



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - PPGQB

THAISSA LÚCIO SILVA

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE BIOLÓGICO COM
PROPRIEDADES ANTI E PRÓ-OXIDANTES**

MACEIÓ-AL

2014

THAISSA LÚCIO SILVA

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE BIOLÓGICO COM
PROPRIEDADES ANTI E PRÓ-OXIDANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca
Goulart
Co-orientadora: Dra. Fabrícia da Rocha Ferreira

MACEIÓ-AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Dilma Maria dos Santos Cunha

S586a Silva, Thaissa Lúcio.
Avaliação de substâncias de interesse biológico com propriedades anti e pró-oxidantes / Thaissa Lúcio Silva. – 2014.
112 f.: il

Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Co-orientadora: Fabrícia da Rocha Ferreira
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 105-112.

1. Quinonas. 2. Bioeletroquímica. 3. Antioxidantes. 4. Pró-oxidantes
5. Ácido lipóico.

CDU: 547.567



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

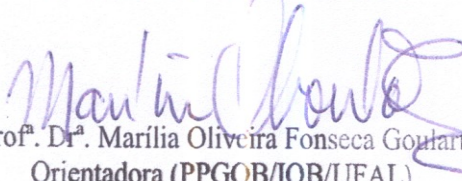



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

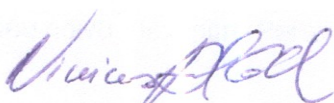
FOLHA DE APROVAÇÃO

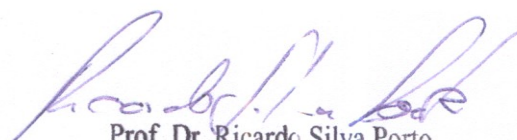
Membros da Comissão Julgadora da defesa de dissertação da mestranda **Thaissa Lúcio Silva**, intitulada: "Avaliação de substâncias de interesse biológico com propriedades anti e pró-oxidantes", realizada no dia 20 de agosto de 2014, às 09h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

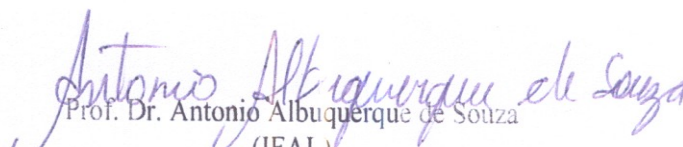
COMISSÃO JULGADORA


Prof.ª Dr.ª Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.ª Dr.ª Fabrícia da Rocha Ferreira
(Pós-doc/UFAL)


Prof. Dr. Vinicius Del Colle Titular
(PPGQB/UFAL-Arapiraca)


Prof. Dr. Ricardo Silva Porto
(IQB/UFAL)


Prof. Dr. Antonio Albuquerque de Souza
(IFAL)

- ♥ Aos meus pais, José Rosival e Vânia Lúcio
- ♥ Ao meu irmão Rodrigo Lúcio
- ♥ Ao meu noivo Alexandre Pereira

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me concedido paz, saúde, inteligência e força para concretizar este trabalho.

Aos meus pais, pelo amor imensurável que não me deixou desistir, pelo apoio incondicional e por me ensinarem a trilhar o caminho da perseverança, da garra e da fé.

Ao meu irmão Rodrigo, meu maior exemplo de coragem e determinação.

Ao meu noivo Alexandre, por todo amor, carinho, apoio, compreensão e por ter sempre as palavras mais otimistas em todos os momentos.

Aos meus familiares e amigos por fazerem parte da minha história seja na luta, seja na vitória.

À Antônia Tavares e família, pela estadia em Maceió durante esses dois anos do mestrado.

À minha orientadora, professora Dra. Marília Goulart, pela orientação, incentivo, por partilhar conhecimentos e experiências, por não ter medido esforços para a realização deste trabalho, proporcionando, inclusive, parcerias relevantes. Seu exemplo de amor e dedicação à ciência nos encoraja e anima. Não encontro palavras para expressar toda minha gratidão.

À minha amiga e co-orientadora, Fabrícia Ferreira, um verdadeiro anjo no LEQUI. Não tenho palavras para agradecer a sua paciência e disponibilidade para me ensinar com zelo, organização e muito rigor os procedimentos experimentais, tratamento de dados, discussão dos resultados, entre outros. Muito obrigada!

Aos professores do IQB, especialmente aos que tive a oportunidade de cursar suas disciplinas: Marília, Euzébio, Tonholo, Lúcia Conserva, Fabiane Caxico, Pierre e Edson Bento.

Ao querido Aldy, um grande profissional que exerce suas atividades de modo singular, esbanjando simpatia e alegria. Obrigada por sempre nos socorrer!

Ao Anderson, secretário atual do PPGQB e ao Tadeu, ex-secretário do PPGQB, por cuidarem com zelo e dedicação de toda a parte burocrática, fundamental para a concretização dos nossos sonhos.

Aos meus professores da graduação na Universidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca, especialmente à Laura e ao Vinicius, a quem carinhosamente considero minha mãe e meu pai na universidade. Laura me abriu as portas do

mestrado me apresentando à Prof^a. Marília e também foi fundamental no desenvolvimento da parte de síntese desse trabalho, com ela fiz os primeiros experimentos e as primeiras discussões. Vinicius é meu eterno incentivador e conselheiro, às vezes sinto que ele acredita mais em mim do que eu mesmo.

Aos professores Paulo Roberto e Chaquip Netto (DQ/UFRJ) pela síntese e gentil concessão das amostras trabalhadas na presente dissertação.

Aos amigos do LEQUI/UFAL, em especial a Jadriane, Mônica, Camila, Profa. Fabi, Gabi, Juliana, Andréa, Leonardo, Waldomiro, Angladis, Erivaldo, Orlando, Fabiana Moura, Antonio, Anastácio, Manu, Jessica, Jessica Lane, Maryanna, Samaysa, Carol, Marília Palmeira, Laine, Igor e Leyllane pelos momentos de estudo, discussões científicas, alegrias e descontração.

À professora Rossimiriam da UFMG, por ter aceitado nossa proposta de parceria, pela oportunidade de realizar todos os experimentos de síntese em seu laboratório (LABSINTO) e pelo cuidado dispensado a mim durante minha estadia em Belo Horizonte. Agradeço também à professora Rosimeire, ao Carlos, Nathália e Soraia.

À Vanessa Gontijo, doutoranda da UFMG, por ter me ensinado com muito carinho todas as etapas experimentais da síntese orgânica.

À família da professora Marília, nas pessoas do Sr. Geraldo e Sra. Haidée, por terem me recebido e hospedado tão bem em Belo Horizonte. Agradeço também à Vanessa, Louise e Clinascia pela estadia na segunda viagem. O povo mineiro é fantástico! Um exemplo de simpatia e educação.

A CAPES, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

E às agências financiadoras FAPEAL e CNPq pelo apoio financeiro ao grupo.

A todos, o meu **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Quinonas apresentam relevantes atividades biológicas, como antineoplásica, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e antifúngica. As vias moleculares relacionadas com a bioatividade de quinonas abrangem: estresse oxidativo (EO), alquilação biorredutiva (ABR) por meio da geração de intermediários eletrofílicos, adição de Michael por vários endobióticos nucleofílicos e, ainda, através da complexação com metais, com mecanismos similares e às vezes intensificados. O efeito prejudicial das ERO, ERN e outras espécies reativas, responsáveis, quando em excesso, pelo EO, pode ser controlado pela ação de antioxidantes, como o ácido lipóico (AL), no entanto, ele exerce a maioria dos seus efeitos em concentrações micromolares elevadas, por isso é cada vez mais crescente o interesse em derivados do AL, uma vez que combinações moleculares (híbridos) obtidas por acoplamento de AL com uma porção bioativa amino-substituída, podem apresentar atividade multifuncional. Este trabalho está organizado em duas partes, interrelacionadas. Na primeira, substâncias farmacologicamente ativas, resultantes da hibridação molecular de quinonas e pterocarpanos foram estudadas eletroquimicamente nos meios prótico e aprótico, utilizando carbono vítreo como eletrodo de trabalho. Os compostos apresentaram um comportamento redox complexo, com o surgimento de ondas adicionais relacionadas a mudanças estruturais. Os produtos da eletrorredução das pterocarpanoquinonas reagiram com oxigênio, indicativo da geração de EROs e explicando, em parte, seu efeito citotóxico. Além disso, para o derivado mais promissor, a LQB-118, foi investigada a interação com DNA, que se mostrou negativa. A segunda parte deste trabalho visou à obtenção de amidas a partir da reação do ácido α -lipóico com aminas aromáticas, para serem avaliadas quanto ao seu efeito antioxidante protetor contra a peroxidação de lipídios e seu perfil eletroquímico. Obtiveram-se três derivados, sendo um inédito, o LA-SCH₃. Na busca da melhor correlação entre as propriedades antioxidantes das amidas derivadas e a lipofilia das mesmas, calculou-se teoricamente o coeficiente de partição n-octanol-água (log P). A proteção da peroxidação lipídica foi avaliada usando um modelo de lipoperoxidação em membrana (lipossomas unilamelares de lecitina de soja) mediado pelo radical peroxila. Ensaio de peroxidação lipídica mostraram que todos os compostos protegeram a membrana, sendo que o derivado LA-OH apresentou efeitos protetores na membrana similares ao Trolox e mais efetivo que seu precursor, o ácido lipóico. O IC₅₀ de LA-OH foi calculado. O efeito protetor aqui evidenciado é relevante, visto que a hibridação molecular realizada neste trabalho favoreceu a proteção da membrana. LA-OH também foi estudada eletroquimicamente em meio prótico, com evidência de dois picos de oxidação, característicos de sistemas multifuncionais representados por grupos fenólicos e pontes dissulfeto.

ABSTRACT

Quinones present significant biological activities such as anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, antiviral and antifungal. The molecular pathways related to the bioactivity of quinones include: oxidative stress (OS), bioreductive alkylation (BRA) by generating electrophilic intermediates, Michael addition of various nucleophilic endobiotics and also through metal complexation, with similar mechanisms and sometimes enhanced effects. The detrimental effect of ROS, RNS and other reactive species, responsible, when in excess, for OS, can be controlled by the action of antioxidants such as α -lipoic acid (LA), however, it exerts most of its effects at high micromolar concentrations. There is an upraising interest in derivatives of LA, since molecular combinations (hybrids) obtained by coupling LA with a bioactive amino-substituted moiety may exhibit multifunctional activity. This work is organized in two inter-related parts. At first, pharmacologically active pterocarpanquinones were studied electrochemically, in aprotic and protic media, using glassy carbon working electrode. The compounds showed complex redox behavior, with evidence of additional waves related to structural changes. The products of the electroreduction of pterocarpanquinones have been shown to react with oxygen, indicative of ROS generation and explaining, in part, the reported cytotoxic effect. Additionally, the interaction with DNA of the most promising derivative, LQB-118, was investigated and showed to be negative. The second part of this study aimed to obtain amides from the reaction of LA with aromatic amines, to be evaluated toward their antioxidant protective effects against lipid peroxidation, along with their electrochemical profile. Three derivatives were obtained, being the methylthio derivative, LA-SCH₃, reported for the first time in the literature. In search for the best correlation between the antioxidant properties of derived amides and their lipophilicity, we have calculated the coefficient of partition n-octanol-water (log P). The protection against lipid peroxidation was evaluated using a model of peroxy radical-mediated lipid peroxidation using a modified membrane (unilamellar soybean lecithin). Lipid peroxidation assays showed that all compounds protected the membrane, and the LA-OH had similar protective effects on membrane as Trolox and more effective than its precursor, LA. The protective effect shown here is relevant, since the molecular hybridization performed in this study favored the protection of the membrane. IC₅₀ value for LA-OH was obtained as well as its electrochemical profile in protic medium, with evidence of two oxidation peaks, characteristic of its multifunctional characteristics, represented by phenolic and disulfide groups.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Geração das principais espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e outras.	19
Figura 2 – O papel da glutatona e outros antioxidantes no controle do estresse oxidativo (equações não balanceadas).....	21
Figura 3 – Comportamento redox: ácido lipóico (AL) - ácido di-hidrolipóico (ADHL).....	22
Figura 4 – Vias de atuação do ácido lipóico (AL).....	23
Figura 5 – Exemplos de derivados do ácido lipóico.	24
Figura 6 – Princípio do processo de ativação para formação da ligação amida.	26
Figura 7 – Mecanismo de formação do cloreto de acila utilizando cloretos de tionila e de oxalila e posterior aminólise do cloreto de acila.	26
Figura 8 – Exemplos de carbodiimidas comumente usadas na síntese de amidas, anidridos e ésteres.	27
Figura 9 – Estrutura da amida derivada do ácido lipóico.	28
Figura 10 – Estrutura do NHS e estrutura genérica do éster ativado formado..	28
Figura 11 – Exemplos de quinonas biologicamente importantes.....	30
Figura 12 – Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q^{•-}) e hidroquinonas (QH₂), respectivamente.	32
Figura 13 – Ciclo redox, produção de metabólitos e bioativação de quinonas.	34
Figura 14 – Representação do esqueleto básico de pterocarpanos.	35
Figura 15 – Estrutura do pterocarpano natural LQB-79.....	36

Figura 16 – Proposta de mecanismo de ação para o LQB-79.	38
Figura 17 – Esquema ilustrativo dos dois grupos farmacofóricos, base para a síntese de pterocarpanoquinonas.	39
Figura 18 – Pterocarpanoquinonas estudadas no presente trabalho.	40
Figura 19 – Estrutura da mitomicina C (A) e doxorubicina (B).	42
Figura 20 - Rota sintética usada para a preparação da pterocarpanoquinona LQB-118 estudada neste trabalho.	48
Figura 21 - Síntese das pterocarpanoquinonas derivadas da LQB-118 estudadas neste trabalho.	49
Figura 22 - Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a uma lipossoma. Reação de geração de radicais durante o ensaio de peroxidação lipídica.....	59
Figura 23 - Voltamogramas cíclicos para LQB-118 (a), LQB-149 (b), LQB-150 (c) e LQB-151 (d) ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF ₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	61
Figura 24 - Comparação entre os voltamogramas cíclicos para LQB-118 (a), LQB-149 (b), LQB-150 (c) e LQB-151 (d) ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF ₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	63
Figura 25 - Racionalização mecanística das duas primeiras etapas do processo de redução para a pterocarpanoquinona LQB-118.	64
Figura 26 - Experimentos voltamétricos com fixação de potencial em $-1,1 \text{ V}$ por diferentes tempos de condicionamento. LQB-118 ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF ₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	66
Figura 27 - Possível mecanismo de clivagem heterocíclica da LQB-118, após a redução.	66
Figura 28 - a) Análise da corrente de pico (Ip_{c1}), para a primeira onda de redução para LQB-118 e seus derivados em função de $v^{1/2}$. b) Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBAPF ₆ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para as diferentes pterocarpanoquinonas.	67

Figura 29 - Gráfico de correlação E_{pc1} das pterocarpanoquinonas LQB-118 (padrão), LQB-149 (nitro), LQB-150 (bromo) e LQB-151 (cloro) vs. constantes de substituintes de Hammett.70

Figura 30 - Voltamogramas de pulso diferencial para LQB-118 e seus derivados ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$71

Figura 31 - Mecanismo eletroquímico químico catalítico (ErC') para LQB-118.74

Figura 32 - a) Voltamogramas Cíclicos para LQB-118 e seus derivados em DMF/TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), eletrodo de carbono vítreo, em ausência de oxigênio (vermelho) e em presença de diferentes concentrações de oxigênio; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. b) Porção linear de I_{pR} / I_{pO} em função da concentração de oxigênio para cálculo da constante aparente de reatividade.74

Figura 33 - Voltamograma cíclico da LQB-118 ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (20%), tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$77

Figura 34 - Mecanismo para a formação da hidroquinona a partir da LQB-118.77

Figura 35 - Voltamograma cíclico para os derivados ($c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%), tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$78

Figura 36 - (—) VPD do biossensor de dsDNA em ausência de LQB-118. (---) VPD do biossensor de dsDNA em presença de LQB-118 ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$) com aplicação de potencial de redução (-0,17 V). (---) VPD do biossensor de dsDNA em presença de LQB-118 ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$), após 15 minutos de contato. Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (20%), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$79

Figura 37 - (—) VPD do biossensor de ssDNA em ausência de LQB-118. (---) VPD do biossensor de ssDNA em presença de LQB-118 ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com aplicação de potencial de redução (-0,17 V). (---) VPD do biossensor de ssDNA em presença de LQB-118 ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) após 15 minutos de contato. Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (20%), tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$80

Figura 38 - Esquema representativo da síntese das três amidas derivadas do ácido lipóico.84

Figura 39 - Mecanismo da reação de formação da amida AL-OH.85

Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o material de partida, LA. δ (ppm) 3,51 (m, 1H; **H3**), 3,11 (m, 2H; **H1**), 2,42 (t, 2H; **H7**), 2,49 (m, 1H; **H2'**), 2,00-1,52 (m, **7H; H2'', H4, H5 e H6**).....86

Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o material de partida, AL. δ (ppm): 27,01 (**C6**), 31,30 (**C5**), 36,46 (**C4**), 37,22 (**C7**), 41,15 (**C1**), 42,86 (**C2**), 58,92 (**C3**), 182,50 (**C8**).....87

Figura 42 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o composto AL-NHS (2). δ (ppm) 3,58 (m, 1H; **H3**), 3,13 (m, 2H; **H1**), 2,83 (s, 4H; **H8 e H9**), 2,62 (t, 2H; **H7**), 2,48 (m, 1H; **H2'**), 1,99-1,46 (m, **7H; H2'', H4, H5 e H6**).....88

Figura 43 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o composto AL-NHS (2). δ (ppm): 24,57 (**C6**), 25,80 (**C11 e C12**), 28,49 (**C5**), 30,99 (**C7**), 34,70 (**C4**), 38,70 (**C1**), 40,34 (**C2**), 56,29 (**C3**), 168,57 (**C8**), 169,26 (**C9 e C10**).89

Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o composto AL-SCH₃ (1). δ (ppm): 7,43-7,47 (d, 2H; **H9 e H10**), 7,35 (s largo, 1H; **H8**), 7,20-7,24 (m, 2H; **H11 e H12**), 3,57 (m, 1H; **H3**), 3,13 (m, 1H; **H1**), 2,49 (s, 3H; **H13**), 2,41 (m, 1H; **H2'**), 2,31 (t, 2H; **H7**), 1,99-1,50 (m, **7H; H2'', H4, H5 e H6**).....90

