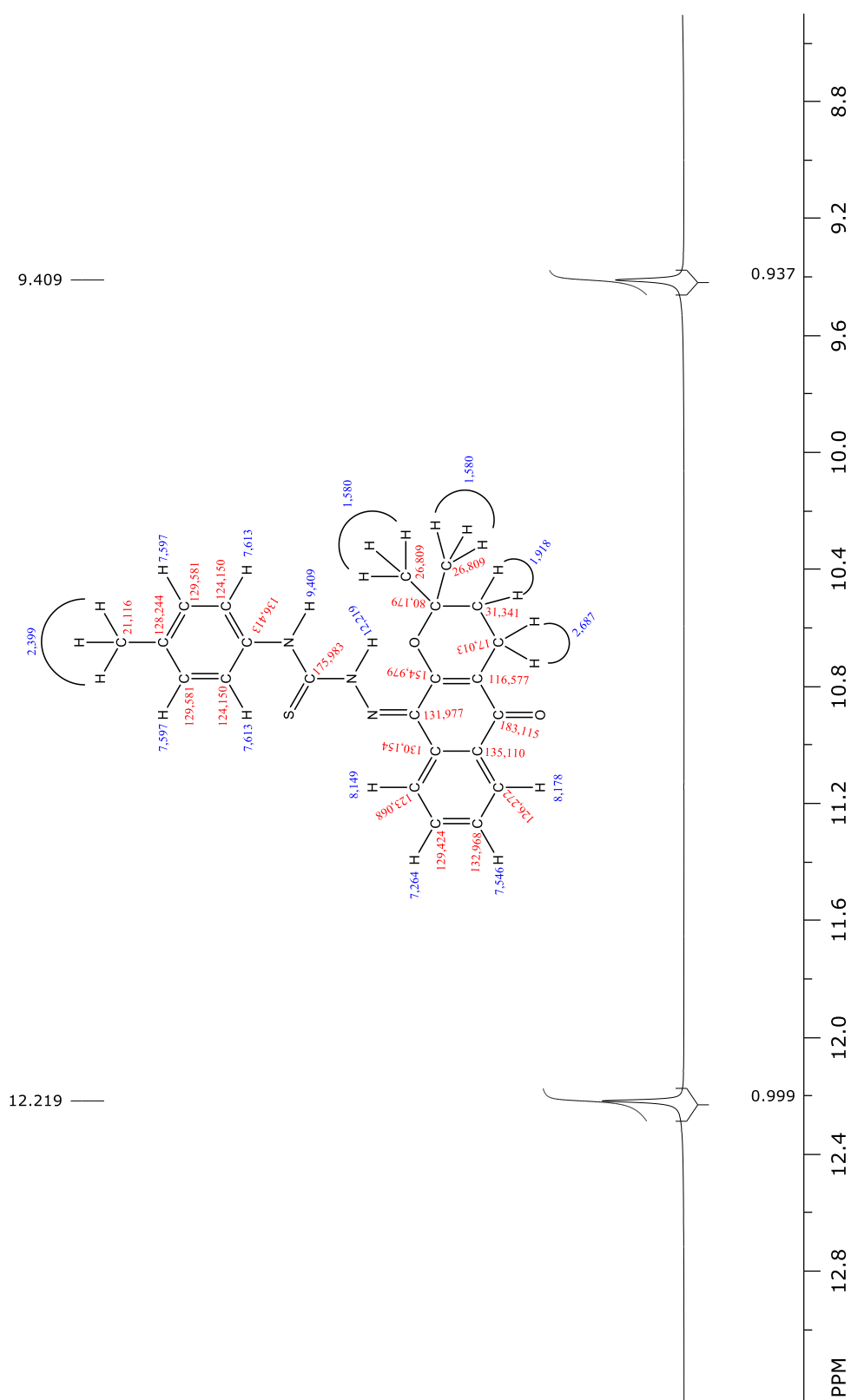
Espectrometria de massas de Alta definição