Figura 45 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o composto AL-SCH₃ (1). δ (ppm): 16,83 (**C15**), 25,43 (**C6**), 29,04 (**C5**), 34,80 (**C4**), 38,67(**C7**), 39,52 (**C1**), 40,44 (**C2**), 56,58 (**C3**), 120,72 (**C10 e C14**), 128,05 (**C11 e C13**), 133,74 (**C9**), 135,63 (**C12**), 171,33 (**C8**).....91

Figura 46 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o composto AL-Bn (3). δ (ppm): 7,26-7,37 (m, 5H; **H10-H14**), 5,91 (s largo, 1H; **H8**), 4,41 (d, 2H; **H9**), 3,59 (m, 1H; **H3**), 3,12 (m, 2H; **H1**), 2,49 (m, 1H; **H2'**), 2,18 (t, 2H; **H7**), 1,97-1,52 (m, 7H; **H2'', H4, H5, H6**).92

Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o composto LA-Be (3). δ (ppm): 25,57 (**C6**); 29,05 (**C5**); 34,78 (**C4**); 36,58 (**C7**); 38,64 (**C1**); 40,39 (**C2**); 43,76 (**C9**); 56,57 (**C3**); 127,66 – 128,87 (**C11 a C15**); 138,50 (**C10**); 172,72 (**C8**).93

Figura 48 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, MeOD) para o composto AL-OH (4). δ (ppm): 7,32-7,36 (m, 2H; **H9 e H10**), 6,74-6,78 (m, 2H; **H11 e H12**), 3,57 (m, 1H; **H3**), 3,32 (s largo, 1H; **H13**), 3,14 (m, 2H; **H1**), 2,53 (t, 2H; **H7**), 2,40 (m, 1H; **H2'**), 1,96-1,56 (m, 7H; **H2'', H4, H5, H6**).94

Figura 49 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, MeOD) para o composto LA-OH (4). δ (ppm): 26,74 (**C6**); 29,93 (**C5**); 35,79 (**C7**); 37,63 (**C4**); 39,37 (**C1**); 41,33 (**C2**);

57,58 (C3); 116,25 (C11 e C13); 123,52 (C10 e C14); 131,70 (C9); 155,36 (C12); 174,15 (C8).95

Figura 50 – Proteção frente à peroxidação lipídica (%). (-○-) AL (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (-■-) AL-NHS (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (-▲-) AL-OH (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (-□-) AL-SCH₃ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (-◀-) AL-Bn (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (-*-) amina NH₂PhOH (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (-●-) Trolox (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) como controle positivo, (-△-) Tampão fosfato + AAPH; (-◇-) Tampão fosfato + metanol usados como controles negativos.97

Figura 51 – Proteção contra a peroxidação (%) da amida AL-OH em diferentes concentrações: (-■-) AL-OH (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (-■-) AL-OH (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (-■-) AL-OH (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (-■-) AL-OH (12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e (-■-) Tampão fosfato + metanol.98

Figura 52 – (A) Tampão fosfato pH 7,4, (B) Voltamograma cíclico para o ácido lipóico ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso - Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, (C) Proposta de mecanismo para a oxidação do ácido lipóico.99

Figura 53 - a) Análise da corrente de pico ($I_{p_{c1}}$), para a onda de oxidação do ácido lipóico em função de $v^{1/2}$ 100

Figura 54 - Voltamograma cíclico para a amida AL-OH ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso metanólico (20%) tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 101

Figura 55 – (A) Voltamograma cíclico para a amida AL-OH ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso metanólico (20%) tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (a limpeza do eletrodo foi realizada antes de cada varredura), (B) Proposta de mecanismo de oxidação da amida LA-OH. 102

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Atividade antineoplásica das pterocarpanoquinonas LQB 118, 149, 150 e 151 em linhagens de células K562 e HL-60 (IC_{50} em μM).41
- Tabela 2 – Atividade antineoplásica das pterocarpanoquinonas LQB 118 e LQB-149, em diversas linhagens de células (IC_{50} em μM).42
- Tabela 3 – Efeito citotóxico dos compostos LQB-118 e LQB-149 em células PBMC ativadas por PHA (IC_{50} em μm). Índice de seletividade.43
- Tabela 4 – Principais parâmetros eletroquímicos para LQB-118 e seus derivados. Eletrodo de carbono vítreo, E vs. $Ag|AgCl|Cl^-$ (sat.), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e valores das respectivas constantes de Hammett.....69
- Tabela 5 – Potenciais de redução para LQB-118 e seus derivados em voltametria de pulso diferencial. Eletrodo de carbono vítreo, E vs. $Ag|AgCl|Cl^-$ (sat.), $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$72
- Tabela 6 – Valores de log P calculados utilizando-se o programa ACDLabs 6.0 para o ácido lipóico e para as amidas derivadas.96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
CAT	Catalase
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
IC ₅₀	Concentração média inibitória
d	Dupleto
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
DHLA	Ácido di-hidrolipóico
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDAC	cloridrato de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilcarbodiimida
Ep	Potencial de pico
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
Et ₃ N	Trietilamina
FAD	Flavina dinucleotídeo
GPx	Glutaciona peroxidase
Gred	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
AL	Ácido lipóico
LUMO	Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia
m	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótideo de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADPH	Fosfato de dinucleótideo de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	Fosfato de dinucleótideo de nicotinamida e adenina oxidase

RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
S	Singleto
ssDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita simples
SOD	Superóxido dismutase
T	Tripleto
TBAPF ₆	Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
XO	Xantina-oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Substâncias de interesse biológico	21
1.1.1 Ácido lipóico e derivados.....	21
1.1.2 LQB-118 e seus derivados – o caso das pterocarpanoquinonas biologicamente ativas.....	29
1.1.2.1 Quinonas.....	29
1.1.2.2 Pterocarpanos.....	35
1.2 Biossensores eletroquímicos de DNA: avaliação da interação fármaco-DNA	44
2 OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo geral	47
2.2 Objetivos específicos	47
3 EXPERIMENTAL	48
3.1 PARTE I	48
3.1.1 Reagentes e solventes.....	48
3.1.2 Estudos eletroquímicos.....	49
3.1.3 Estudos em meio aprótico.....	50
3.1.4 Estudos em meio aprótico em presença de oxigênio.....	50
3.1.5 Estudos em meio prótico.....	51
3.1.6 Estudos da interação da LQB-118 com DNA por voltametria de pulso diferencial (VPD).....	51
3.1.6.1 Preparação da solução tampão acetato.....	51
3.1.6.2 Preparação do gel de dsDNA.....	51
3.1.6.3 Preparação e condicionamento do biossensor de dsDNA.....	51
3.1.6.4 Preparo da solução de ssDNA pelo método ácido-base.....	52
3.1.6.5 Estudo da interação da LQB-118 com ssDNA.....	52
3.2 PARTE II	53
3.2.1 Métodos gerais.....	53
3.2.2 Purificação e secagem de solventes e reagentes.....	53
3.2.3 Descrição dos experimentos de síntese.....	54
3.2.3.1 Preparação da amida AL-SCH ₃ (1).....	54
3.2.3.2 Preparação do éster ativado derivado do ácido lipóico AL-NHS.....	55

3.2.3.3 Preparação da amida AL-Bn (3).....	56
3.2.3.4 Preparação da amida AL-OH (4).....	57
3.2.4 Avaliação da atividade antioxidante por peroxidação lipídica.....	58
4 RESULTADOS.....	60
4.1 PARTE I.....	60
4.1.1 Pterocarpanoquinonas.....	60
4.1.2 Estudo em meio aprótico da LQB-118 e seus derivados por voltametria cíclica.....	61
4.1.3 Estudo em meio aprótico da LQB-118 e seus derivados por voltametria de pulso diferencial (VPD).....	70
4.1.4 Estudo em meio aprótico da LQB-118 e seus derivados em presença de oxigênio.....	72
4.1.5 Estudo em meio prótico da LQB-118 e seus derivados por voltametria cíclica.....	76
4.1.6 Estudo da interação da LQB-118 com biossensor de DNA utilizando VPD	78
4.2 PARTE II.....	82
4.2.1 Síntese das amidas derivadas do ácido lipóico.....	82
4.2.2 Caracterização do estér ativado e amidas derivadas do ácido lipóico.....	85
4.2.2.1 Ácido lipóico (AL).....	85
4.2.2.2 2,5-dioxopirrolidin-1-il-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato (AL-NHS).....	87
4.2.2.3 5-(1,2-ditiolan-3-il-N-(4-metiltio)-fenil-pentanamida (AL-SCH ₃).....	89
4.2.2.4 N-benzil-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamida (AL-Bn).....	91
4.2.2.5 5-(1,2-ditiolan-3-il)-N-(4-hidroxifenil)pentanamida (AL-OH).....	93
4.2.3 Ensaio de peroxidação lipídica.....	95
4.2.4 Estudo eletroquímico em meio prótico do AL e AL-OH.....	99
5 CONCLUSÃO.....	103
PERSPECTIVAS.....	104
REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

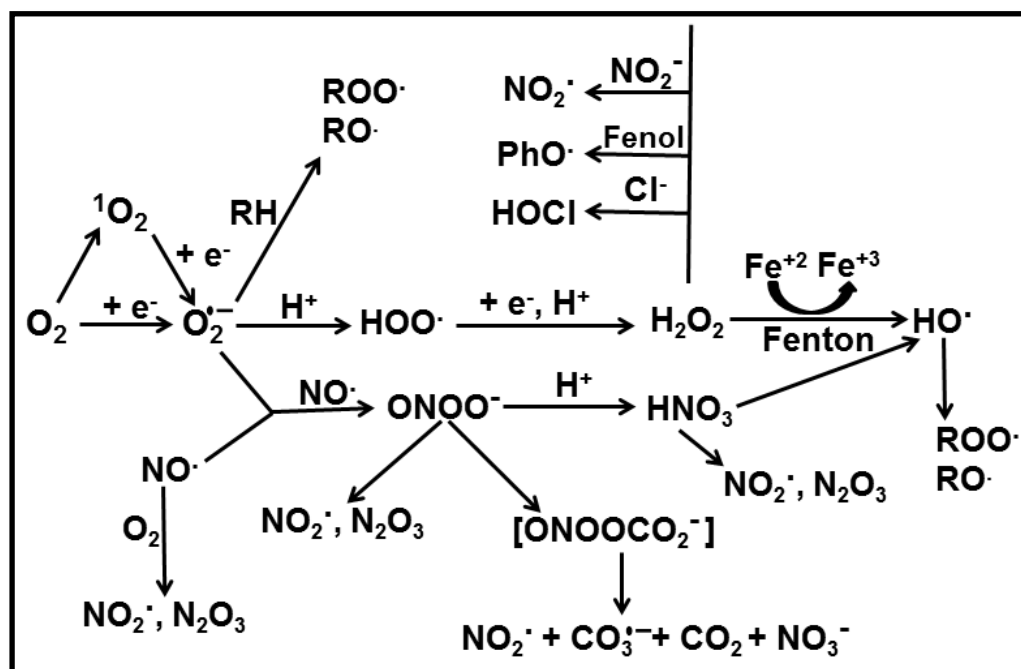
O estudo das reações que envolvem a transferência de elétrons é relevante para o entendimento de vários processos que acontecem no meio biológico, como por exemplo, a respiração celular, a neurotransmissão e a fotossíntese. Esses e vários outros processos são governados ou estimulados por reações oxidorreduativas, as quais garantem funções vitais e a integridade celular. A eletroquímica também auxilia no planejamento de compostos biologicamente ativos e pode ser uma ferramenta útil para a determinação de seus mecanismos de ação, os quais, muitas vezes envolvem ativação biorredutiva ou biooxidativa, a transferência de elétrons ao oxigênio, através da geração não balanceada de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN), configurando um quadro de estresse oxidativo (HILLARD et al., 2008).

Espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e outras espécies reativas (Figura 1), são produtos do metabolismo celular normal e são observadas em diversas condições fisiológicas, tais como, na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor, na apoptose, no controle da pressão sanguínea, entre outros (VASCONCELOS et al., 2007). Tanto a geração de ERO, quanto de ERN, têm despertado grande interesse devido ao papel biológico duplo que apresentam (VALKO et al., 2006). Dependendo da sua concentração, podem ser benéficos ou prejudiciais para as células e tecidos. Em baixos níveis fisiológicos, funcionam como "mensageiros redox", na sinalização intracelular e regulação (CIRCU; AW, 2010); já, em altas concentrações, podem causar dano oxidativo em biomoléculas (lípidios, proteínas, DNA), levando, conseqüentemente, a muitas doenças crônicas, tais como aterosclerose, câncer, diabetes, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares, inflamação crônica, acidente vascular cerebral, outras doenças degenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, além do envelhecimento (UTTARA et al., 2009). A figura 1 mostra a geração das principais espécies reativas atuantes no meio biológico.

Quando o sistema de defesa detecta alterações nos níveis de espécies reativas, as células desencadeiam mecanismos de desintoxicação, através dos agentes antioxidantes intracelulares a fim de controlar e reestabelecer a homeostase redox. Porém, quando ocorre uma persistência do ciclo redox ou quando os

mecanismos de proteção não são suficientes para garantir este equilíbrio, há aumento intracelular dos oxidantes promovendo o estresse oxidativo (CIRCU; AW, 2010; DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; VASCONCELOS et al., 2007). Define-se o estresse oxidativo como um desequilíbrio entre espécies pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes (HALLIWELL, 2006), levando a mudanças na sinalização e controle redox e, conseqüentemente, causando danos a moléculas biologicamente importantes (JONES, 2006), como o DNA, proteínas, lipídios e açúcares.

Figura 1 – Geração das principais espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e outras.

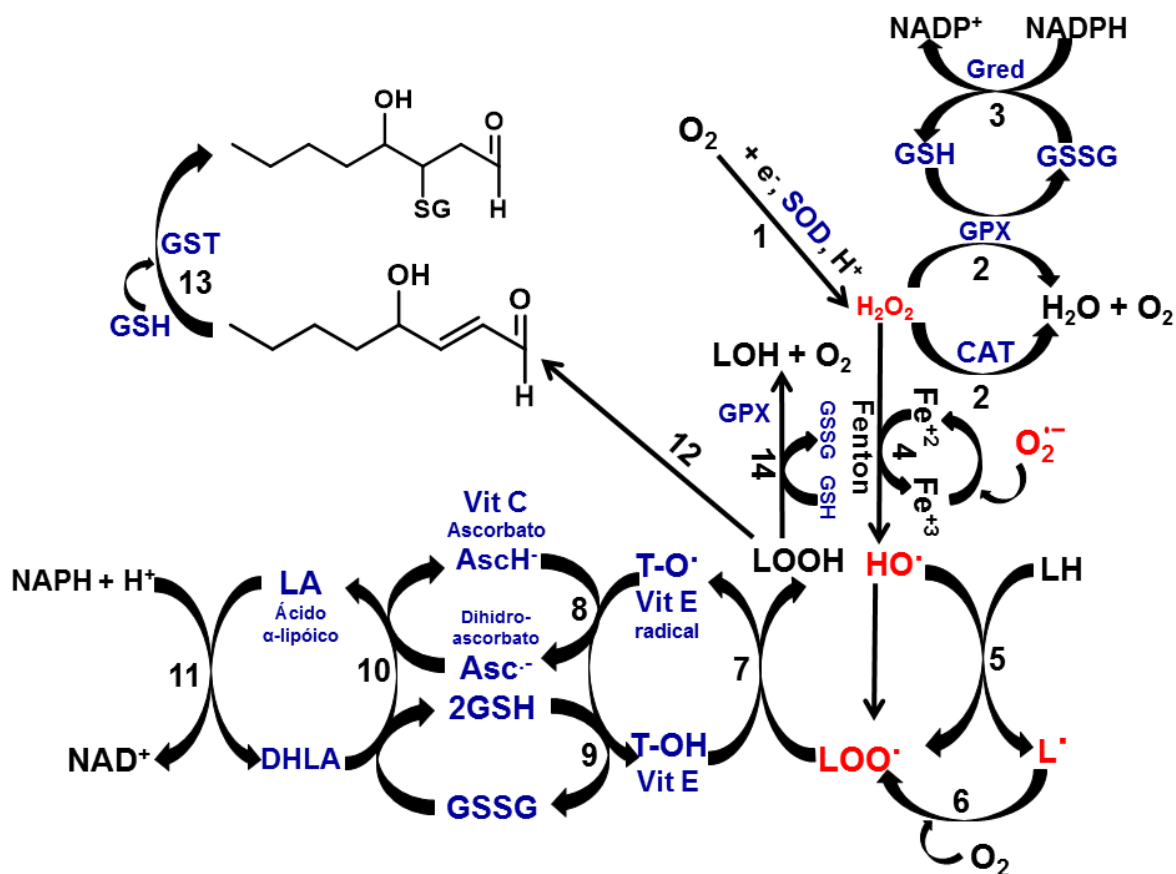


Fonte: Adaptado de HILLARD et al., 2008.

Como já mencionado, o efeito prejudicial das ERO, ERN e outras espécies reativas pode ser controlado pela ação de antioxidantes enzimáticos como, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e não-enzimáticos, tais como as vitaminas – E (tocoferóis), C (ácido ascórbico), A (carotenóides); tióis – glutathione reduzida (GSH) e ácido lipóico (AL); minerais – selênio, cobre, manganês e zinco; flavonóides; fitoquímicos; coenzima Q, polifenóis (CHOUDHARI et al., 2014), entre outros. As diversas formas de atuação antioxidante no controle do estresse oxidativo são mostradas na figura 2. Observa-se na reação 1, que o ânion radical superóxido formado a partir do oxigênio molecular sofre dismutação pela enzima superóxido dismutase (SOD), convertendo-

se a peróxido de hidrogênio, o qual é eliminado mais eficientemente pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) que requer GSH como doador de elétrons, ou também pode ser convertido em água e oxigênio molecular pela enzima catalase (reação 2). Para que a glutathiona oxidada (GSSG) seja reduzida de volta a GSH, pela ação da enzima glutathiona redutase (Gred), faz-se necessário utilizar NADPH como doador de elétrons, como mostrado na reação 3. Além disso, alguns metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} , Cu^+ e outros) podem quebrar o peróxido de hidrogênio ao radical reativo hidroxila (reação de Fenton) (reação 4) e esta espécie pode abstrair um elétron de ácidos graxos poli-insaturados (LH) para dar origem a radicais lipídicos centrados no carbono (L^{\cdot}) (reação 5). O radical lipídico (L^{\cdot}) pode posteriormente interagir com o oxigênio molecular para gerar um radical peroxila lipídico (LOO^{\cdot}) (reação 6), se o radical peroxila lipídico LOO^{\cdot} resultante não for reduzido pelo uso de antioxidantes, o processo de peroxidação lipídica ocorre. A reação 7 mostra que o radical peroxila lipídico (LOO^{\cdot}) pode ser reduzido dentro da membrana por uma forma reduzida da vitamina E (T-OH), resultando na formação de um hidroperóxido lipídico e um radical de vitamina E (TO^{\cdot}), ao passo que, na reação 8 durante o processo de regeneração da vitamina E pela vitamina C, o radical de vitamina E (TO^{\cdot}) é reduzido novamente à vitamina E (T-OH) pelo ácido ascórbico (a forma fisiológica de ascorbato é a espécie monoaniônica ascorbato, AscH^-) gerando o radical ascorbila (Asc^{\cdot}). Na regeneração da vitamina E pela GSH, o radical da vitamina E oxidada (TO^{\cdot}) é reduzido por GSH (reação 9) e a glutathiona oxidada (GSSG) e o radical ascorbila (Asc^{\cdot}) são reduzidos de volta para GSH e à espécie ascorbato monoaniônica, AscH^- , respectivamente, por ação do ácido diidrolipóico (ADHL), que é convertido em ácido lipóico (AL) (reação 10). Observa-se, ainda, na reação 11, a possibilidade de regeneração do ADHL a partir do AL usando NADPH. Os hidroperóxidos lipídicos podem decompor-se em aldeídos, tais como o forte oxidante 4-hidroxinonal (reação 12), o qual é transformado em um aduto inócuo glutatiolado pela atuação da glutathiona S-transferase (GST), uma forma da GPx independente de selênio, através de uma adição de Michael (reação 13). Além disso, os hidroperóxidos lipídicos podem ser reduzidos a alcoóis e oxigênio molecular pela GPx, usando GSH como doador de elétrons (VALKO et al., 2006).

Figura 2 – O papel da glutatona e outros antioxidantes no controle do estresse oxidativo (equações não balanceadas).



Fonte: Adaptado de VALKO et al., 2006.

Alguns antioxidantes realizam suas funções no ambiente hidrofílico da célula, outros no meio lipofílico e alguns em ambos. A vitamina C reage com o ânion radical superóxido na fase aquosa, enquanto que a vitamina E desempenha seu papel na fase hidrofóbica. Já o ácido lipóico, por ser solúvel tanto em água quanto em gorduras, funciona tanto nas membranas celulares (predominantemente lipofílicas) quanto no citosol (meio hidrofílico) (VALKO et al., 2006).

1.1 Substâncias de interesse biológico

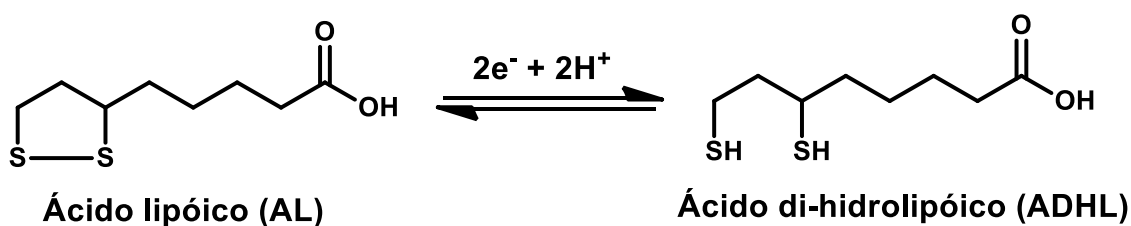
1.1.1 Ácido lipóico e derivados

O ácido lipóico é um composto natural, sintetizado nas mitocôndrias a partir do ácido octanóico e funciona como um co-fator de desidrogenases em complexos multienzimáticos associadas com o ciclo do ácido cítrico (ÇAKATAI, 2005),

desempenhando, portanto, um importante papel no metabolismo energético mitocondrial (KOUFAKI, 2009).

Exogenamente, o AL é facilmente absorvido da dieta, transportado para os tecidos e rapidamente convertido em sua forma reduzida, o ácido di-hidrolipóico (ADHL) (Figura 3) (KOUFAKI, 2009; VALKO et al., 2006). A potente atividade antioxidante deste composto é atribuída ao ADHL, onde os grupos sulfidríla atuam similarmente ao grupo $-SH$ da glutatona ou cisteína e ajudam na redução dos radicais livres por fornecimento de H radicalar ou um elétron (HARDAS et al., 2013). Vale destacar que, devido ao potencial de redução, muito negativo, o par redox AL/ADHL ($-0,29\text{ V vs NHE}$) atua como um forte agente redutor, sendo, em condições fisiológicas, menos eficiente apenas que o par redox $NAD(P)H/NAD(P)^+$ ($-0,32\text{ V vs NHE}$) (BILSKA; WLODEK, 2005).

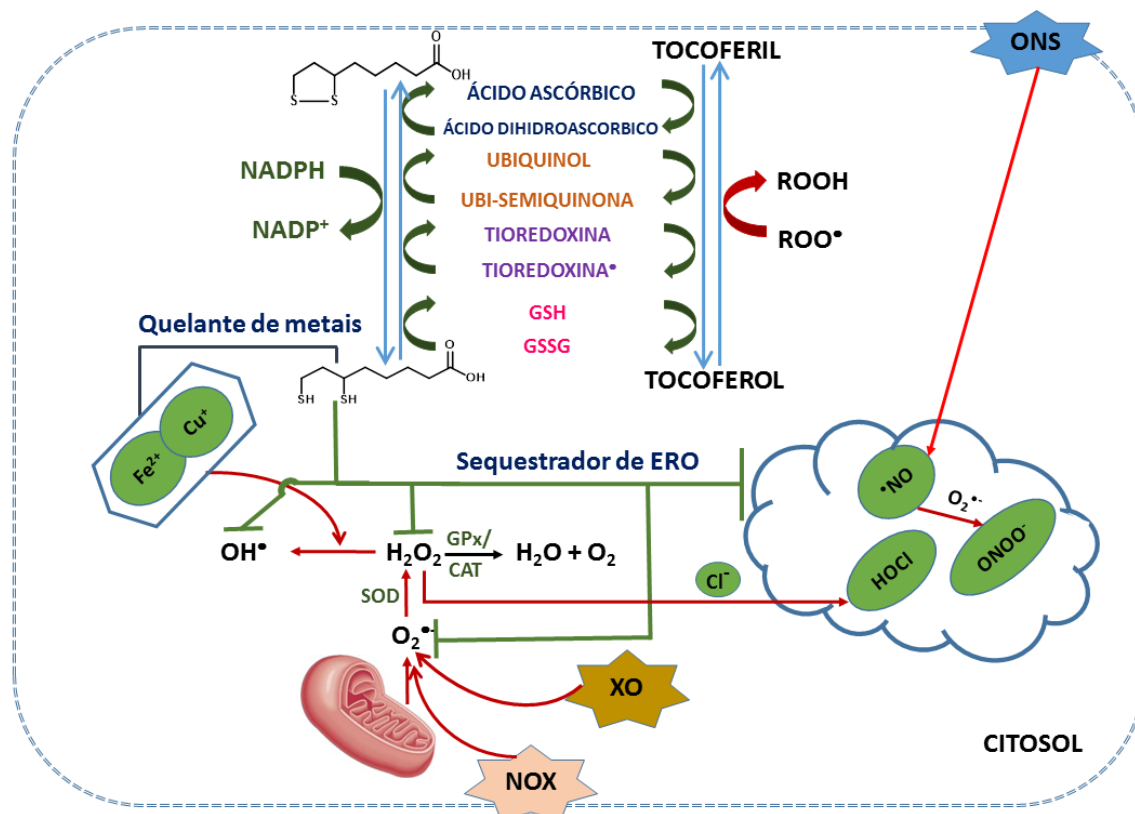
Figura 3 – Comportamento redox: ácido lipóico (AL) - ácido di-hidrolipóico (ADHL).



Fonte: Adaptado de KOUFAKI, 2009 e VALKO et al., 2006.

De modo geral, a atuação antioxidante proporcionada pelo par AL/ADHL pode ser resumida nas seguintes funções: controle e regulação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através de reações com radicais superóxido, hidroxila, peroxila e oxigênio singlete, comportando-se como um sequestrador de ERON; regeneração de antioxidantes endógenos e exógenos, como tocoferol, ácido ascórbico, ubisemiquinona, tioredoxina e glutatona reduzida, aumentando seus níveis intracelulares; quelação de metais, incluindo o Cu^{+2} e o Fe^{+2} , além da reparação de proteínas oxidadas (VALKO et al., 2006), como mostrado na Figura 4. As linhas em verde representam o sequestro de ERON e as linhas em vermelho representam a produção dessas espécies.

Figura 4 – Vias de atuação do ácido lipóico (AL).



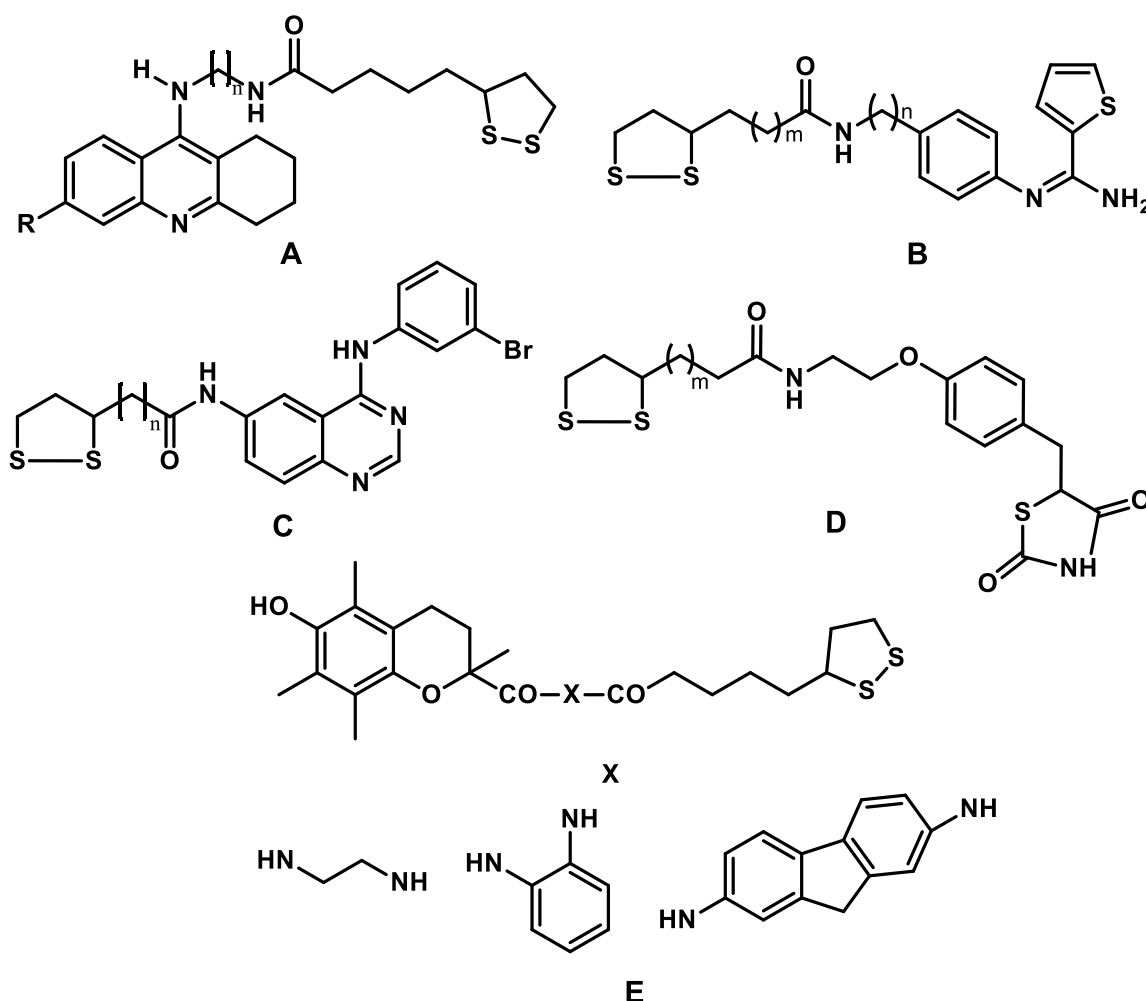
Fonte: Adaptado de Moura, 2014 (comunicação pessoal).

Devido a estas propriedades, vários estudos mostram que o ácido lipóico está sendo indicado para o tratamento de diversas doenças crônicas que direta ou indiretamente estão relacionadas ao estresse oxidativo, tais como enfermidades hepática e renal (ABDEL-ZAHER et al., 2008); diabetes (DE OLIVEIRA et al., 2011; HENRIKSEN, 2006; PACKER et al., 2001); doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (HARDAS et al., 2013; HOLMQUIST et al., 2007); doenças cardiovasculares (HE et al., 2012; SOKOLOWSKA et al., 2014); inflamatórias, como a colite ulcerativa (TRIVEDI; JENA, 2013); diversos tipos de neoplasias malignas tais como o câncer de mama (DOZIO et al., 2010; LEE et al., 2010; ROSSI et al., 2008) e leucemia (PACK et al., 2001). Mais recentemente, estudos indicam que o AL pode ter efeito preventivo e/ou curativo em desordens neuropsiquiátricas, como distúrbios de esquizofrenia (DESLAURIERS et al., 2014) e autismo (GHANIZADEH, 2012).

No entanto, ele exerce a maioria dos seus efeitos em concentrações micromolares elevadas (2,0 – 2,5 mM) (KOUFAKI et al., 2009). No homem, a administração de uma dose oral única de 600 mg eleva a concentração plasmática

de AL de 10 para 25 μM . Para a atividade anti-hiperglicêmica, por exemplo, essa variação de concentração não se traduz em qualquer efeito. Duas razões possíveis são mencionadas para explicar o efeito marginal de uma dose oral de AL sobre os níveis de glicose no sangue: curto tempo de meia-vida (30 min) e baixa biodisponibilidade (30%) (GRUZMAN et al., 2004). Devido a isso, o planejamento e a síntese de moléculas híbridas derivadas do ácido lipóico têm sido uma interessante fonte de pesquisa. Em um artigo de revisão publicado em 2009, Koufaki et al. enfatizaram que conjugados derivados do AL, além de possuir atividade antioxidante mostraram uma grande variedade de outras atividades, tais como: neuroprotetora, cardioprotetora, antiproliferativa, anti-inflamatória, antidiabética, entre outras (Figura 5).

Figura 5 – Exemplos de derivados do ácido lipóico.



Fonte: ROSINI et al., 2005; HARNETT et al., 2002; KOUFAKI et al., 2001; KOUFAKI et al., 2001.

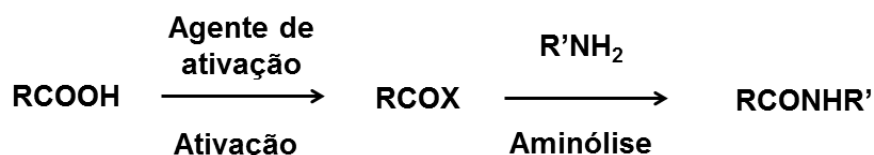
De maneira geral, amidas de AL exibem atividade biológica mais elevada do que o composto original, além disso, as combinações moleculares (híbridos) obtidas por acoplamento de AL com uma porção bioativa amino-substituída, podem apresentar atividade multifuncional (KOUFAKI et al., 2009).

A lipocrina (Figura 5A – n = 3 e R = Cl) é o exemplo mais promissor dos compostos híbridos sintetizados por Rosini e colaboradores (2005) para serem avaliados frente à atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) e a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em células neurais. Os valores de IC₅₀, que neste caso, representam a concentração necessária para inibir a atividade enzimática da AChE em 50%, demonstram que a proposta de combinação molecular foi extremamente positiva. O IC₅₀ para os protótipos tacrina e ácido lipóico foram, respectivamente, 424 nM e $>1.10^{-7}$ nM, enquanto que para a lipocrina (Figura 5A – n = 3 e R = Cl), o IC₅₀ foi de 0,253nM. Além de inibir a atividade catalítica da acetilcolinesterase (AChE), a lipocrina também protege as células neurais da ação das espécies reativas de oxigênio, sendo um composto promissor para novos fármacos anti-Alzheimer (ROSINI et al., 2005). O composto mostrado na Figura 5B, obtido pela hibridação molecular do ácido lipóico com fenilaminas é capaz de proteger as células neurais contra a citotoxicidade do glutamato e previne a perda de glutathiona intracelular.(HARNETT et al., 2002). Estudos de Koufaki et al., 2001 mostraram que quando o ácido lipóico e trolox foram conectados para formar amidas, usando aminas alifáticas ou aromáticas (Figura 5E), todos os compostos testados eram potentes inibidores da peroxidação lipídica em membranas de fígado de ratos induzidas por íons ferrosos e ascorbato. Os valores de IC₅₀ deixam claro que a proteção foi consideravelmente melhorada após a combinação molecular, visto que para o trolox o IC₅₀ foi 24,8 µM, para o ácido lipóico foi maior que 1000 µM e para os derivados esse valor variou de 0,06 a 2,58 µM.