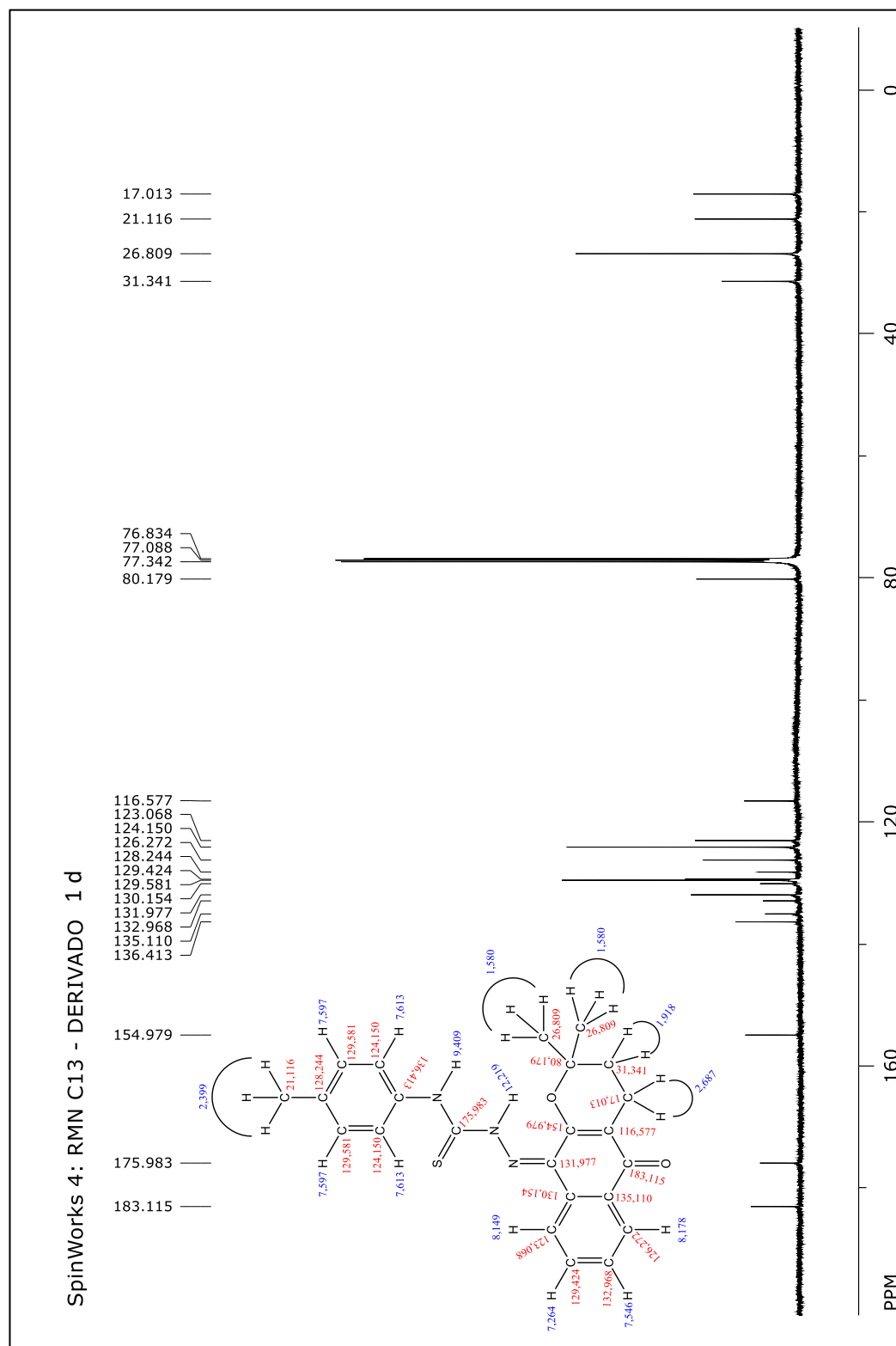


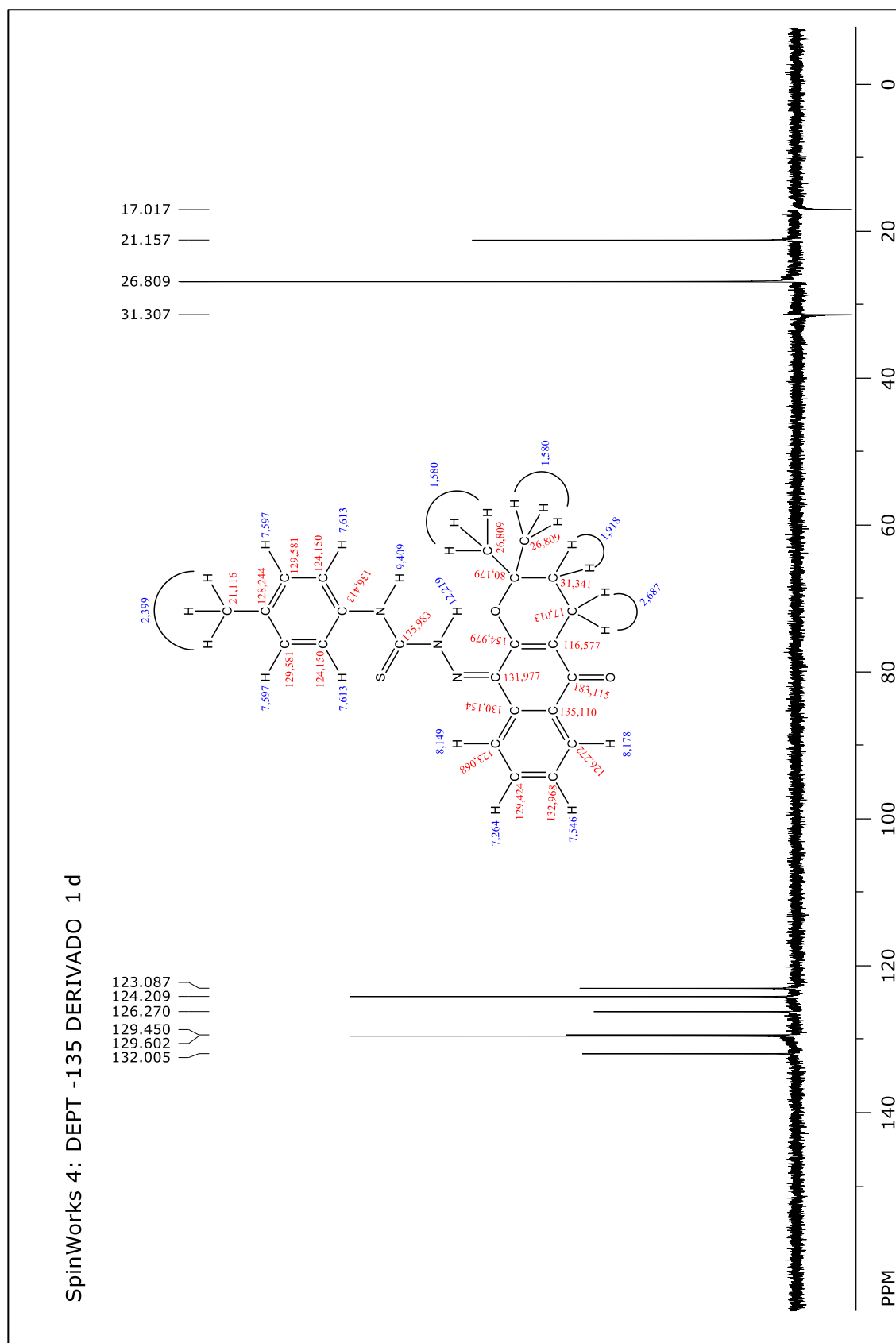
Espectrometria de RMN ¹H





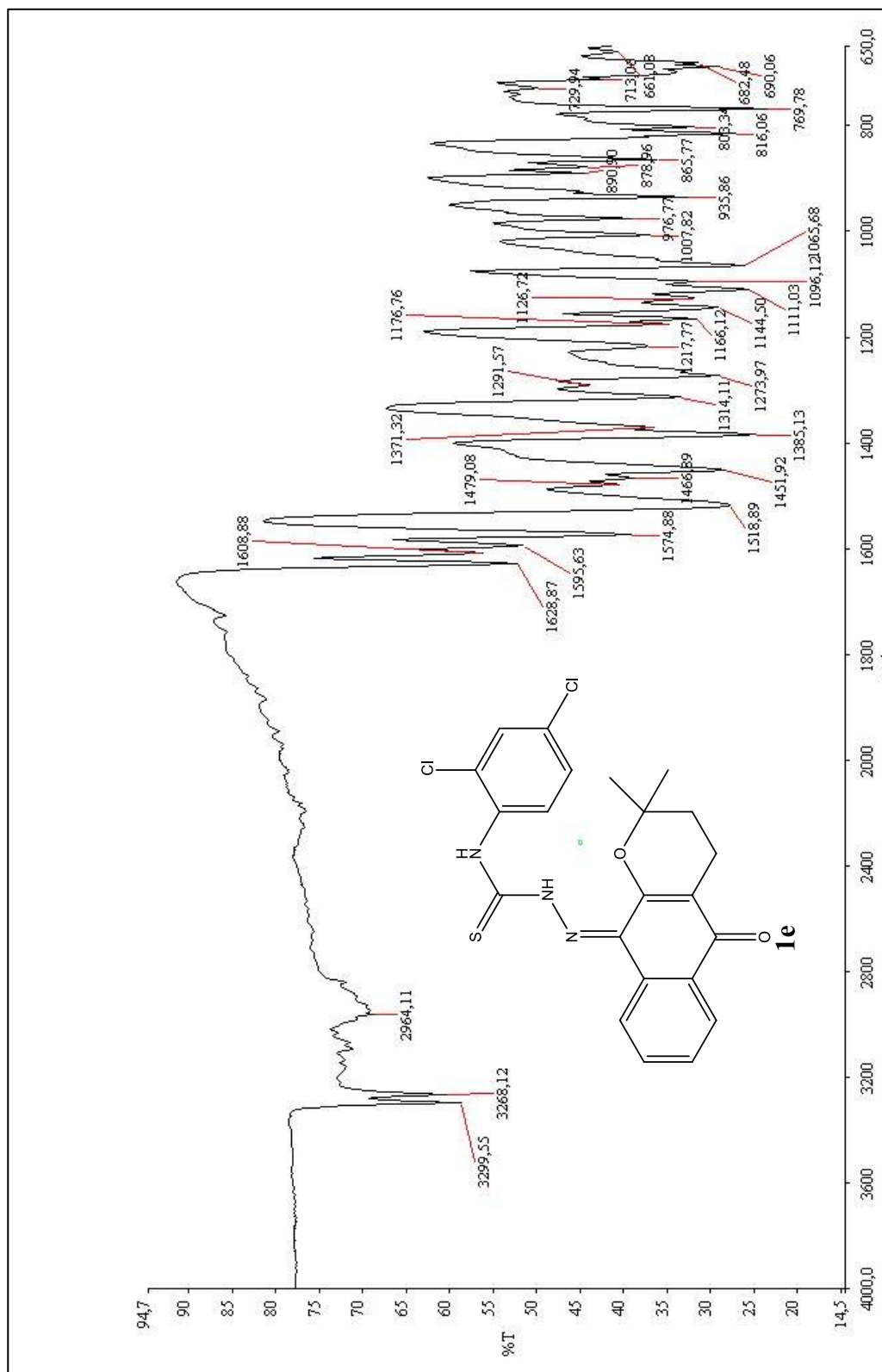




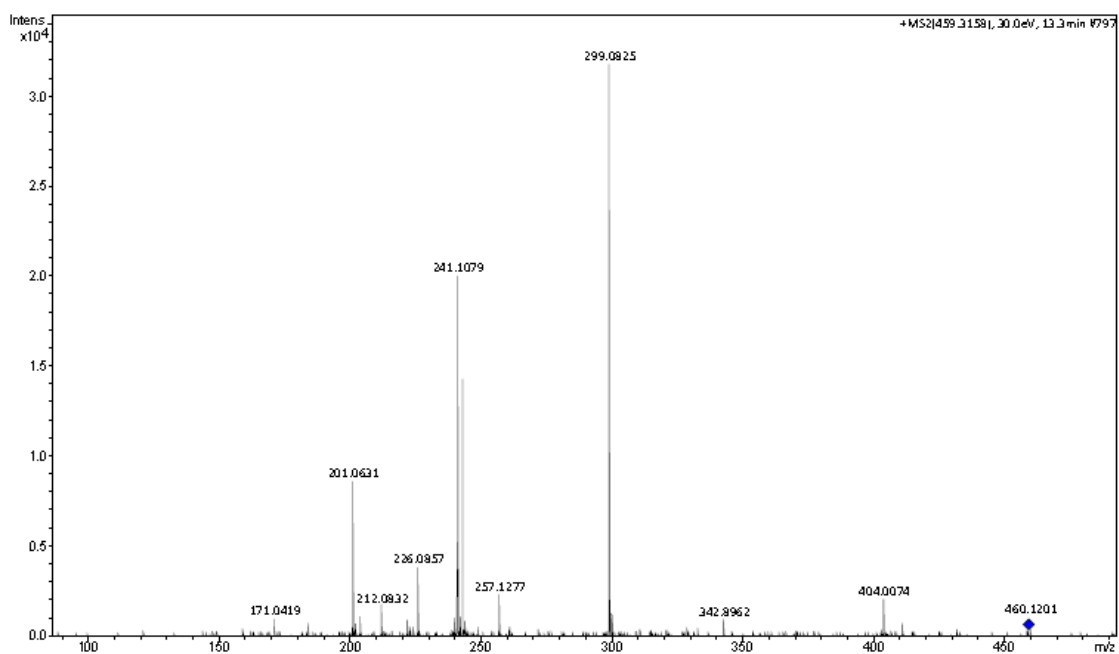
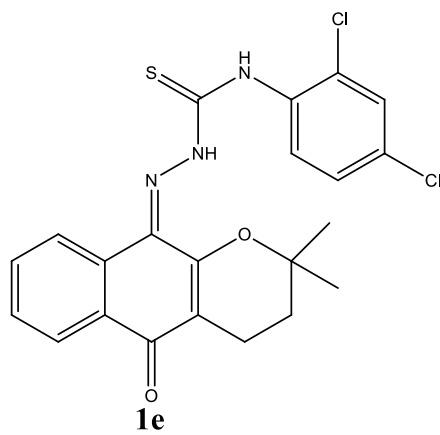