Esses exemplos evidenciam o relevante papel que amidas desempenham na Química Medicinal, além disso, muitos dos fármacos já utilizados em clínica médica apresentam esta função orgânica, fato que desperta cada vez mais o interesse pela síntese de amidas. As amidas são tipicamente sintetizadas a partir da condensação de ácidos carboxílicos com aminas. Porém, a reação entre esses dois grupos funcionais não ocorre espontaneamente à temperatura ambiente, sendo

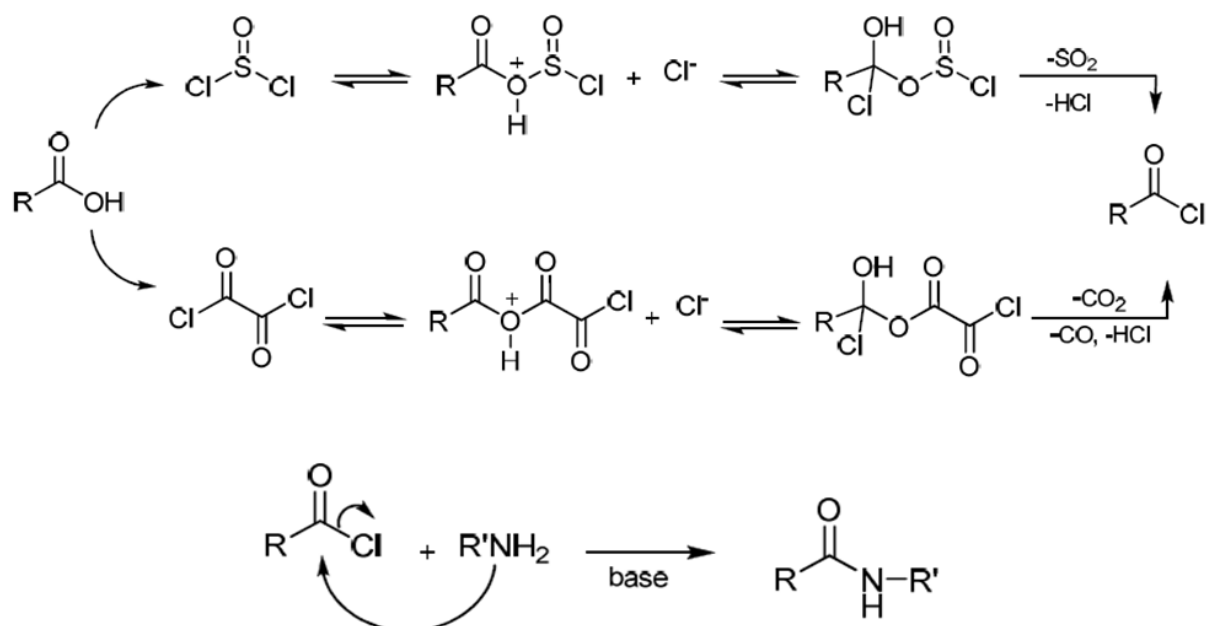
necessário um aquecimento vigoroso (160-180°C) e inviável, uma vez que altas temperaturas podem prejudicar a integridade dos substratos. Por esta razão, normalmente opta-se por ativar o ácido carboxílico, num processo que geralmente ocorre convertendo a hidroxila do ácido em um bom grupo abandonador antes do tratamento com a amina (Figura 6). Uma metodologia amplamente utilizada é a conversão do ácido carboxílico em cloreto de acila na presença de cloreto de tionila (SOCl_2), cloreto de oxalila (COCl_2), tricloreto de fósforo (PCl_3), oxicloreto de fósforo (POCl_3) ou pentacloreto de fósforo (PCl_5). Após a formação do cloreto de acila, a síntese da amida ocorre pela adição da correspondente amina ao meio reacional. Bases adicionais, como a trietilamina, são usualmente utilizadas para neutralizar o HCl formado e evitar a conversão da amina em seu sal não reativo (Figura 7).

Figura 6 – Princípio do processo de ativação para formação da ligação amida.



Fonte: MONTALBETTI; FALQUE, 2005.

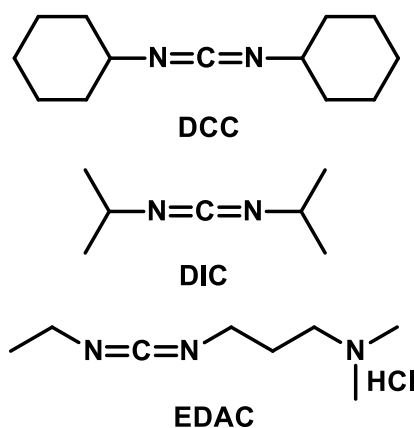
Figura 7 – Mecanismo de formação do cloreto de acila utilizando cloretos de tionila e de oxalila e posterior aminólise do cloreto de acila.



Fonte: MONTALBETTI; FALQUE, 2005.

Outra estratégia utilizada para ativar os ácidos carboxílicos é através dos chamados reagentes de acoplamento que atuam como agentes desidratantes e convertem o ácido carboxílico em grupos funcionais mais reativos, tais como os cloretos de ácido, anidridos ou ésteres (VALEUR; BRADLEY, 2008) para posterior reação com os nucleófilos. Os reagentes de acoplamento frequentemente usados para a síntese de amidas, anidridos ou ésteres são as carbodiimidas (Figura 8), por apresentar condições brandas e um protocolo experimental simples, preservando a integridade dos centros assimétricos (MONTES D'OCA, 2010).

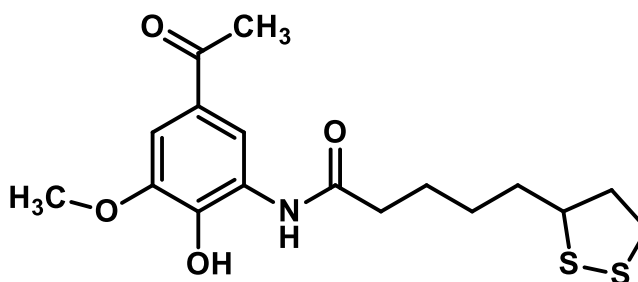
Figura 8 – Exemplos de carbodiimidas comumente usadas na síntese de amidas, anidridos e ésteres.



Fonte: Autora, 2014.

Lu et al., 2011 sintetizaram uma amida derivada do ácido lipóico (Figura 9), utilizando EDAC como reagente de acoplamento. Em seu trabalho, o autor descreve a reação entre um derivado de apocinina previamente sintetizado e o ácido lipóico com emprego de HOBt (1-hidroxibenzotriazol) na síntese da amida. Este derivado apresentou efeito protetor mais potente em citotoxicidade, evidenciando que o acoplamento do ácido lipóico com o derivado da apocianina é uma estratégia válida para melhorar a atividade biológica dos precursores.

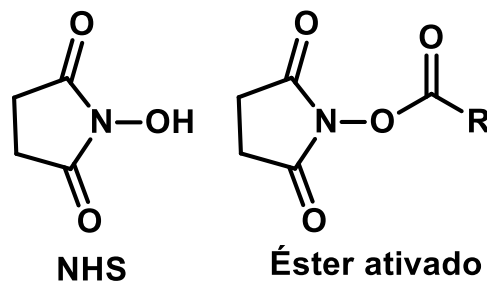
Figura 9 – Estrutura da amida derivada do ácido lipóico.



Fonte: LU et al., 2011.

Alguns ésteres ativados tais como ésteres aromáticos são geralmente mais fáceis de hidrolisar que os ésteres de alquila e são propensos a reagir com uma grande variedade de nucleófilos. Eles reagem facilmente com aminas, em condições suaves, e tendem a minimizar o processo de racemização. Ésteres de *N*-hidroxisucínimida (NHS) (Figura 10), no entanto, oferecem uma alternativa interessante, uma vez que são solúveis em água e, por conseguinte, sua eliminação na etapa de elaboração é mais fácil.

Figura 10 – Estrutura do NHS e estrutura genérica do éster ativado formado.



Fonte: MONTALBETTI; FALQUE, 2005.

Neste contexto, uma parte deste trabalho relata a síntese de novas amidas a partir da reação do ácido lipóico com aminas aromáticas, para serem avaliadas quanto ao seu efeito antioxidante protetor contra a peroxidação de lipídios e análise de seu perfil eletroquímico.

1.1.2 LQB-118 e seus derivados – O caso das pterocarpanoquinonas biologicamente ativas

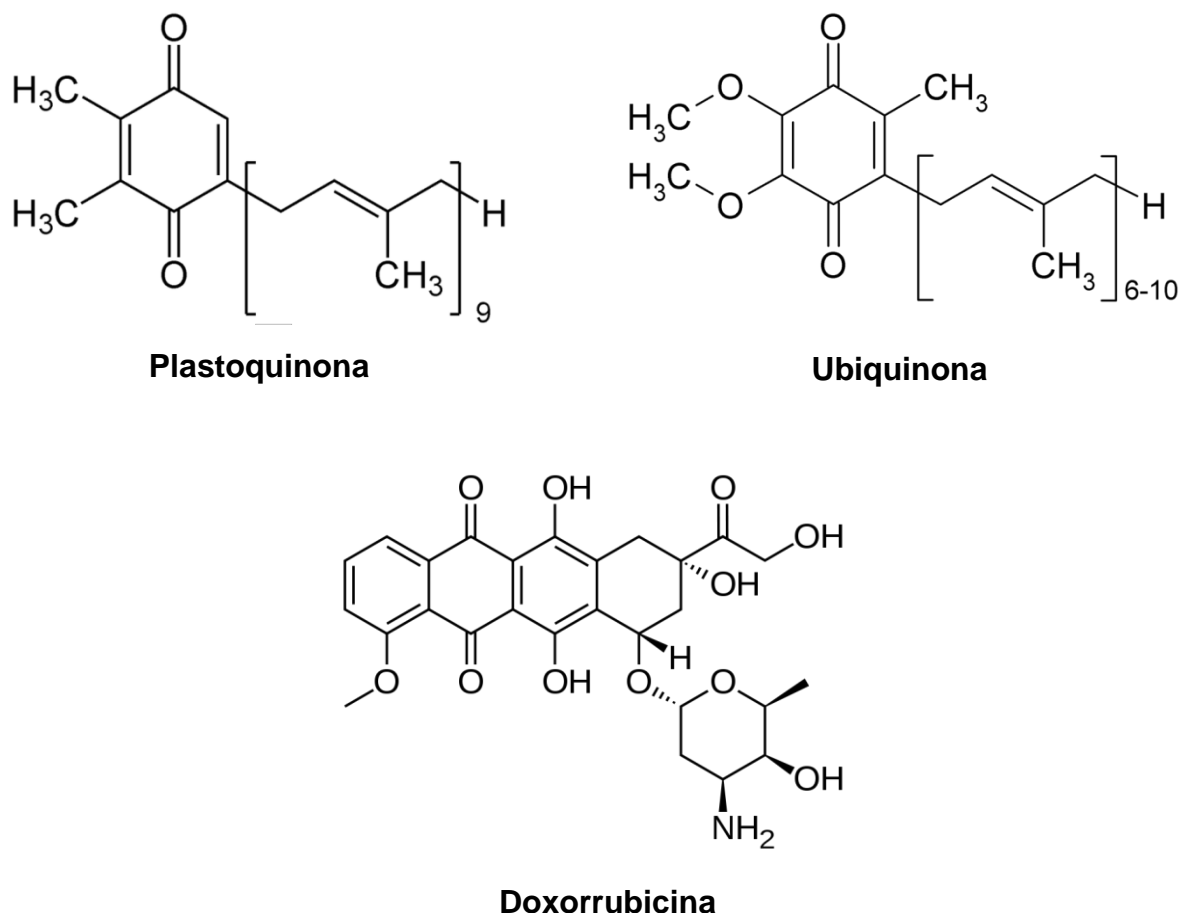
A busca por fármacos cada vez mais eficazes e seletivos leva pesquisadores a sintetizarem novos compostos com grupos funcionais reconhecidamente ativos, tais como as quinonas e pterocarpanos, e/ou promover mudanças estruturais em compostos cuja atividade biológica já é conhecida a fim de intensificá-la. (FERREIRA, 2013). Um planejamento racional é relevante para a síntese de possíveis candidatos a fármacos. A escolha dos grupos ativos, bem como dos substituintes é crucial, pois é isso que vai determinar as atividades farmacológicas, além disso, a relação estrutura/atividade contribui significativamente para a compreensão do mecanismo de ação destes compostos. O segundo grupo de compostos, objeto de estudo do presente trabalho, são as chamadas pterocarpanoquinonas, que também são resultantes de combinações moleculares e possuem em sua estrutura uma porção quinonoídica e uma porção oriunda de pterocarpanos. Para melhor compreender a importância da hidratação molecular, faz-se necessário, inicialmente, uma explanação geral da atuação desses compostos isoladamente.

1.1.2.1 Quinonas

As quinonas têm sido amplamente estudadas devido às suas propriedades únicas e vários papéis fisiológicos/biológicos relevantes. Elas estão amplamente distribuídas na natureza e envolvidas em processos bioquímicos vitais para plantas e animais, principalmente nos níveis da cadeia de transporte de elétrons e da fotossíntese (EL-NAJJAR, 2011; DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; KISHIKAWA; KURODA, 2014). Como exemplo, pode-se citar a plastoquinona que está envolvida nas reações fotossintéticas, a ubiquinona que funciona como carreadora de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, sendo fundamental na respiração celular e produção de energia aeróbia, a vitamina K que desempenha um papel benéfico na coagulação do sangue, metabolismo e crescimento dos ossos. Além destes papéis biológicos, quinonas têm aplicação clínica e industrial, por exemplo, a doxorubicina, uma antraquinona, tem sido amplamente utilizada no tratamento de tumores malignos e, ainda, derivados de

antraquinona representam uma grande classe de corantes e pigmentos (KISHIKAWA; KURODA, 2014) (Figura 11).

Figura 11 – Exemplos de quinonas biologicamente importantes.



Fonte: Autora, 2014.

Apesar dos vários efeitos benéficos acima mencionados, quinonas também são consideradas como uma classe de toxinas que podem causar uma variedade de efeitos nocivos sobre as células vivas, incluindo a citotoxicidade aguda, imunotoxicidade e carcinogênese (BOLTON et al., 2000; KISHIKAWA; KURODA, 2014). É justamente esse comportamento duplo que confere a essa classe de compostos uma peculiaridade de grande interesse para os pesquisadores, especialmente na Química Medicinal.

As naftoquinonas são consideradas privilegiadas em química medicinal (FERREIRA et al., 2013; DA SILVA et al., 2002; SALAS et al., 2008). Destacam-se, nestes compostos, anéis redox acoplados a variados sistemas heterocíclicos

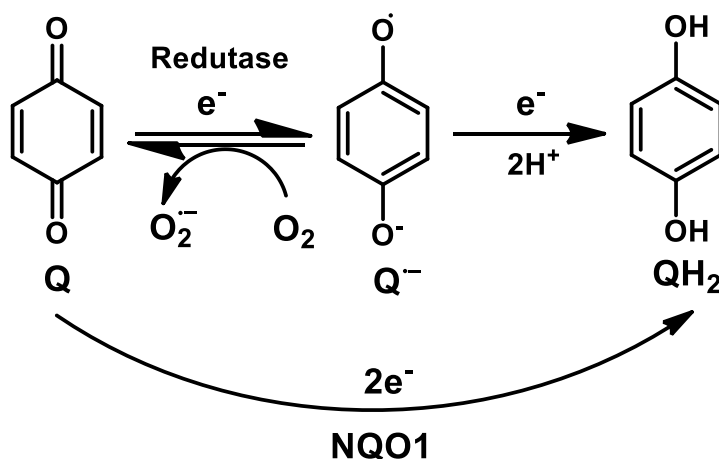
(furânico, pirânico, pirrólico, etc.), normalmente nas posições 1,4; 2,3 ou 3,4 do anel naftalênico, indicando sua importância na bioatividade (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003). Em estudos farmacológicos, as quinonas apresentam variadas e potentes atividades biológicas tais como laxante, antineoplásica, mutagênica, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antifúngica, antibacteriana, protozoocida e moluscicida (BERNARDO et al., 2011; DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; EL-NAJJAR et al., 2011; MARTINEZ; BENITO, 2005; KUMAGAI et al., 2012).

No ambiente celular, quinonas podem ser metabolizadas via redução de um elétron para formar o ânion radical semiquinona ($Q^{\cdot-}$), ou via redução de dois elétrons para formar hidroquinonas. A redução de um elétron é catalisada por enzimas redutases como NADPH citocromo P-450 redutase, tendo como mediador redox a flavina dinucleotídeo (FAD); citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase. Dependendo do potencial de redução da quinona, este processo pode ser cineticamente facilitado ou dificultado. Em condições aeróbias, as semiquinonas reduzem o oxigênio molecular ao ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual desencadeará uma série de reações importantes. Na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), o $O_2^{\cdot-}$ é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar do H_2O_2 não ser um radical livre, é uma substância muito reativa, podendo, também, promover a oxidação de algumas biomoléculas. Além disso, este ânion-radical superóxido por catálise com metais de transição (reação de Fenton), ou por reação com H_2O_2 (reação de Harber-Weiss), gera HO^{\cdot} no interior da célula (Figura 13). Vale salientar que HO^{\cdot} e H_2O_2 são os principais responsáveis pelo estresse oxidativo celular e a adição do radical hidroxila (HO^{\cdot}) na dupla hélice do DNA é rapidíssima, provocando danos (EL-NAJJAR, 2011; DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003). Já a redução bieletrônica é catalisada por oxidoreductases como a NAD(P)H:quinona oxidoreductase (NQO1) formando hidroquinonas (QH_2), relativamente mais estáveis (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; KUMAGAI et al., 2012). Como observado na figura 12, a facilidade de redução das quinonas por um ou dois elétrons pode ser explicada pelo fato de transformar sistemas não-aromáticos em aromáticos (DE ABREU; FERRAZ; GOULART, 2000).

Compostos quinonóides apresentam duas propriedades que são essenciais para a compreensão de seus efeitos em sistemas biológicos. Por um lado, eles

podem agir como pró-oxidante transferindo elétrons de um substrato biológico para o oxigênio, gerando ERO e, assim, induzindo ao estresse oxidativo nas células. Em células cancerígenas, esse desbalanço redox pode promover diversas alterações culminando em apoptose.

Figura 12 – Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q⁻) e hidroquinonas (QH₂), respectivamente.

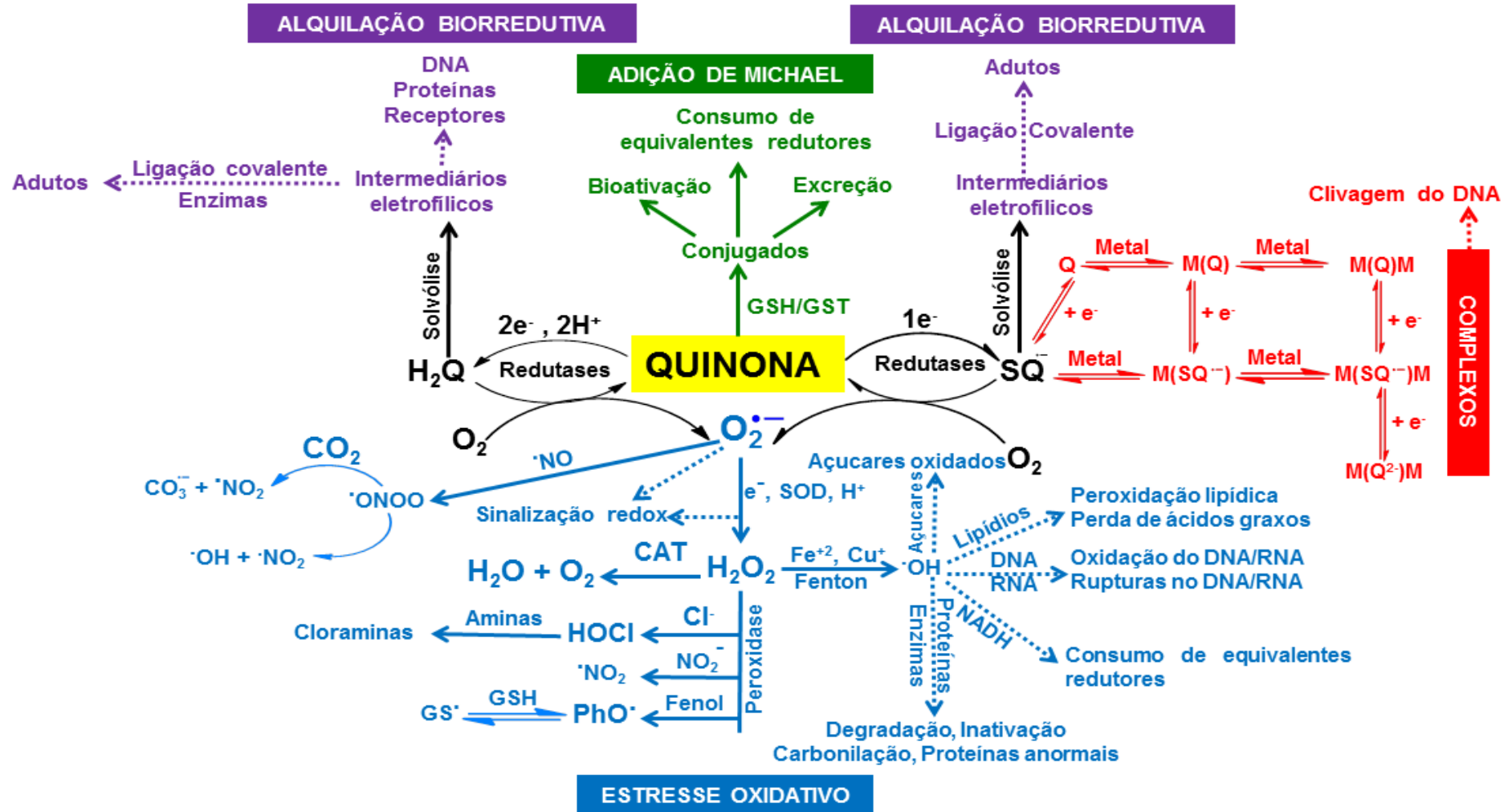


Fonte: Adaptado de EL-NAJJAR et al., 2011.

Alternativamente, a ativação pode acontecer através da redução de dois elétrons, a qual pode ser seguida pela sua inativação por glucoronidação e/ou sulfonação ou pela conversão da hidroquinona em intermediários alquilantes, os chamados quinonametídios (HILLARD et al., 2008). Por outro lado, quinonas podem ser submetidas ao ataque de nucleófilos devido ao seu caráter eletrofílico (EL-NAJJAR et al., 2011; KUMAGAY et al., 2012). A maioria das reações de quinonas com nucleófilos ocorrem por adição de Michael resultando na formação de tioéteres de hidroquinonas, também chamados de adutos de Michael (MONKS et al., 1992; PERLINGER et al., 2002; YADAV et al., 2007). Atuando como aceptores de Michael, as quinonas formam ligações covalentes com nucleófilos tiólicos celulares, como a glutatona, ou com resíduos de cisteína das proteínas levando a alterações no equilíbrio de tióis nas células, interferindo no processo de regulação celular e/ou promovendo a alquilação de proteínas (BOLTON et al., 2000; MONKS et al., 1992). Dessa forma, a citotoxicidade das quinonas pode ser benéfica ou deletéria, por vários mecanismos, tais como ciclagem redox, arilação, intercalação na dupla hélice do DNA, geração de sítios radiculares específicos, interferência na cadeia respiratória mitocondrial, inibição enzimática, peroxidação lipídica, entre outros

(MONKS et al., 1992; MONKS; JONES, 2002). Os potenciais mecanismos citotóxicos de quinonas são mostrados na figura 13, os quais abrangem a geração de estresse oxidativo/nitrosativo (escrito em azul), as espécies reativas mais representativas e as rotas seletivas de sua geração ou interconversão. Radicais semiquinona ($SQ^{\cdot-}$) são gerados por auto-oxidação ou redução enzimática da quinona (como, por exemplo, o citocromo P450 ou outra enzima quinona redutase de NAD(P)H: quinona oxidoredutase 1 (NQO1). Radicais fenóxido (PhO^{\cdot}) são produzidos a partir da tirosina e outros metabólitos fenólicos e xenobióticos. Radicais centrados em carbono e nitrogênio são também mostrados. A reação de Fenton pode ocorrer, na presença de íons metálicos, com conseqüente dano molecular. Alquilação biorredutiva ocorre por meio da geração de intermediários eletrofílicos (escrito em roxo). A complexação com metais, também pode produzir efeitos tóxicos ou benéficos, dependendo do local (escrito em vermelho). A quinona em si é um eletrófilo, que sofre adição de Michael por vários endobióticos nucleofílicos, tendo como destino final a excreção ou a toxicidade (escrito em verde).

Figura 13 – Ciclo redox, produção de metabólitos e bioativação de quinonas.

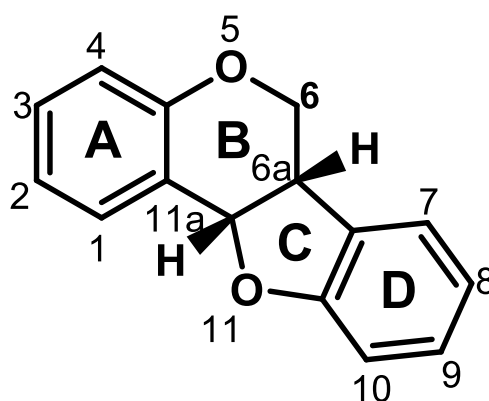


Fonte: PAIVA, 2014 (comunicação pessoal).

1.1.2.2 Pterocarpanos

Outra interessante classe de compostos biologicamente ativos, são os isoflavonóides, os quais constituem um grupo de importantes substâncias derivadas de produtos naturais. Esses compostos são formados a partir da migração do grupo fenil da posição 2 do pirano, presente na estrutura dos flavonóides, para a posição 3 do mesmo anel, catalisada pela enzima isoflavona sintase (MIDDLETON et al., 2000). Dentre o grupo dos isoflavonóides destacam-se os pterocarpanos. Estruturalmente, pterocarpanos são caracterizados pela presença de um sistema tetracíclico de anéis benzofurano-benzopirano que contém dois centros quirais nas posições 6a e 11a (Figura 14) (JIMENÉZ-GONZALÉS et al., 2008). Uma consideração relevante é que todos os pterocarpanos naturais apresentam a junção dos anéis B e C fundidos de forma *cis*. Estudos computacionais demonstram que o arranjo *trans* é menos favorável energeticamente, que a configuração *cis*, contudo há relatos da síntese de pterocarpanos cuja junção apresenta configuração *trans* (VAN AARDT et al., 2001).

Figura 14 – Representação do esqueleto básico de pterocarpanos.



Fonte: Adaptado de JIMENÉZ-GONZALÉS et al., 2008.

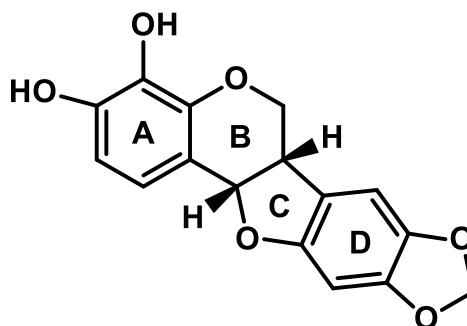
Considerações gerais sobre a relação estrutura/atividade dos pterocarpanos podem ser elencadas. De forma geral, as diferentes estruturas associadas aos anéis A e D (Figura 14) são responsáveis pela variabilidade de atividades farmacológicas (JIMENÉZ-GONZALÉS et al., 2008; VENTURA, 2010). É muito comum a presença de grupos oxigenados em pterocarpanos ativos principalmente nos carbonos 3 e 9; também é possível observar em pterocarpanos com atividade biológica, a presença

do substituinte 3,3-dimetilalila nos carbonos 2, 4, 8 ou 10 e, ainda, o grupo metilenodioxi aparece com frequência nos carbonos 8 e 9 (VENTURA, 2010).

Nos vegetais, pterocarpanos são importantes fitoalexinas, substâncias que são sintetizadas em tecidos sadios, mas se acumulam nas áreas infectadas da planta, quando a atividade antifúngica e antibacteriana é necessária (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ et al., 2008). Apresentam atividade antiviral, mostrando-se ativos contra o vírus HIV-1 (ENGLER et al., 1993). Muitos trabalhos recentes têm mostrado pterocarpanos com atividade citotóxica, tanto contra linhagens de células tumorais como contra alguns protozoários (NETTO et al., 2009; VIEIRA et al., 2008).

Dentre os pterocarpanos com efeito antitumoral em diversas linhagens de células leucêmicas, podemos citar o LQB 79 (Figura 15). Esse composto é natural, extraído da planta *Petalostemon purpureus* (WALL et al., 1995) e já foi sintetizado pelo Laboratório de Química Bioorgânica no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil (NETTO, 2007).

Figura 15 – Estrutura do pterocarpano natural LQB-79.

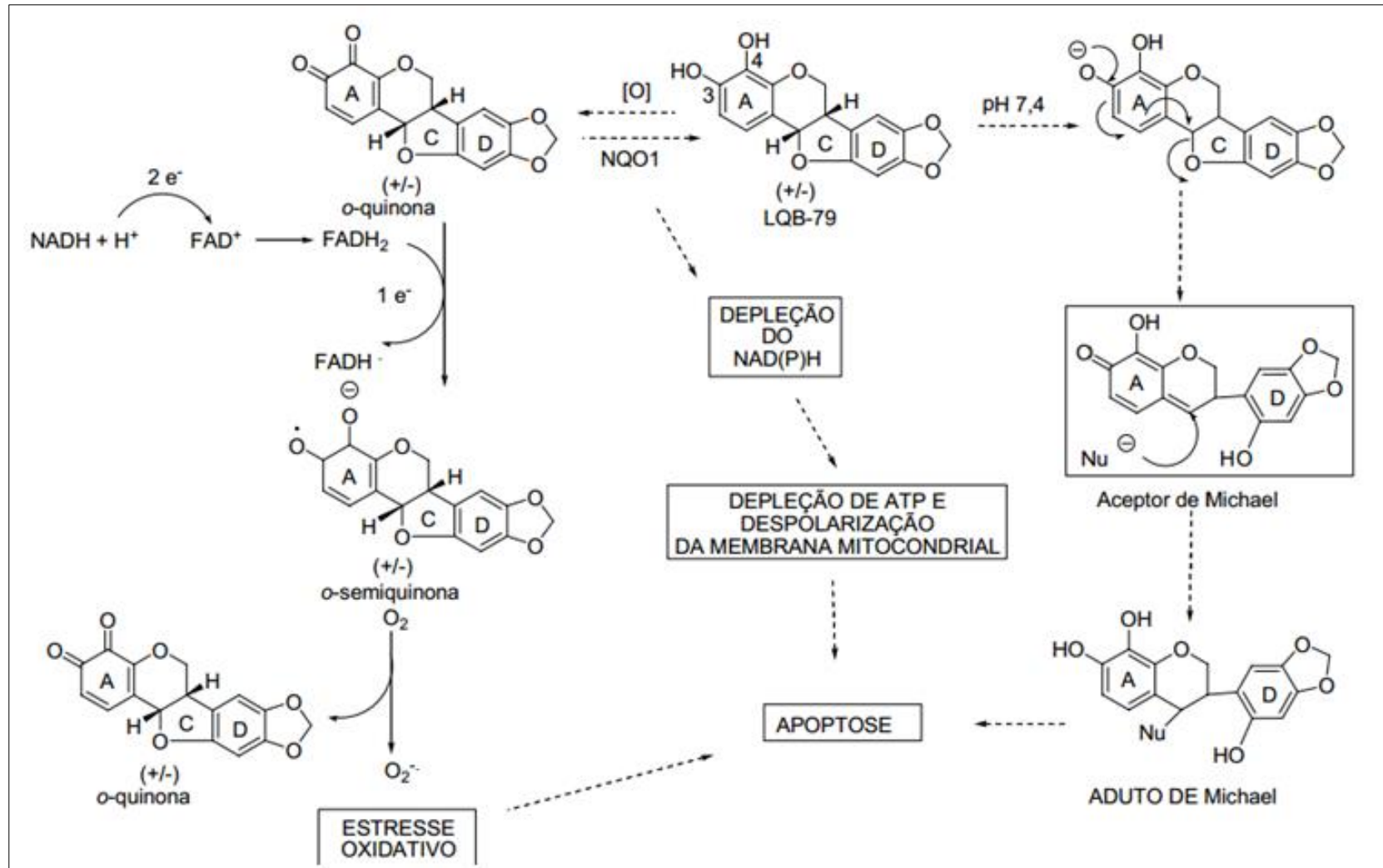


Fonte: Adaptado de NETTO, 2007

O mecanismo de ação deste pterocarpano foi proposto por Netto e colaboradores e está esquematizado na figura 16. Propõe-se que no ambiente celular, a *orto*-quinona obtida a partir do grupo catecol presente no pterocarpano natural pode ser reduzida à semiquinona através das enzimas redutases. Em condições aeróbias, o ânion radical semiquinona reage com o oxigênio molecular para formar o ânion radical superóxido, com conseqüente regeneração da quinona original. O radical superóxido desencadeia uma série de reações para formação de ERON culminado em estresse oxidativo. Por outro lado, LQB-79 pode sofrer um rearranjo molecular *in vivo* levando à clivagem heterocíclica dos anéis e à

consequente formação de espécies eletrofílicas, chamadas aceptores de Michael, os quais podem reagir com nucleófilos celulares importantes, como a glutatona e resíduos de proteínas, gerando os adutos de Michael. A regeneração da hidroquinona pode, ainda, levar à depleção do NAD(P)H, com consequente depleção de ATP e despolarização da membrana mitocondrial. Esse colapso bioenergético, concomitante ao estresse oxidativo e à formação de sistemas biorredutíveis levam à morte celular por apoptose, fato que explica a atividade anti-parasitária e antitumoral deste composto.

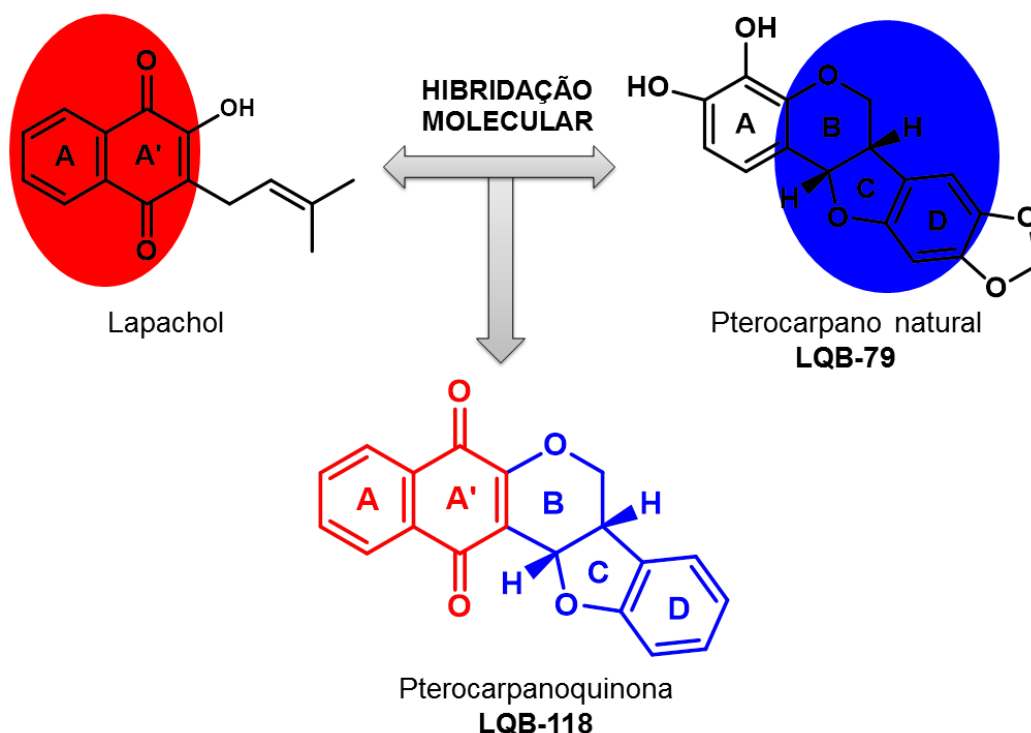
Figura 16 – Proposta de mecanismo de ação para o LQB-79.



Fonte: NETTO, 2007.

Tendo em vista o exposto, químicos sintéticos do Laboratório de Química Bioorgânica (LQB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, planejaram e sintetizaram um novo grupo de substâncias resultantes da hibridação molecular de compostos com atividades antitumoral e antiparasitária, mais precisamente naftoquinonas, estruturalmente relacionadas ao lapachol, e pterocarpanos, onde o anel A foi substituído pela unidade 1,4-naftoquinona. Dessa forma, pterocarpanoquinonas mantêm as características estruturais de grupos farmacofórios distintos (Figura 17), ambos com relevantes atividades farmacológicas, como descrito anteriormente (DA SILVA et al., 2002; NETTO et al., 2010; PORTES et al., 2012).