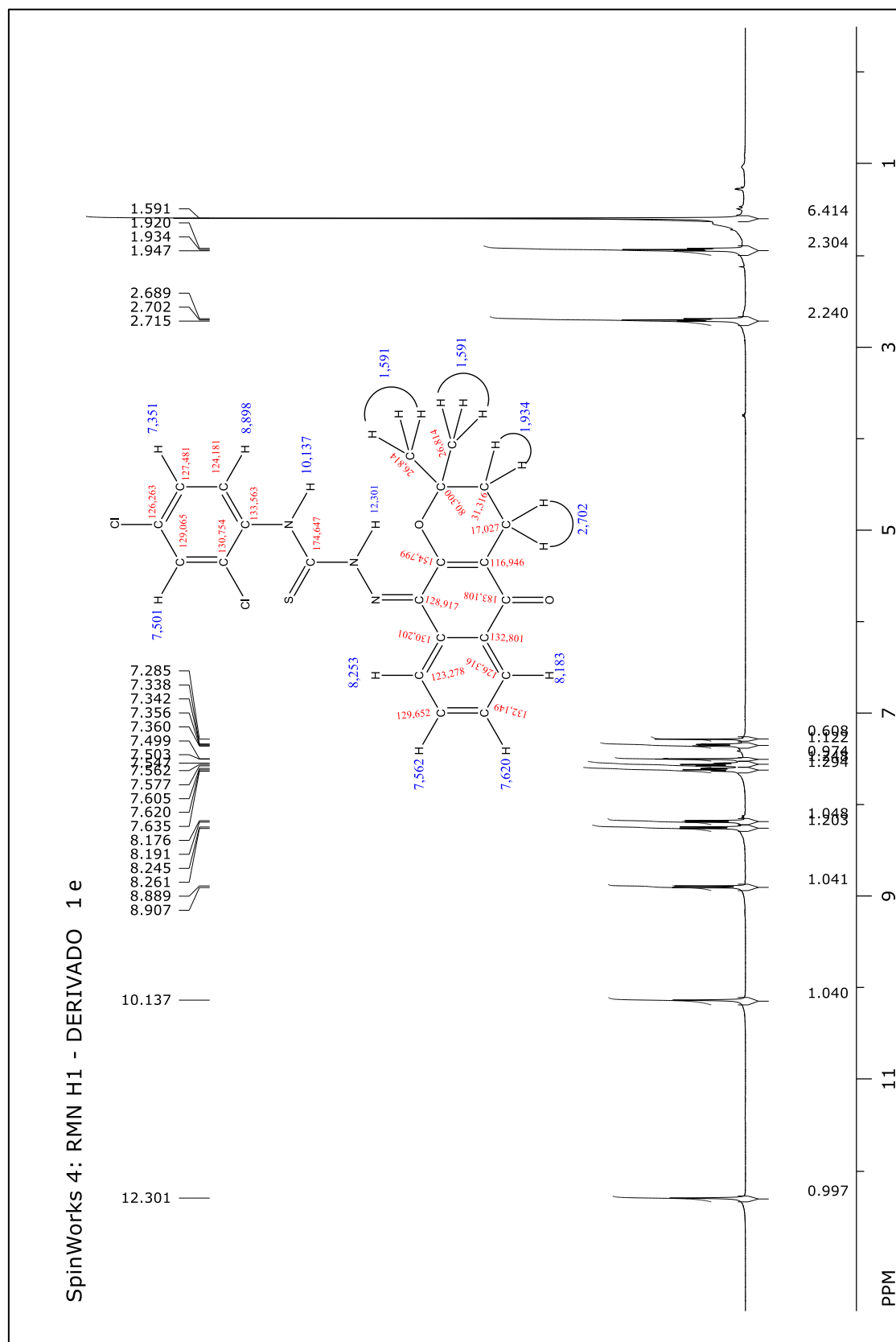
ANEXO F – ESPECTROS DO DERIVADO 1E: (Z) -2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO - 2H - BENZO[G]CROMEN - 10(5H) - ILIDENO) - N - (2,4-DICLOROFENIL)HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA

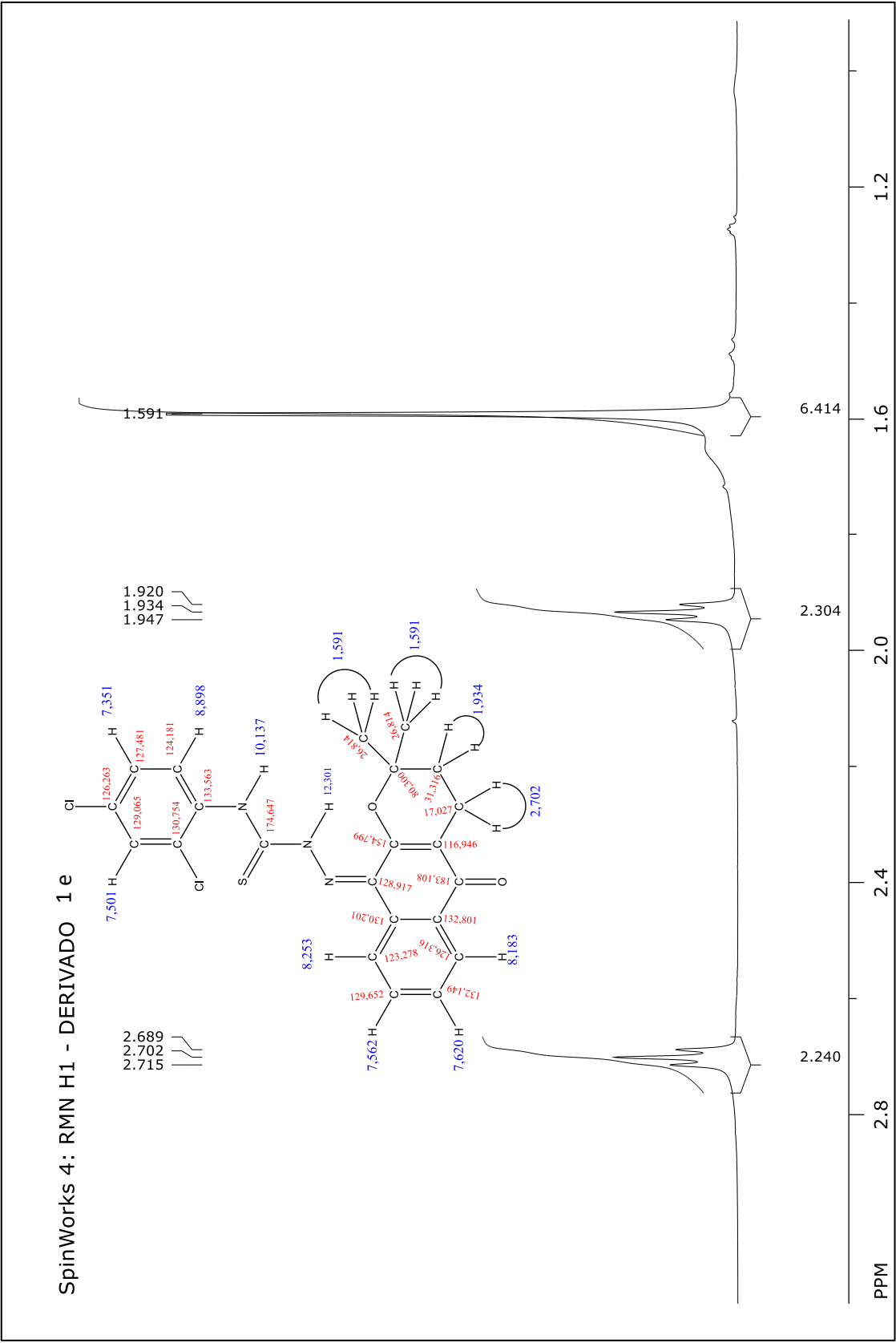
Espectrometria de Infravermelho (IV)



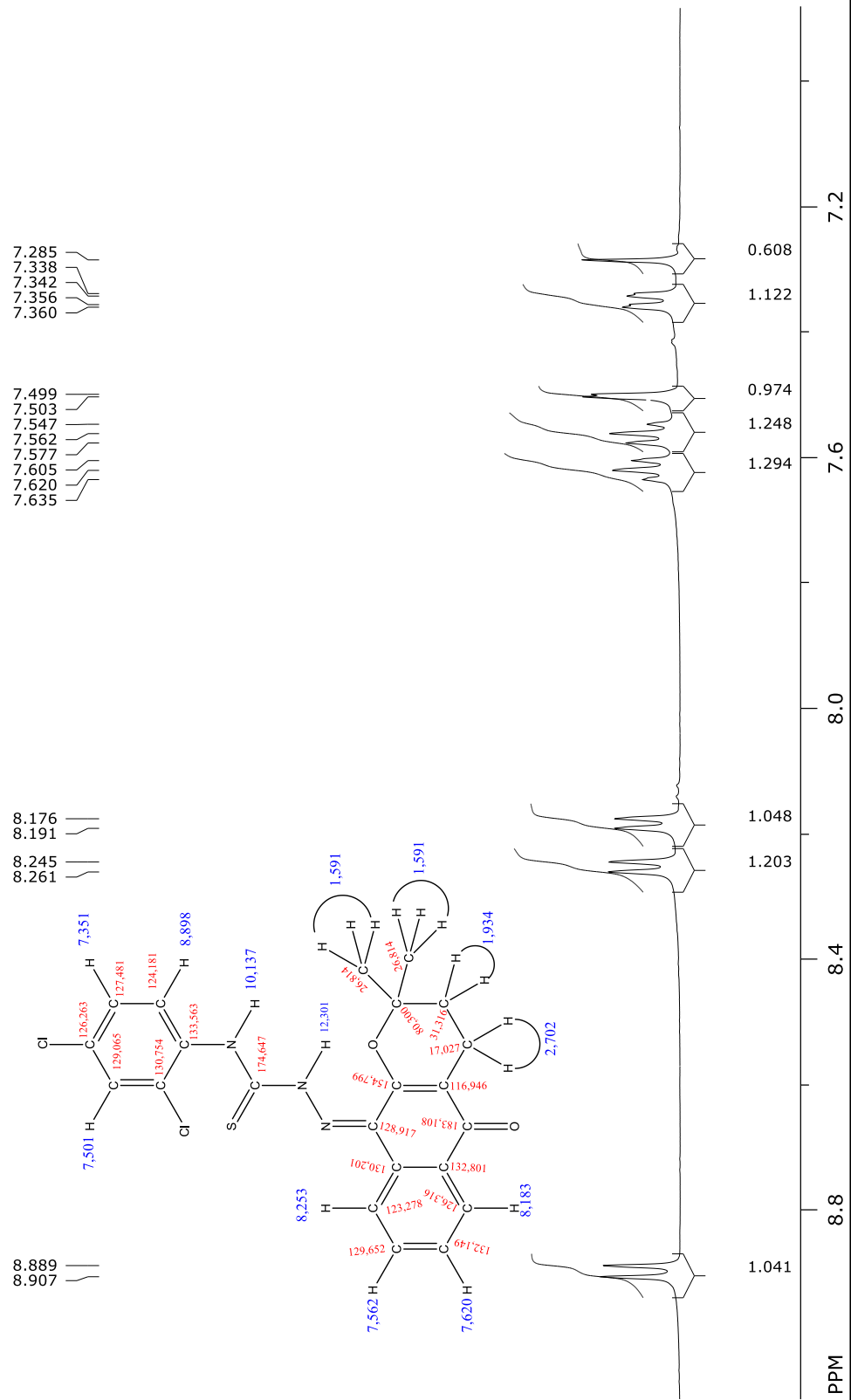
Espectrometria de massas de Alta definição