Figura 17 – Esquema ilustrativo dos dois grupos farmacofóricos, base para a síntese de pterocarpanoquinonas.

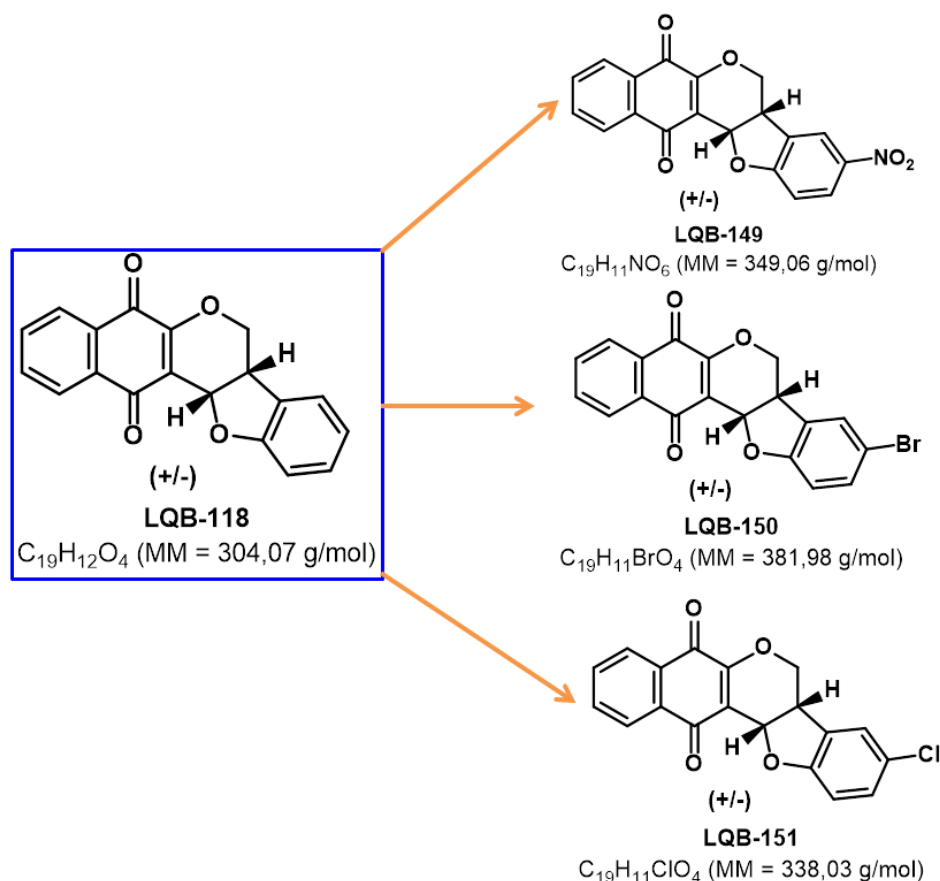


Fonte: Adaptado de NETTO, 2007.

A pterocarpanoquinona denominada de LQB-118 foi sintetizada através de uma reação de oxiarilação catalisada por paládio e transformada em seus derivados (Figura 18) por meio de reações de substituição eletrofílica no anel D, uma vez que este é muito mais reativo que o anel A, o qual se encontra desativado devido à

conjugação com os grupos carbonílicos do anel quinonoídico (NETTO et al., 2010). Esses híbridos mostraram atividade antineoplásica e antiparasitária *in vitro* (DA SILVA et al., 2009) e *in vivo* em linhagens de células humanas neoplásicas e em *Leishmania amazonensis* (BUARQUE et al., 2011).

Figura 18 – Pterocarpanoquinonas estudadas no presente trabalho.



Fonte: Autora, 2014.

O mecanismo de ação destas pterocarpanoquinonas ainda não está completamente definido, acredita-se que a porção *para*-quinona presente pode participar do ciclo redox na célula, agindo como um precursor de ERO e levando ao estresse oxidativo. Alternativamente, LQB-118 e seus derivados podem ser ativos *in situ* por redução, formando intermediários conjugados, os quais são poderosos agentes alquilantes do DNA (MAIA et al., 2011).

A atividade antitumoral das pterocarpanoquinonas (Figura 18) foi avaliada frente a linhagens de células leucêmicas humanas do tipo K562 e HL-60 (NETTO et al., 2010). As células K562, provenientes de leucemia mielóide crônica, contém

níveis elevados de glutathiona intracelular (GSH) e por isso são resistentes a apoptose induzida pelo estresse oxidativo, enquanto que as oriundas de uma leucemia pró-mielocítica, HL-60, apresentam baixos níveis de defesa antioxidante sendo sensíveis ao estresse oxidativo (CHAU et al., 1998).

Na tabela 1 são apresentados os resultados obtidos para atividade antineoplásica em termos de valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%) (NETTO et al., 2010) das pterocarpanoquinonas listadas (Figura 18, pág. 39).

Tabela 1 – Atividade antineoplásica das pterocarpanoquinonas LQB 118, 149, 150 e 151 em linhagens de células K562 e HL-60 (IC₅₀ em µM).

Composto	K562	HL-60
LQB-118 (padrão)	1,67	2,00
LQB-149 (nitro)	3,48	0,40
LQB-150 (bromo)	5,70	4,87
LQB-151(cloro)	6,77	4,87
LQB-79 (natural)	2,95	2,10
Mitomicina C	0,47	NR*

* Estudo não realizado.

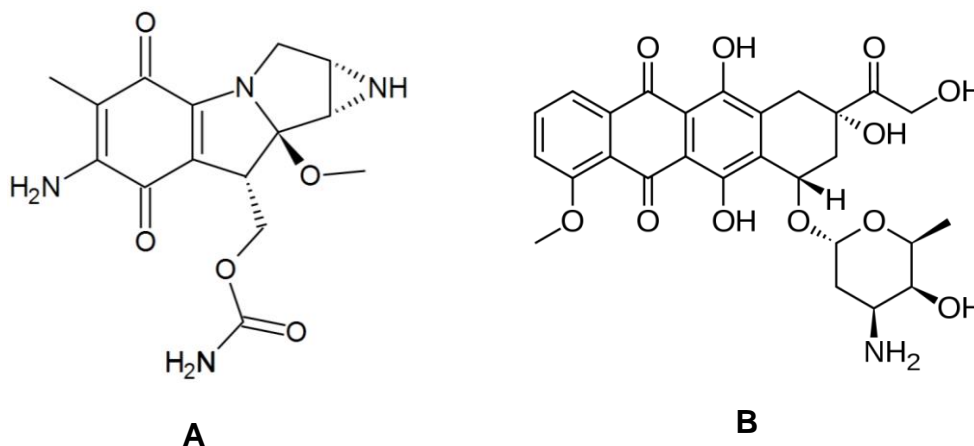
Fonte: Adaptado de NETTO et al., 2010.

De modo geral, constata-se que esses novos compostos são tão ativos quanto o LQB-79 (Figura 14, pág.) e a mitomicina C (Figura 19A), usados como controle positivo. A LQB-118 foi a mais potente em K562 e a segunda mais ativa em células de HL-60. Em linhagens de células resistentes ao estresse oxidativo, como o K562, o efeito citotóxico desse composto pode ser explicado pelo mecanismo de ativação biorredutiva (NETTO et al., 2010; BUARQUE et al., 2011) (Figuras 26, pág. 66). A adição dos substituintes halogenados e do grupo nitro diminui a atividade antitumoral em células K562, já em HL-60, sensíveis ao estresse oxidativo, a presença do grupo nitroaromático, eletroatraente, conferiu uma melhora relevante na atividade antineoplásica (NETTO et al., 2010).

Em estudo posterior, Buarque et al., (2011) dedicaram-se a avaliar a atividade antineoplásica de diversas pterocarpanoquinonas, entre elas a LQB-118 e

LQB-149, em cinco linhagens de células humanas, a saber: leucemia (HL-60 e K562), câncer de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e melanoma (MDA-MB435), tendo, nesse caso, a doxorrubicina (Figura 19B) como controle positivo.

Figura 19 – Estrutura da mitomicina C (A) e doxorrubicina (B).



Fonte: Autora, 2014.

Tabela 2 – Atividade antineoplásica das pterocarpanoquinonas LQB 118 e LQB-149, em diversas linhagens de células (IC₅₀ em µM).

Células	LQB-118	LQB-149	Doxorrubicina
HL-60	1,30	6,30	0,04
K562	1,67	3,48	1,67
HCT-80	2,60	8,30	0,02
SF-295	3,60	8,90	NR*
MDA-MB435	2,30	17,40	0,96

* Estudo não realizado.

Fonte: BUARQUE et al., 2011.

Novamente, constatou-se que a LQB-118 foi a mais promissora, apresentando atividade em todas as linhagens estudadas. Mais uma vez, na LQB-149, a presença do grupo nitroaromático interferiu significativamente na a atividade biológica e evidenciou-se uma perda na atividade em todas as linhagens celulares, principalmente em células de melanoma (MDA-MB435), onde o valor de IC₅₀ foi 17,4. Além disso, avaliou-se a bioseletividade dos compostos LQB-118 e LQB-149 através do estudo do efeito tóxico sobre as células PBMC humanas ativadas por

fitohemaglutinina (PHA) (BUARQUE et al., 2011) e os resultados mostrados que a LQB-118 foi a mais seletiva (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito citotóxico dos compostos LQB-118 e LQB-149 em células PBMC ativadas por PHA (IC₅₀ em µm). Índice de seletividade.

Células	LQB-118	LQB-149
PBMC	>20,00	8,60
PBMC/HL-60	15,04	1,36
PBMC/HCT-8	7,70	1,06
PBMC/SF-295	5,50	0,96
PBMC/MDA-MB435	8,70	0,49
PBMC/K562	12,00	NR*

* Estudo não realizado.

Fonte: BUARQUE et al., 2011.

LQB-118 reduziu significativamente a liberação de TNF- α no ambiente neoplásico (NETTO et al., 2010). O TNF- α , fator de necrose tumoral, é uma citocina que age como mediador inflamatório e é um fator endógeno responsável pelo crescimento tumoral (LUO et al., 2004). Isso significa que essa pterocarpanoquinona pode atuar em neoplasias malignas causando diretamente a morte das células tumorais ou indiretamente, inibindo o ambiente inflamatório propício para o desenvolvimento do tumor (NETTO et al., 2010).

Portes et al. (2012), realizaram testes *in vitro* para verificar a eficácia da LQB-118 contra a proliferação de *Toxoplasma gondii*, o agente da Toxoplasmose. Os parasitas tratados apresentaram significativa inibição do crescimento intracelular após 24 h de contato com o fármaco e relevante decréscimo das lesões superficiais. A toxicidade do composto LQB-118 contra este parasita intracelular ocorre em concentrações na escala micromolar. O mecanismo de ação contra *Toxoplasma gondii* ainda não é conhecido. Sugere-se que as mudanças morfológicas sejam oriundas do estresse oxidativo desencadeado pela pterocarpanoquinona, o que conduz à morte dos parasitas. É mais um protótipo promissor contra a toxoplasmose (PORTES et al., 2012).

Ribeiro et al. (2013) determinaram o mecanismo de morte celular induzido pela LQB-118 em *Leishmania amazonensis*. A LQB-118 induz a produção de espécies reativas de oxigênio sobre promastigotas de *L. amazonensis*, tendo a mitocôndria como seu alvo mais provável. A produção de ROS induz a despolarização do potencial de membrana mitocondrial dos parasitos e a possível liberação de citocromo c e ativação de caspases no citoplasma. As promastigotas tratadas com LQB-118 apresentam-se arredondadas, menores e exibem condensação da cromatina nuclear. O tratamento com LQB-118 induz nos parasitos a exposição de fosfatidilserina no lado externo da membrana plasmática e fragmentação no DNA. Em macrófagos infectados, a LQB-118 reduz significativamente a carga parasitária, possivelmente desencadeando nas amastigotas, o processo de morte celular por apoptose, tendo sido observada a fragmentação do DNA dessas formas de *Leishmania*.

1.2 Biossensores eletroquímicos de DNA: avaliação da interação fármaco-DNA

A interação de fármacos com o DNA é considerada um dos mais importantes aspectos em descobertas de fármacos. Várias classes de substâncias são capazes de interagir diretamente com o DNA, atuando por intercalação entre os pares de bases da dupla hélice dessa macromolécula. Tal característica confere a estas moléculas uma importante atividade anticâncer, inibindo o processo de divisão celular (DE MOURA, 2008).

Para investigar as interações de moléculas com o DNA, uma variedade de técnicas tem sido empregada, por exemplo, modelagem molecular, a eletroforese em gel, a cristalografia de raios-X, a fluorescência, a espectroscopia no UV-Vis e a ressonância magnética nuclear (RMN) (RAUF et al., 2005; YANG et al., 2008) e análises com biossensores. Após a descoberta da eletroatividade em ácidos nucléicos, é crescente o interesse na investigação eletroquímica da interação entre fármacos antineoplásicos e o DNA. Técnicas eletroquímicas permitem avaliar e prever as interações e danos causados ao DNA e têm sido cada vez mais utilizadas, devido principalmente à alta sensibilidade, ao custo relativamente baixo, ao acompanhamento direto e à simplicidade dos respectivos métodos (KARA, 2014; YANG et al., 2008).

As interações de pequenas moléculas/fármacos com DNA ocorrem a partir de três mecanismos principais: o primeiro se dá por meio do controle de fatores de transcrição e polimerases, onde os fármacos interagem com proteínas que se ligam ao DNA. A segunda ocorre por meio da ligação com RNA, que pode ocorrer com o DNA fita dupla, formando uma hélice tripla, ou por expor uma fita simples de DNA, formando híbridos que podem interferir na atividade de transcrição. A última interação consiste na ligação direta de moléculas pequenas à dupla hélice do DNA, que pode ser de natureza eletrostática devido às cargas negativas do açúcar-fosfato (geralmente não específicas), intercalação entre os pares de bases e ligações covalentes (MERIC et al. 2002; RAUF et al., 2005).

Biossensores eletroquímicos de DNA consistem em dispositivos cujo elemento de reconhecimento biológico é o DNA fita dupla (dsDNA) ou DNA fita simples (ssDNA), imobilizado sobre um transdutor eletroquímico (eletrodo), que permite mensurar processos onde ocorrem ligações específicas com o DNA (BRETT & CHIORCEA, 2003). As investigações de interações são baseadas nas diferenças do comportamento eletroquímico do DNA, tais como aumento/diminuição das correntes de pico e os deslocamentos dos potenciais relacionados com as bases guanina e adenina (KARA, 2014), uma vez que a oxidação eletroquímica do DNA em eletrodo de carbono vítreo por meio da voltametria de pulso diferencial, meio ácido (pH 4,5), apresenta dois picos de oxidação referentes às bases púricas (guanina e adenina), sendo as bases pirimídicas (timina e citosina) eletroinativas nestas condições (BRETT et al, 1999). Desta forma, observa-se que biossensores de DNA podem ser empregados tanto para investigar uma interação específica de um fármaco com uma base de DNA, como também para auxiliar na determinação do mecanismo envolvido em tal interação.

Tendo em vista que estas pterocarpanoquinonas ainda não foram estudadas eletroquimicamente e considerando que a eletroquímica pode contribuir para elucidação dos seus mecanismos moleculares de ação, na parte 1 deste trabalho descreve-se o comportamento eletroquímico de LQB-118 e seus derivados, potencialmente pró-oxidantes, com utilização de técnicas eletroquímicas em meios aquoso e não aquoso. Na parte 2, propõe-se a síntese e a avaliação da capacidade antioxidante contra a peroxidação lipídica de amidas derivadas do ácido lipóico. Os

compostos estudados nas partes I e II foram obtidos de combinações moleculares e de importância biológica e farmacológica relevantes. Para uma melhor compreensão, a parte experimental, os resultados e respectiva discussão, estão organizados em PARTE I e PARTE II, enquanto as demais partes seguem combinadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Objetivou-se:

1. Investigar o comportamento eletroquímico de pterocarpanoquinonas farmacologicamente ativas e obter dados sobre o mecanismo de redução, reatividade com oxigênio e interação com alvos biológicos importantes, na perspectiva de corroborar o mecanismo molecular de ação biológica;
2. Sintetizar antioxidantes multipotentes a partir do ácido lipóico e avaliar a atividade antioxidante dos mesmos frente à peroxidação lipídica.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar o comportamento eletroquímico da pterocarpanoquinona LQB-118 e seus derivados, tanto em meio prótico quanto em meio aprótico, por meio das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, visando a obtenção de parâmetros eletroquímicos que possam ser correlacionados com as atividades biológicas.
- ✓ Avaliar a reatividade da LQB-118 e seus derivados frente ao oxigênio a fim de obter informações úteis para o esclarecimento da atividade citotóxica e antiparasitária desse composto.
- ✓ Estudar a interação da LQB-118 com dsDNA e ssDNA, utilizando biossensor eletroquímico.
- ✓ Sintetizar e caracterizar estruturalmente amidas a partir do ácido lipóico, bem como a partir do seu éster ativado e aminas aromáticas.
- ✓ Calcular o logaritmo do coeficiente de partição n-octanol-água (Log P) para o ácido lipóico e para as amidas sintetizadas a fim de definir os melhores ensaios antioxidantes a serem realizados.
- ✓ Avaliar o efeito protetor do ácido lipóico e das amidas derivadas contra a peroxidação lipídica iniciada pelo radical peroxila.
- ✓ Investigar o comportamento eletroquímico das amidas mais promissoras.