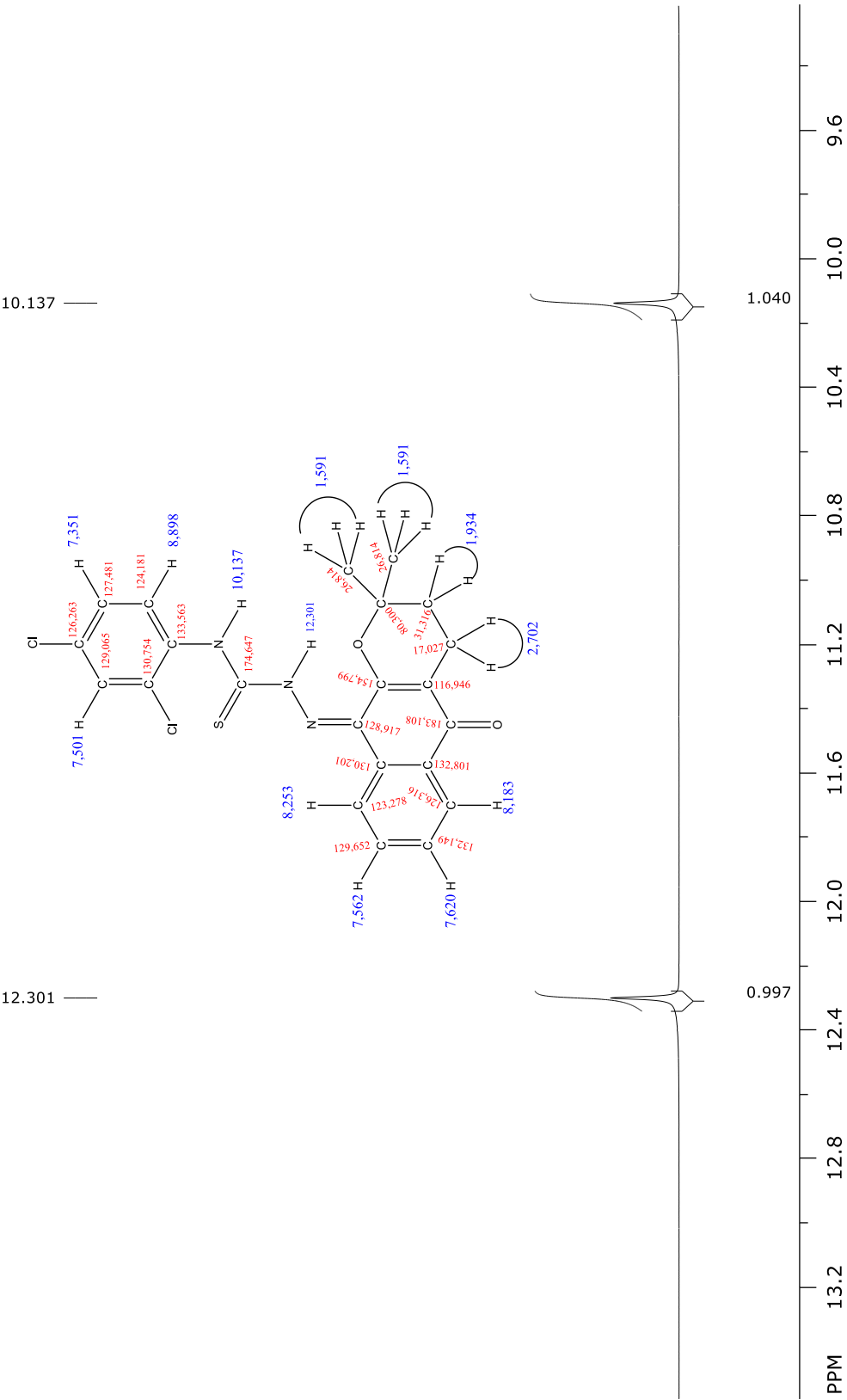




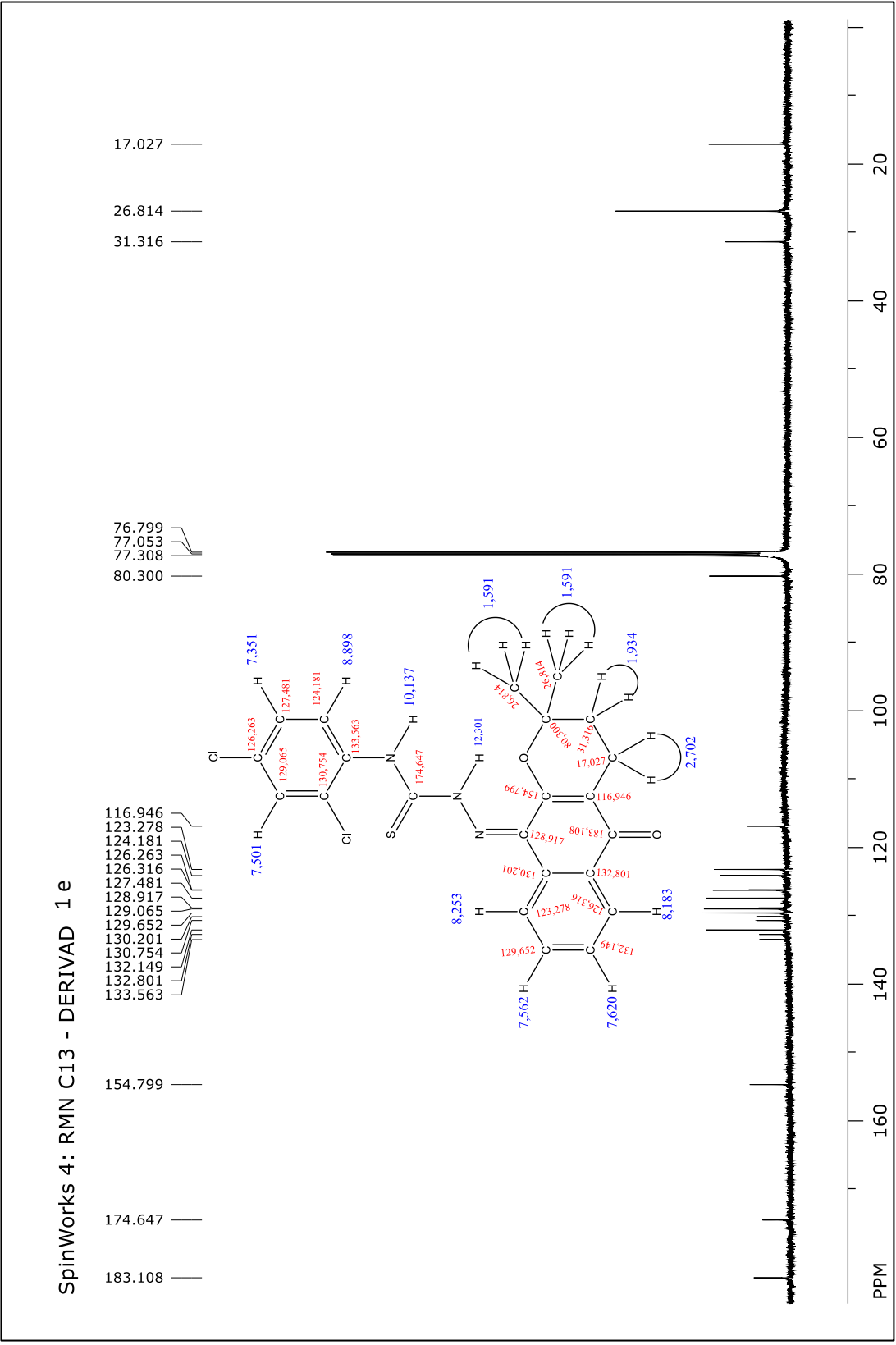
SpinWorks 4: RMN H1 - DERIVADO 1 e



SpinWorks 4: RMN H1 - DERIVADO 1e



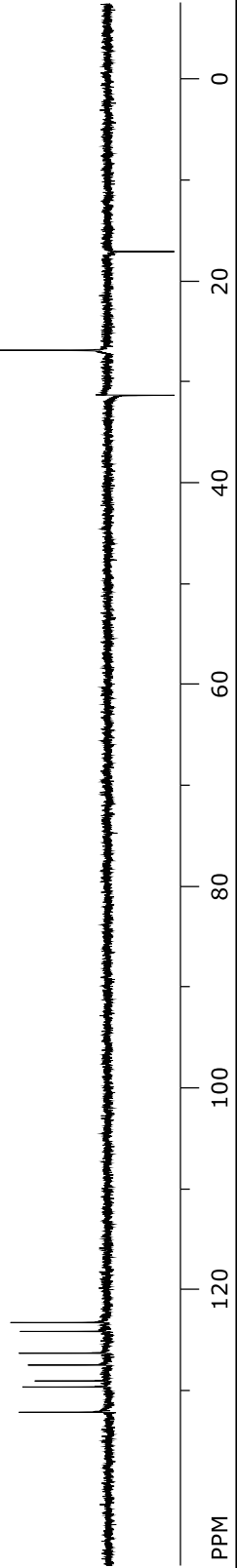
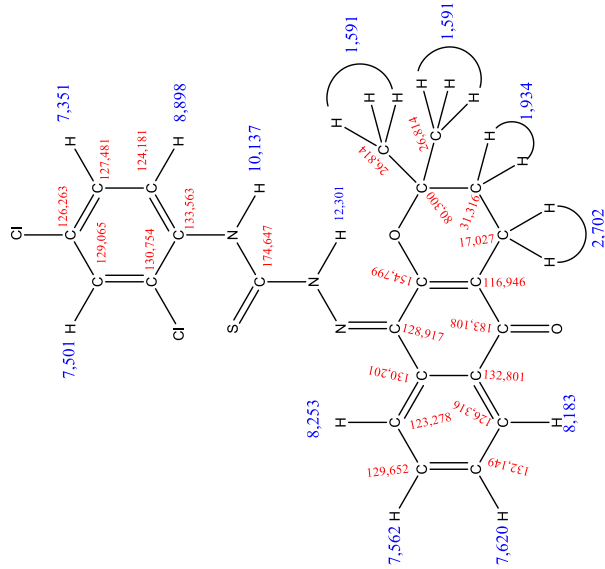
Espectrometria de RMN C¹³



SpinWorks 4: DEPT - 135 DERIVADO 1 e

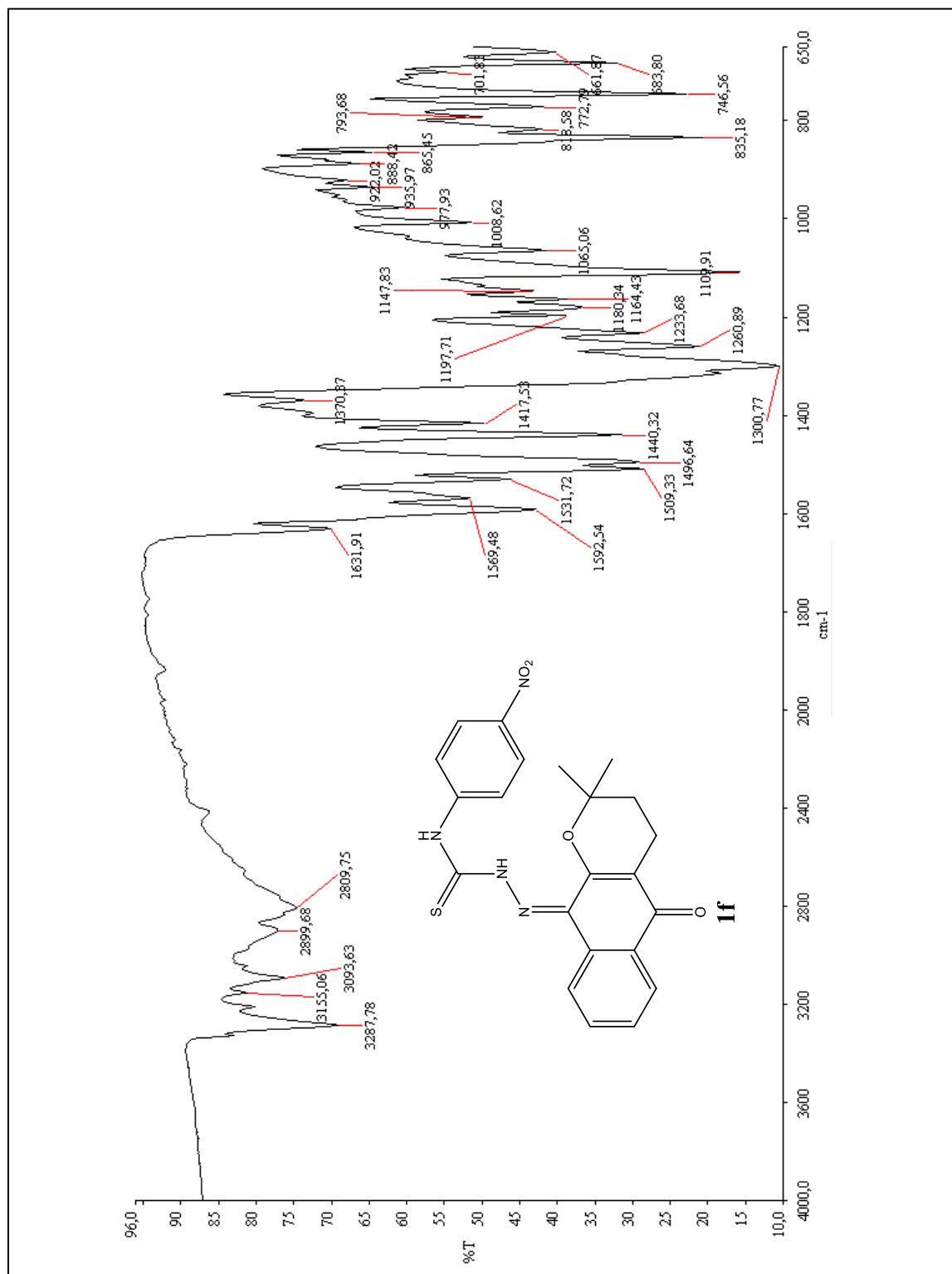
123.281
124.159
126.315
127.491
129.071
129.671
132.176

17.031
26.814
31.284

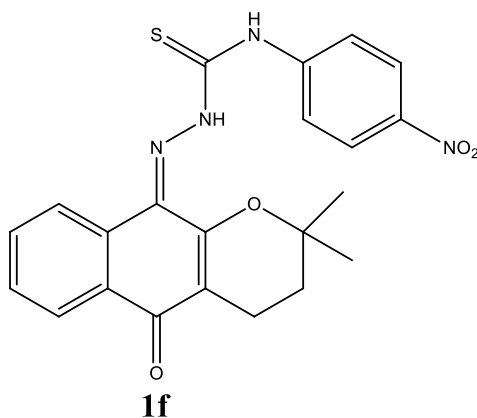


ANEXO G – ESPECTROS DO DERIVADO 1f: (Z) -2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-3,4-DIIDRO - 2H - BENZO[G]CROMEN - 10(5H) - ILIDENO) - N - (4-NITROFENIL)HIDRAZINA-CARBOTIOAMIDA

Espectrometria de Infravermelho (IV)