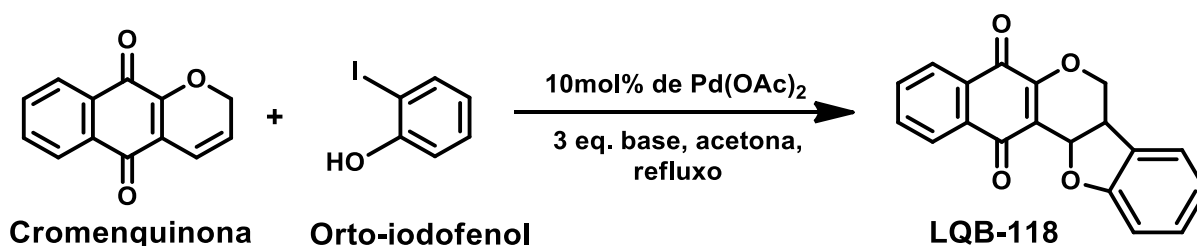
3 EXPERIMENTAL

3.1 PARTE I

3.1.1 Reagentes e Solventes

As pterocarpanoquinonas estudadas neste trabalho foram planejadas e sintetizadas no Laboratório de Química Bioorgânica no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro e gentilmente cedidas pelos professores Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa (UFRJ) e Dr. Chaquip D. Netto (UFRJ). Sua síntese já se encontra descrita na literatura (NETTO et al., 2010) e está esquematizada na figura 20.

Figura 20 - Rota sintética usada para a preparação da pterocarpanoquinona LQB-118 estudada neste trabalho.

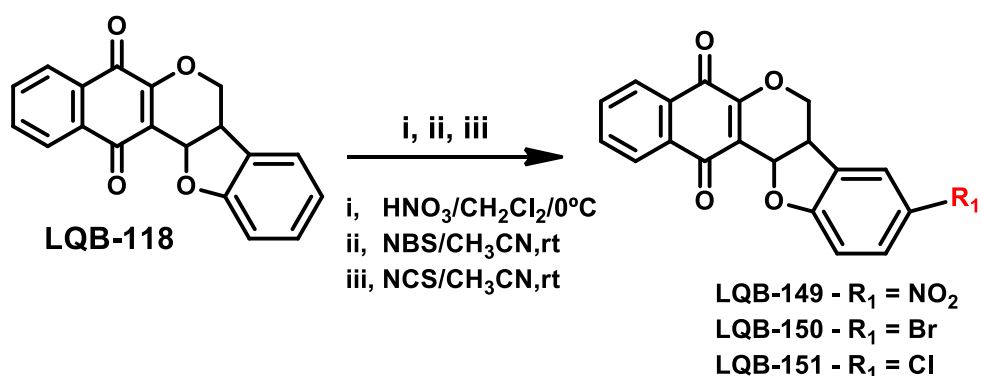


Fonte: NETTO et al., 2010.

A LQB-118 foi convertida em seus derivados LQB-149, LQB-150 e LQB-151 por meio de reações de substituição eletrofílica com ácido nítrico, N-bromosuccinimida (NBS) e N-clorosuccinimida (NCS), respectivamente (Figura 21) (NETTO et al., 2010).

As estruturas foram confirmadas por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e espectrometria de massas.

Figura 21 - Síntese das pterocarpanoquinonas derivadas da LQB-118 estudadas neste trabalho.



Fonte: Adaptado de NETTO et al., 2010.

Para os estudos eletroquímicos e em biossensor de DNA, o ácido desoxirribonucleico de fita dupla (dsDNA) do tipo I, altamente polimerizado de calf thymus (timo de bezerro, com as seguintes especificações: 6,2% de Na⁺ e 13% (v/v) de H₂O, dessecado e armazenado a 8°C) e *N,N*-dimetilformamida (DMF) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

Hidróxido de sódio (NaOH), fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), brometo de tetrabutilamônio (TBABr), etanol (EtOH), acetato de sódio, ácido acético foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil).

Os eletrólitos de suporte em meio aprótico, preparados pelo grupo de Eletroquímica da UFAL, perclorato de tetrabutilamônio (TBAP) e hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF₆), foram secos à pressão reduzida e à temperatura de 40 °C.

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18,2 MΩ.cm) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

3.1.2 Estudos Eletroquímicos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT da Metrohm Autolab[®] em um sistema de três

eletrodos. Como eletrodo de trabalho utilizou-se eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 cm); como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina espiralado e, como eletrodo de referência foi utilizado o sistema Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado). O eletrodo de carbono vítreo foi polido com alumina (3 µm). Em experimentos onde se utilizou a técnica de voltametria cíclica, variou-se a velocidade de varredura de 10 a 500 mV/s, enquanto que em voltametria de pulso diferencial a velocidade de varredura foi de 5 mV/s. Para os estudos das pterocarpanoquinonas em meio aprótico a faixa de potencial padrão foi de +0,5 a -2,5V, enquanto que para o meio prótico foi de +0,5 V à -1,0V, podendo ser otimizada conforme a necessidade. Já para a amida LA-OH, a faixa de potencial na oxidação foi de +0,2 à +1,1V.

As medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). O tratamento posterior dos gráficos foi realizado por meio do programa Origin 8.0.

3.1.3 Estudos em meio aprótico

O estudo eletroquímico em meio aprótico foi realizado utilizando como eletrólito de suporte a solução de N,N-dimetilformamida (DMF) e hexafluorofosfato de tetrabutylamônio (TBAPF₆, 0,1 mol L⁻¹).

3.1.4 Estudos em Meio Aprótico em Presença de Oxigênio

Análises eletroquímicas em meio aprótico (DMF + TBAP 0,1 mol L⁻¹) foram realizadas em presença e ausência de oxigênio para verificar a reatividade frente ao oxigênio, após redução da LQB-118 e seus derivados. Analisaram-se os parâmetros eletroquímicos, como potencial e corrente de pico para a primeira onda de redução. Cada composto foi adicionado ao eletrólito suporte e a solução foi desaerada com argônio antes das medidas por voltametria cíclica por 10 minutos. O oxigênio foi então borbuhlado dentro da célula e sua concentração foi monitorada com oxímetro (Digimed DM-4). Voltamogramas cíclicos foram registrados em diferentes concentrações de oxigênio.

A constante catalítica aparente (k_{app}) para a reação com oxigênio foi determinada a partir da equação 1 descrita por Bard e Faulkner (1990), como segue:

$$I_{pc} = \frac{I_{pR}}{I_{pO}} = \frac{k.R.T.[O_2]}{n.F.v} \quad (1)$$

Onde, I_{pc} = corrente catalítica; I_{pO}/I_{pO} = corrente normalizada; $k[O_2] = k_{app}$ é a constante catalítica aparente (s^{-1}); v = velocidade de varredura ($V s^{-1}$); n = número de elétron; F = constante de Faraday ($96485 C mol^{-1}$) T = temperatura ($298 K$); $R = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}$.

3.1.5 Estudos em meio prático

Para a realização das análises eletroquímicas em meio prático, foi usado como eletrólito suporte solução tampão de fosfato (pH 7,4, força iônica $0,2 mol L^{-1}$). Este foi preparado utilizando-se fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), dissolvidos em água ultrapura. O valor de pH da solução foi determinado pelo pH-metro modelo Quimis Q400A.

3.1.6 Estudos da interação da LQB-118 com DNA por Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

3.1.6.1 Preparação da solução tampão acetato

A solução tampão acetato ($0,075 mol L^{-1}$, força iônica $0,2 mol L^{-1}$) foi preparada por meio da mistura das soluções de ácido acético (HOAc) $1,0 mol L^{-1}$ e acetato de sódio (NaOAc) $1,0 mol L^{-1}$, cuidadosamente preparadas com água ultrapura (padrão Milli-Q) fervida para garantir a ausência de microorganismos que possam causar danos a molécula de DNA. Obteve-se um pH final de 4,5, faixa ótima para análises em biossensor de DNA.

3.1.6.2 Preparação do gel de dsDNA

O gel de dsDNA foi preparado após solubilização de 12,0 mg de dsDNA em 1,0 mL de tampão acetato pH 4,5, e submetidos à refrigeração por 48 h, para completa formação do gel de DNA.

3.1.6.3 Preparação e condicionamento do biossensor de dsDNA

Após completa formação do gel, 10 μL do mesmo foram colocados sobre o eletrodo de carbono vítreo cuidadosamente polido com alumina e condicionado

eletroquimicamente para assegurar a imobilização do dsDNA. Este condicionamento foi realizado por meio da técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), varrendo-se uma faixa de potencial (0 a +1,4 V) em velocidade de $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ em um mínimo de três ciclos até completa estabilização da superfície eletródica (organização da dupla camada elétrica). Uma vez executado esse procedimento, o eletrodo se encontra polarizado positivamente, permitindo assim interações eletrostáticas entre este e os grupos fosfato do dsDNA. O gel sobre o eletrodo foi seco com um leve fluxo de nitrogênio para formar um filme e disposto para os estudos de VPD.

O eletrodo com filme de dsDNA foi imerso em uma solução de tampão acetato pH 4,5 e varrido na faixa de potencial de 0 a +1,4 V. Simultaneamente, um outro eletrodo com filme de dsDNA foi imerso em uma solução contendo LQB-118 ($c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), e depois foi exposto para análise voltamétrica.

3.1.6.4 Preparo da solução de ssDNA pelo método ácido-base

O dsDNA (3,0 mg) foi desnaturado pela adição de 1,0 mL de ácido clorídrico ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e aquecimento durante 1 h a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria até solubilização. Em seguida, para neutralização do meio, foi adicionado 1,0 mL de solução de NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), completando-se o volume para 10,0 mL com tampão acetato (pH 4,5), para finalização do procedimento.

3.1.6.5 Estudo da interação da LQB-118 com ssDNA

Inicialmente, fez-se varredura anódica de potencial (0 a +1,4V) em VPD a 5 mV s^{-1} da solução de ssDNA para conhecer o perfil voltamétrico da solução de ssDNA. Após obter as correntes máximas relativas à oxidação da guanina e adenina, observou-se o efeito da adição das substâncias avaliadas nas correntes de pico das bases. Foi adicionada uma alíquota de LQB-118 a partir de uma solução estoque em etanol ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), de tal modo que a concentração da mesma na cela eletroquímica foi de $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

3.2 PARTE II

3.2.1 Métodos gerais

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados nos espectrômetros BRUKER AVANCE DRX 400 MHz e BRUKER AVANCE DPX 200 MHz (Departamento de Química, UFMG e Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, UFAL). Como referência interna foi utilizado o pico do tetrametilsilano (TMS, δH 0,00 ppm) ou o pico do clorofórmio deuterado (CDCl_3 , δH 7,27; δC 77,23). Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz). As multiplicidades estão abreviadas da seguinte maneira: s (singleto), d (duplete), t (triplete), m (multiplete), quint (quinteto).

Para cromatografia em camada delgada (CCD) de fase normal, realizada para o acompanhamento das reações, utilizou-se sílica-gel 60 G Merck® de 0,25 mm de espessura sobre lâminas de vidro. As placas foram ativadas por 40 minutos a 100°C. Como revelador foi utilizado vapor de iodo sublimado (eficiente para todos os compostos sintetizados). Para cromatografia em coluna (CC) de sílica, realizada como método de purificação de misturas, utilizou-se sílica-gel 60, 0,063 a 0,200 mm ou 0,040 a 0,063 mm da Merck®.

A evaporação de frações foi realizada sob pressão reduzida, utilizando-se evaporadores rotatórios Büchi.

Os critérios de pureza adotados foram mancha única em CCD, variando-se a fase móvel, e análises dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

3.2.2 Purificação e secagem de solventes e reagentes

Dimetilssulfóxido: o solvente foi colocado em um balão contendo peneira molecular do tipo A4 ativada.

Diclorometano: o solvente foi colocado em um balão contendo peneira molecular do tipo A4 ativada.

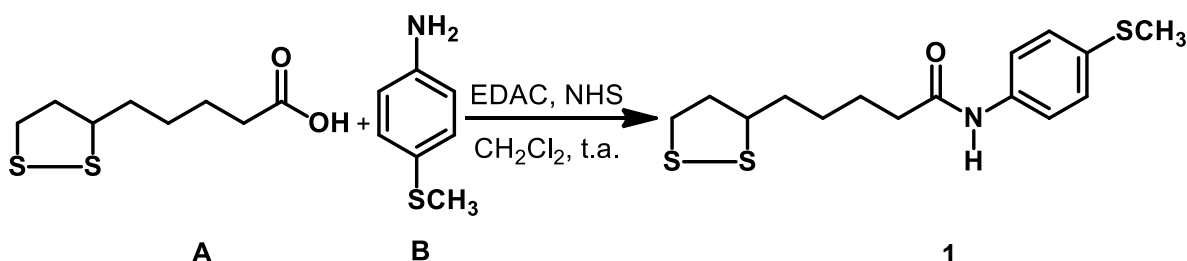
Peneira Molecular A4: a peneira molecular A4 foi ativada em mufla à 350 °C por 3 horas e posteriormente resfriada e mantida em um dessecador com CaCl_2 .

Os demais solventes utilizados foram utilizados sem prévia purificação e/ou destilação.

3.2.3 Descrição dos experimentos de síntese

Os experimentos de síntese foram realizados em parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por meio da colaboração e supervisão da Prof. Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas e da doutoranda Vanessa Gontijo no LABSINTO- Laboratório de Síntese Orgânica, Departamento de Química- ICEX.

3.2.3.1 Preparação da amida AL-SCH₃ (1)



Em um balão de 25 mL, adicionou-se 0,4126 g de ácido lipóico (AL) (**A**, 2 equiv.) e 0,3834 g de cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (EDAC) (2,0 equiv.). Tampou-se o balão, a atmosfera foi trocada com nitrogênio. Em outro balão de 25 mL, adicionou-se 0,1150 g de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (1,0 equiv.), novamente trocou-se a atmosfera e adicionou-se 1 mL de DMSO seco para viabilizar a solubilização. A solução foi transferida para o balão contendo AL e EDAC e em seguida adicionou-se 5 mL de diclorometano seco. Manteve-se a reação sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 0,223 mL de 4-(metiltio)anilina (**B**, 1,8 equiv.). A reação foi mantida nessas condições por 20 h. O término da reação foi confirmado por cromatografia em camada delgada (eluente: hexano/acetato de etila 70%:30%, revelador: iodo sublimado). A eliminação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu 0,5213 g de bruto reacional. A mistura foi então extraída com água destilada (3 x 5 mL). A fase orgânica foi tratada com 10 mL de solução de ácido clorídrico (0,1 M) diluída dez vezes, 10 mL de solução de bicarbonato de sódio saturada e, por fim, com 5 mL de água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi

eliminado sobre pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado em coluna de sílica (eluente: hexano/acetato de etila 90/10, 80/20, 70/30, 60/40). A eliminação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu o produto **1** (0,0486 g, 0,1483 mmol), 5-(1,2-ditiolan-3-il)-*N*-(4-metiltio)-fenil-pentanamida, que foi obtido como um sólido de cor amarela com rendimento de 8,2% (não otimizado).

Rendimento: 8,2%

Aspecto físico: sólido amarelo

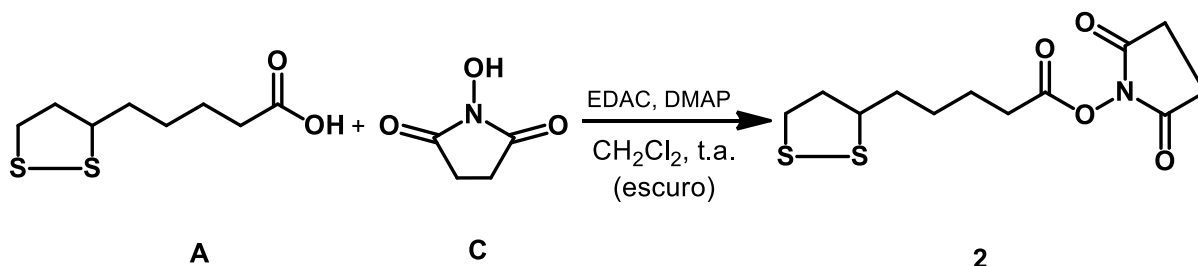
FM: C₁₅H₂₁NOS₃

MM: 327,53 g/mol

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,43-7,47 (d, 2H), 7,35 (s largo, 1H), 7,20-7,24 (m, 2H), 3,57 (m, 1H), 3,13 (m, 1H), 2,49 (s, 3H), 2,41 (m, 1H), 2,31 (t, 2H), 1,99-1,50 (m, 7H) (**Figura 44**).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 16,83; 25,43; 29,04; 34,80; 38,67; 39,52; 40,44; 56,58; 120,72; 128,05; 133,74; 135,63; 171,33 (**Figura 45**).

3.2.3.2 Preparação do éster ativado derivado do ácido lipóico (AL-NHS)



Em um balão de 100 mL, adicionou-se 1,00 g de ácido lipóico (**A**, 1,00 equiv.), o qual foi solubilizado em 10 mL de diclorometano seco. Em seguida, 0,5856 g (**C**, 1,05 equiv.) de NHS, 1,114 g (1,20 equiv.) de EDAC e 0,0592 g (0,10 equiv.) de DMAP foram pesados separadamente. Solubilizou-se o DMAP em, aproximadamente, 1 mL de CH₂Cl₂ seco, enquanto que para a total solubilização do NHS e EDAC necessitou-se de CH₂Cl₂ e DMSO secos na proporção aproximada de 3:1. Adicionaram-se os reagentes um a um; antes e após cada adição, a atmosfera foi trocada por nitrogênio. Manteve-se a reação sob agitação magnética, protegida da luz e à temperatura ambiente por 24 h. O término da reação foi confirmado por cromatografia em camada delgada (eluente: diclorometano/metanol 95/5, revelador:

iodo sublimado). A eliminação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu 1,986 g de bruto reacional. A mistura foi então extraída com acetato de etila gelado (3 x 5 mL). Formaram-se 2 fases, uma semelhante a um óleo opaco (precipitado) e a outra solúvel em acetato de etila. Separaram-se as fases e ambas foram rotaevaporadas, e deixadas durante a noite na geladeira, em hexano. Posteriormente, separaram-se os sobrenadantes de cada uma das fases e uma CCD (eluente: diclorometano/metanol 95/5, revelador: iodo sublimado) mostrou que o produto de interesse era o precipitado da fase tratada com acetato de etila, a qual foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente eliminado sobre pressão reduzida, fornecendo o produto **2** (0,9255 g, 3,050 mmol), que foi obtido como um sólido de cor amarela com rendimento de 63%.