Espectrometria de massas de Alta definição

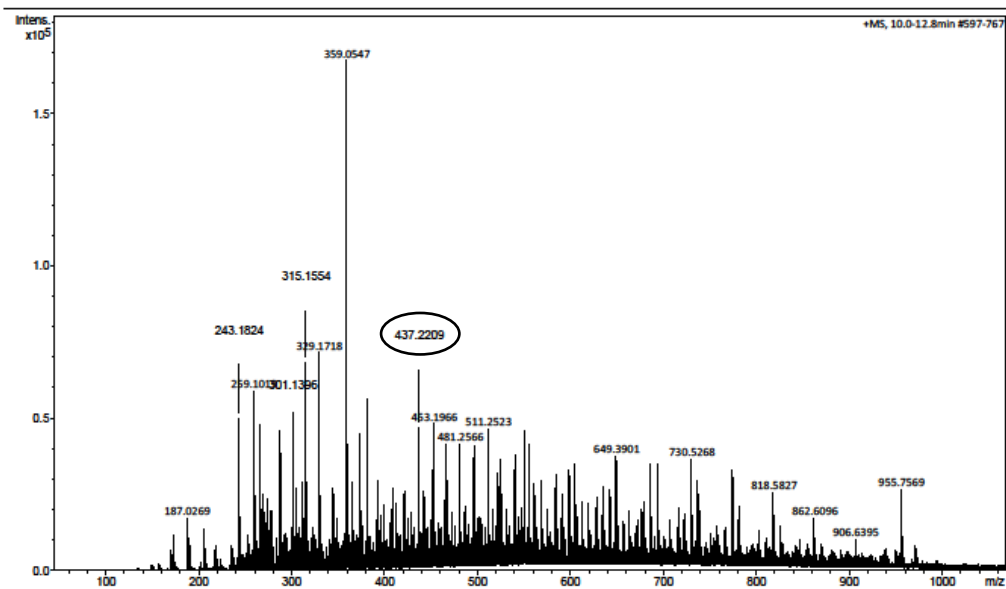


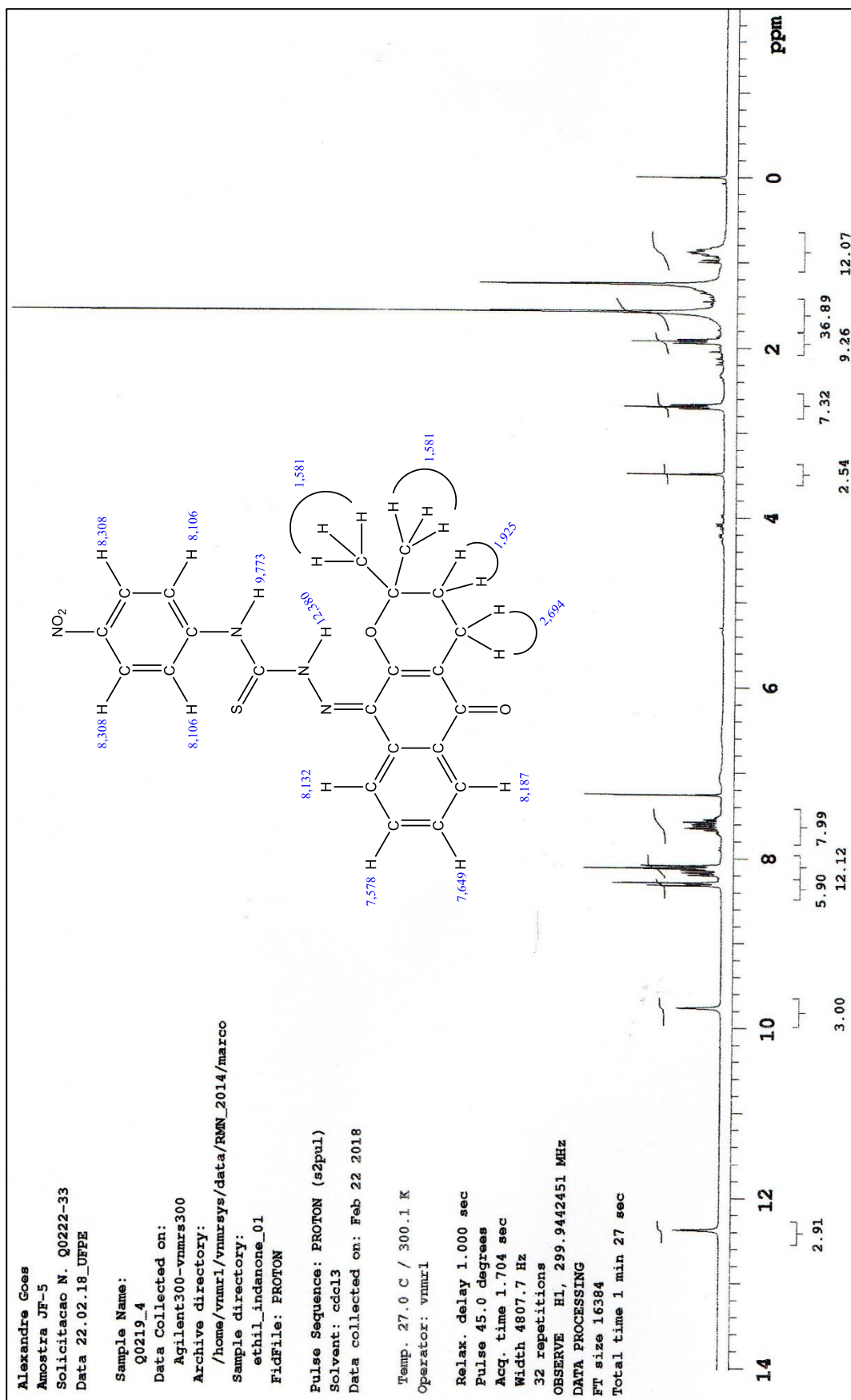
Generic Display Report

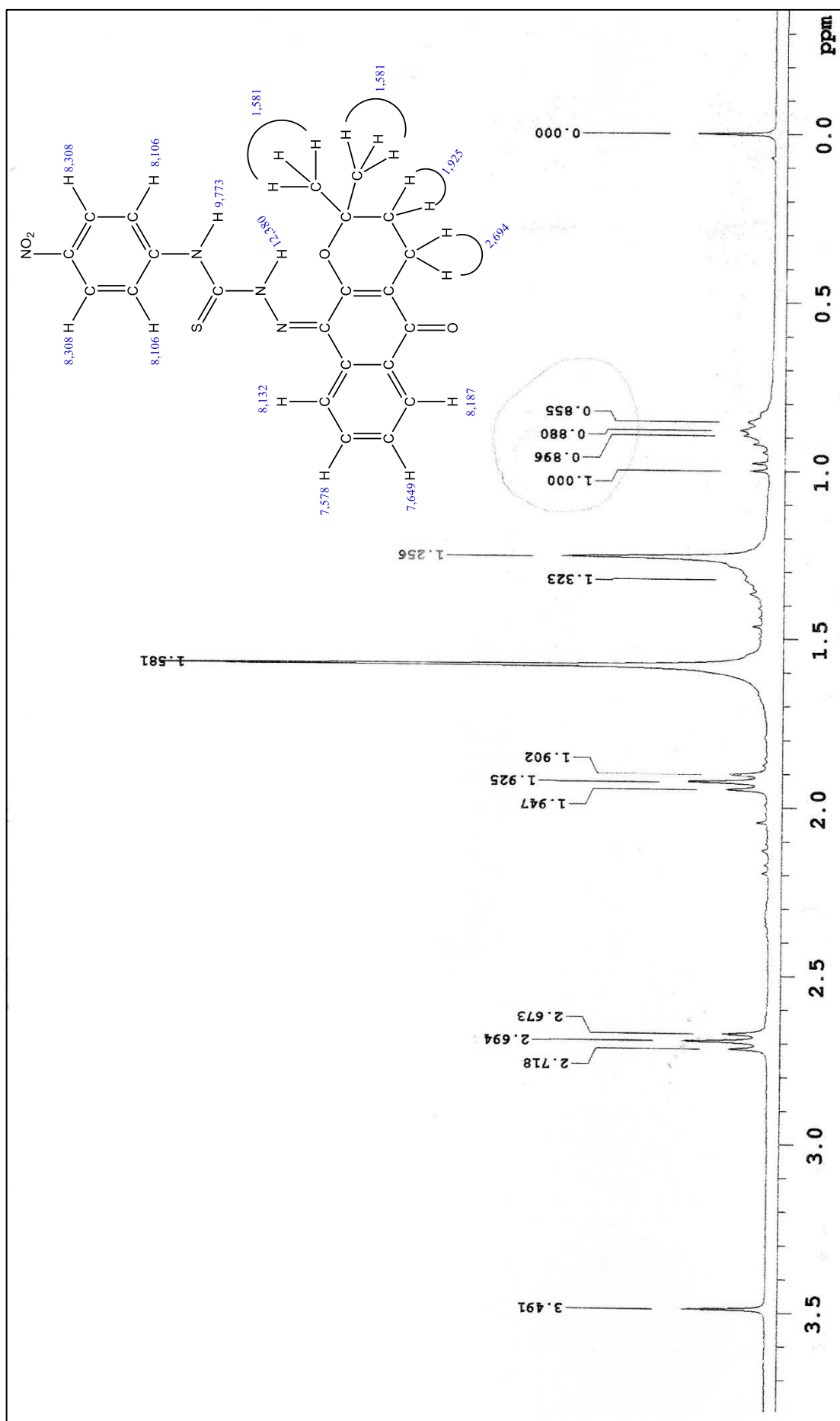
Analysis Info
Analysis Name
Method
Sample Name
Comment

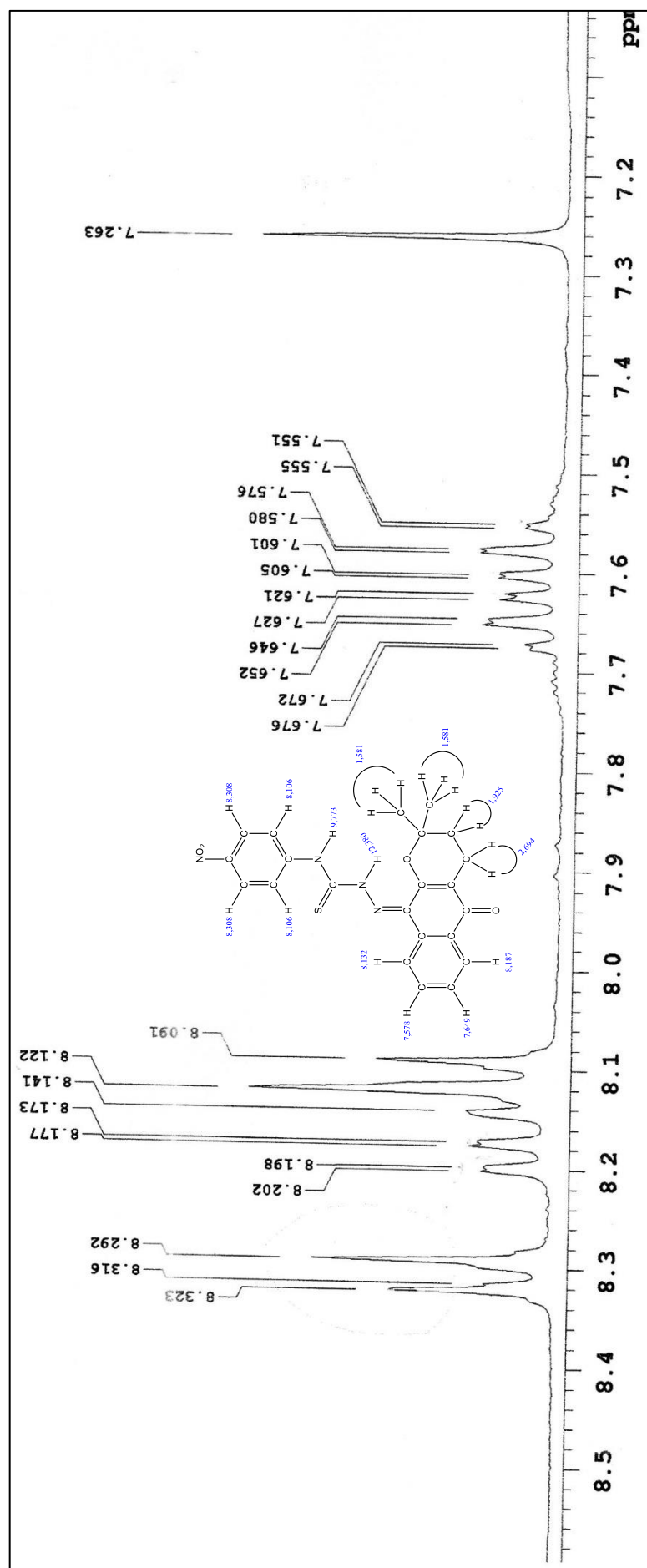
D:\Data\GIBSON_2017\JF - 5_POSITIVO.d
Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_SETEMBRO.m
JF - 5_POSITIVO

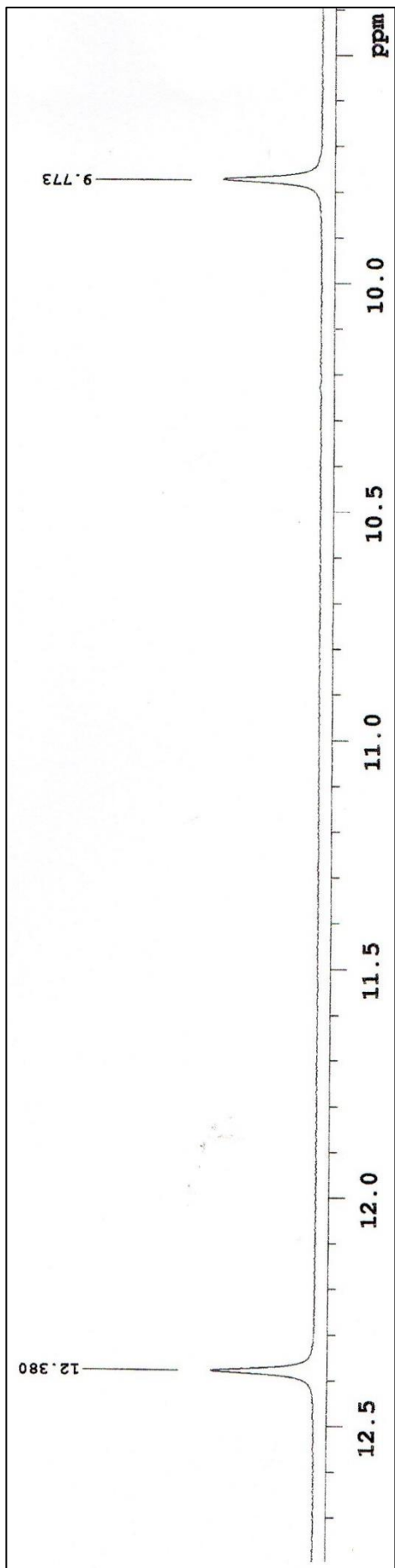
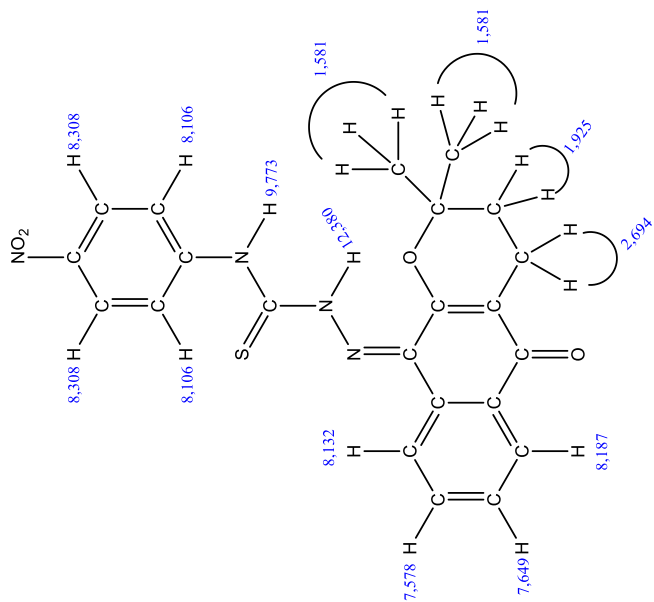
Acquisition Date 4/26/2017 10:41:00 AM
Operator TOMAZ
Instrument micrOTOF-Q



Espectrometria de RMN ^1H 







ANEXO H – APRESENTAÇÃO DO TRABALHO EM CONGRESSO

VI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO

CERTIFICADO

SÍNTESE DE TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DA α -LAPACHONA.

Certificamos que
o trabalho intitulado
de autoria de

**ALEXANDRE JOSÉ DA SILVA GÓES; JEFFERSON DE ALBUQUERQUE SANTOS;
MARIZA SEVERINA DE LIMA SILVA; GIBSON GOMES DE OLIVEIRA; ANTÔNIO JOSÉ
ALVES; JOSÉ GILDO DE LIMA; ROSALÍ MARIA FERREIRA DA SILVA**

foi apresentado na modalidade póster no VI Simposio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco realizado no Complexo Multieventos da UNIVASF, Juazeiro-BA, no período de 27 a 30 de setembro de 2017.

Jackson Roberto Guedes da S. Almeida
Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Presidente do Simposio

REALIZAÇÃO

APOIO

Logos of organizing and supporting institutions: FACEPE, Pernambuco, UNAF, CAPES, PqMMA, and others.