Rendimento: 63%

Aspecto físico: sólido amarelo claro

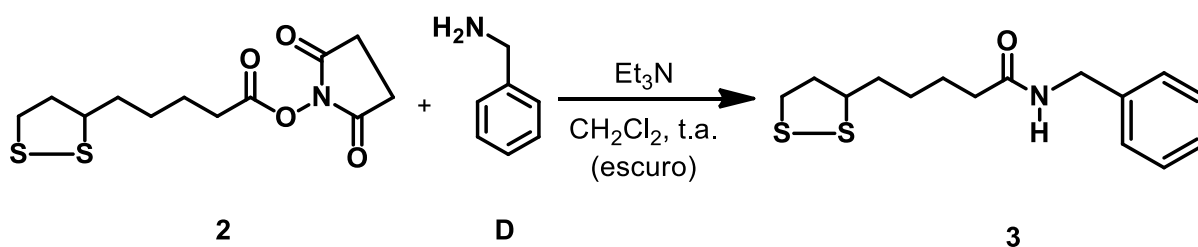
FM: C₁₂H₁₇NO₄S₂

MM: 303,06 g/mol

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,58 (m, 1H), 3,13 (m, 2H), 2,83 (s, 4H), 2,62 (t, 2H), 2,48 (m, 1H), 1,99-1,46 (m, 7H) (**Figura 42**)

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 24,57; 25,80; 28,49; 30,99; 34,70; 38,70; 40,34; 56,29; 168,57; 169,26 (**Figura 43**).

3.2.3.3 Preparação da amida AL-Bn (**3**)



Em um balão de 50 mL contendo 0,200 g (**2**, 1,0 equiv.) do éster ativado AL-NHS foram adicionados 15 mL de CH₂Cl₂ seco e 1 mL (7,5 mmol) de trietilamina (Et₃N). Adicionou-se, sob agitação, 0,1438 mL (**D**, 2,0 equiv.) de benzilamina, previamente destilada. A atmosfera foi trocada com N₂ (g) antes e após a adição de cada reagente. Manteve-se a reação sob agitação magnética, protegida da luz e à temperatura ambiente por 24 h. O término da reação foi confirmado por cromatografia em camada delgada (eluente: diclorometano/metanol 95/5, revelador:

iodo sublimado). Após a evaporação do solvente, o bruto reacional foi vertido para um funil de decantação, diluído em CH_2Cl_2 e lavado com H_2O destilada (5 mL). Em seguida, lavou-se com HCl (0,1 M) (3x5 mL) e novamente com água destilada (5 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. O resíduo obtido após a remoção do solvente foi cromatografado em coluna de sílica (eluente: diclorometano/metanol 98/2, 90/10), sendo recolhidas 15 frações. Obteve-se um sólido cristalino amarelo no grupo de frações de 3-7 (0,0621 g, 0,2104 mmol), identificado como N-benzil-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamida (3), com rendimento de 32%.

Rendimento: 32%

Aspecto físico: sólido amarelo

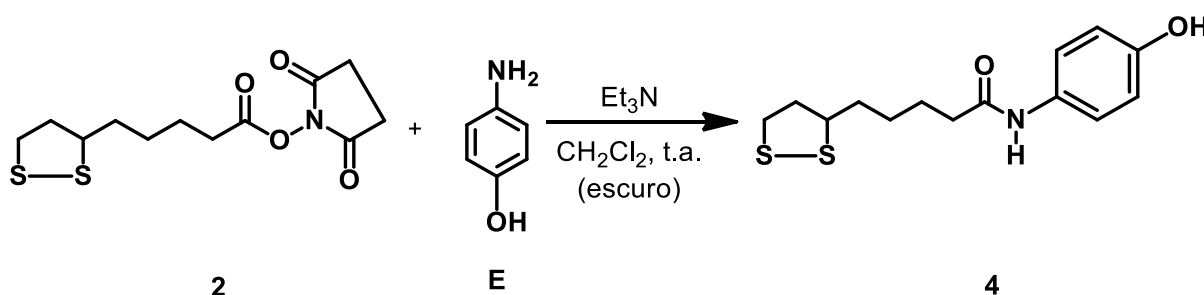
FM: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NOS}_2$

MM: 295,11 g/mol

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,26-7,37 (m, 5H), 5,91 (s largo, 1H), 4,41 (d, 2H), 3,59 (m, 1H), 3,12 (m, 2H), 2,49 (m, 1H), 2,18 (t, 2H), 1,97-1,52 (m, 7H) (**Figura 46**)

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 25,57; 29,05; 34,78; 36,58; 38,64; 40,39; 43,76; 56,57; 127,66 – 128,87; 138,50; 172,72 (**Figura 47**).

3.2.3.4 Preparação da amida AL-OH (4)



Em um balão de 50 mL contendo 0,3034 g (**2**, 1,0 equiv.) do éster ativado AL-NHS foram adicionados 20 mL de CH_2Cl_2 seco e 1 mL (7,5 mmol) de trietilamina (Et_3N). Adicionou-se, sob agitação, 0,2182 g (**E**, 2,0 equiv.) da 4-aminofenol previamente solubizada em aproximadamente 1 mL de DMSO seco. A atmosfera foi trocada com N_2 (g) antes e após a adição de cada reagente. Manteve-se a reação

sob agitação magnética, protegida da luz e à temperatura ambiente por 24 h. O término da reação foi confirmado por cromatografia em camada delgada (eluente: acetato de etila/hexano 80/20, revelador: iodo sublimado). Após a evaporação do solvente, o bruto reacional (0,2006 g) foi vertido para um funil de decantação, diluído em CH₂Cl₂ e lavado com H₂O destilada (5 mL). Em seguida, lavou-se com HCl (0,1N) (3x5 mL) e novamente com água destilada (5 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro. O resíduo obtido (0,0565 g) após a remoção do solvente foi cromatografado em coluna de sílica (eluente: hexano/acetato de etila 50/50), sendo recolhidas 23 frações. Obteve-se um sólido cristalino marrom no grupo de frações de 12-22 (0,0173g, 0,0582 mmol), identificado como 5-(1,2-ditiolan-3-il)-N-(4-hidroxifenil)pentanamida (4), com rendimento de 9% (não otimizado).

Rendimento: 9% (não otimizado)

Aspecto físico: sólido marrom

FM: C₁₄H₁₉NO₂S₂

MM: 297,09 g/mol

RMN de ¹H (200 MHz, MeOD), δ (ppm): 7,32-7,36 (m, 2H), 6,74-6,78 (m, 2H), 3,57 (m, 1H), 3,32 (s largo, 1H), 3,14 (m, 2H), 2,53 (t, 2H), 2,40 (m, 1H), 1,96-1,56 (m, 7H) (**Figura 48**).

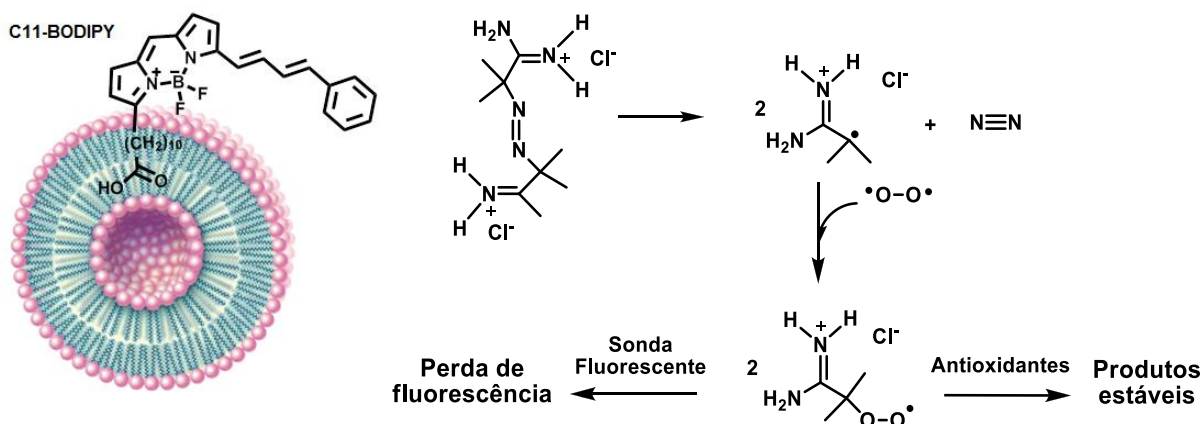
RMN de ¹³C (50 MHz, MeOD), δ (ppm): 26,74; 29,93; 35,79; 37,63; 39,37; 41,33; 57,58; 116,25; 123,52; 131,70; 155,36; 174,15 (**Figura 49**).

3.2.4 Avaliação da atividade antioxidante por peroxidação lipídica

Este ensaio foi escolhido com base nos valores de log P calculados teoricamente para as amidas e para o ácido lipóico utilizando-se o programa ACDLabs 6.0 (versão de 2002). Uma vez que as amidas apresentaram um caráter mais lipofílico, o método da inibição da peroxidação lipídica fornecerá dados relevantes para avaliação antioxidante in vitro desses compostos.

Os métodos fluorométricos baseiam-se na perda do sinal de fluorescência emitida por uma sonda ancorada a um lipossomo, como resultado da sua interação com espécies reativas, bem como na retenção do sinal na presença de antioxidantes (**Figura 22**) (KAROLIN et al., 1994; MACDONALD; MURRAY; AXELSEN, 2007; NAGUIB, 1998).

Figura 22 - Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a uma lipossoma. Reação de geração de radicais durante o ensaio de peroxidação lipídica.



Fonte: Ferreira, 2013.

Para a realização deste método, é necessário preparar previamente vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de soja. Uma solução de fosfatidilcolina de soja (1 mmol L^{-1}) em 10 mL de tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 7,4) foi passada 15 vezes por uma extrusora com membranas de 100 nm de diâmetro de poros conforme descrito por MACDONALD et al. (1991) com a incorporação adicional de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ da sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (DRUMMEN et al., 2002). O tamanho de partícula foi confirmado por Nanotracer-Zetatracer, modelo NPA151-31A-0000-D30-10M. Após o preparo das vesículas, medidas de fluorescência foram realizadas a 37 °C usando um espectrofotômetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão). Em uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, quantidades adequadas de suspensão de vesícula unilamelar, de tampão fosfato pH 7,4, e da amostra ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) ou Trolox ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), como um controle positivo, foram misturados. A solução aquosa de AAPH e o tampão foram utilizados como controle negativo. A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de AAPH (100 mmol L^{-1}). O decaimento de fluorescência (excitação $\lambda = 580 \text{ nm}$, λ emissão = 600 nm) foi monitorado continuamente durante 30 min. O experimento foi realizado em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARTE I

4.1.1 Pterocarpanoquinonas

Pterocarpanoquinonas são compostos resultantes da combinação molecular de pterocarpanos e quinonas, como descrito anteriormente. A presença da unidade eletroativa quinonoídica permite que elas atuem como agentes oxidantes ou desidrogenantes, como inibidores do transporte de elétrons e como produtores de ERON. Além disso, a possibilidade de quebras heterocíclicas dos anéis que compõem as pterocarpanoquinonas formando intermediários biorredutíveis, as tornam potenciais agentes alquilantes biorredutivos de biomoléculas, como o DNA (HILLARD et al., 2008; KARA, 2014; NETTO et al., 2010; RAUF et al., 2005).

Na busca por fármacos mais potentes e seletivos, o estudo sobre o mecanismo de redução eletroquímica é uma ferramenta relevante, pois auxilia na compreensão dos mecanismos de ação em nível molecular (DE SOUZA, 2011). Desse modo, os resultados descritos, a seguir, referem-se aos estudos eletroquímicos *in vitro* de pterocarpanoquinonas (Figura 17) como também, relatam os resultados referentes à interação destas com o oxigênio molecular e biomoléculas, como o DNA. Esses estudos foram realizados nos meios prótico e aprótico, a fim de mimetizar as condições biológicas hidrofílicas e lipofílicas, respectivamente (HILLARD et al., 2008).

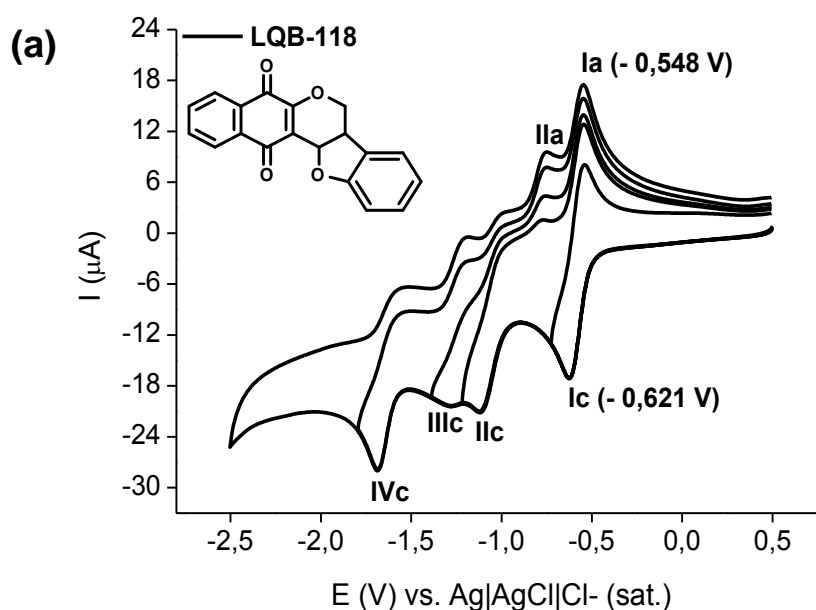
Nas análises eletroquímicas, a técnica de voltametria cíclica (VC) é uma das mais empregadas, por ser experimentalmente simples e precisa para aquisição de dados cinéticos e termodinâmicos, em reações de transferência de elétrons, inclusive biológicas. A VC é uma técnica de varredura reversa de potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é vertida ao valor inicial, na mesma velocidade. Obtém-se como respostas picos anódicos e/ou catódicos a depender na natureza do composto em análise (COSTA, 2006; DE MOURA, 2008). Para elucidação do mecanismo eletródico, os parâmetros normalmente empregados são potenciais de oxidação (E_{p_a}) e redução (E_{p_c}), $(E_{p_c} + E_{p_a})/2$ para sistemas reversíveis ou $E_{p_c} - E_{p_c/2}$ para os processos irreversíveis, além de magnitude da função corrente ($I_p/v^{1/2} \times C$) e a razão entre as correntes de pico catódico e anódico I_{p_a}/I_{p_c} . Outras técnicas,

como voltametria de pulso diferencial (VPD) são também muito utilizadas, principalmente para fins analíticos, devido à maior rapidez da análise e sensibilidade. Em VPD, a corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no fim do pulso e é registrada a diferença entre as duas correntes, com conseqüente diminuição da corrente capacitiva (DE MOURA, 2008; DE SOUZA, 2011; HILLARD et al., 2008; WANG et al., 2010).

4.1.2 Estudo em meio aprótico da LQB-118 e seus derivados por voltametria cíclica

Em meio aprótico (DMF), onde, obviamente a concentração hidrogeniônica é menor, quinonas sofrem redução em duas etapas monoelétrônicas. A primeira é caracterizada pela redução da quinona (Q) e formação do ânion radical semiquinona ($Q^{\cdot-}$), enquanto que a segunda está relacionada ao par redox ânion radical semiquinona ($Q^{\cdot-}$) / diânion quinônico (Q^{2-}) (WANG et al., 2010). As pterocarpanoquinonas apresentam uma porção quinonoídica. Espera-se, portanto que seus perfis voltamétricos evidenciem a presença deste grupo funcional eletroativo. Os voltamogramas cíclicos para LQB-118 e seus derivados em meio aprótico são mostrados na figura 23 e 24 e são complexos. A figura 24 permite a comparação entre eles.

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos para LQB-118 (a), LQB-149 (b), LQB-150 (c) e LQB-151 (d) ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



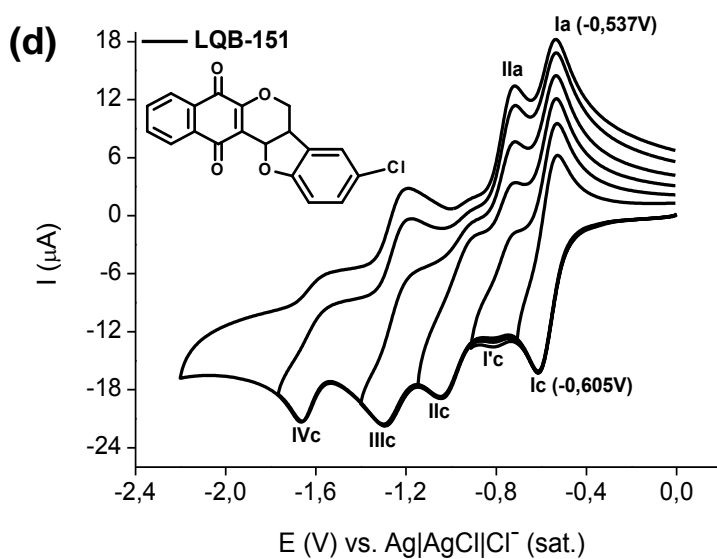
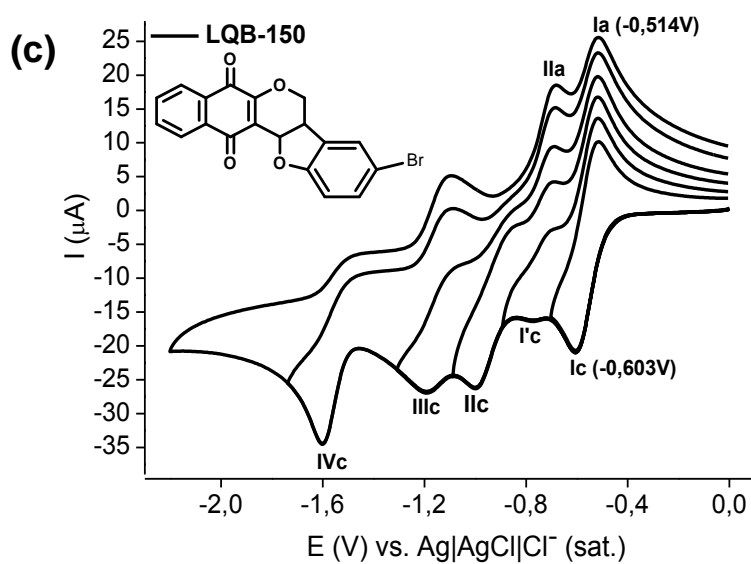
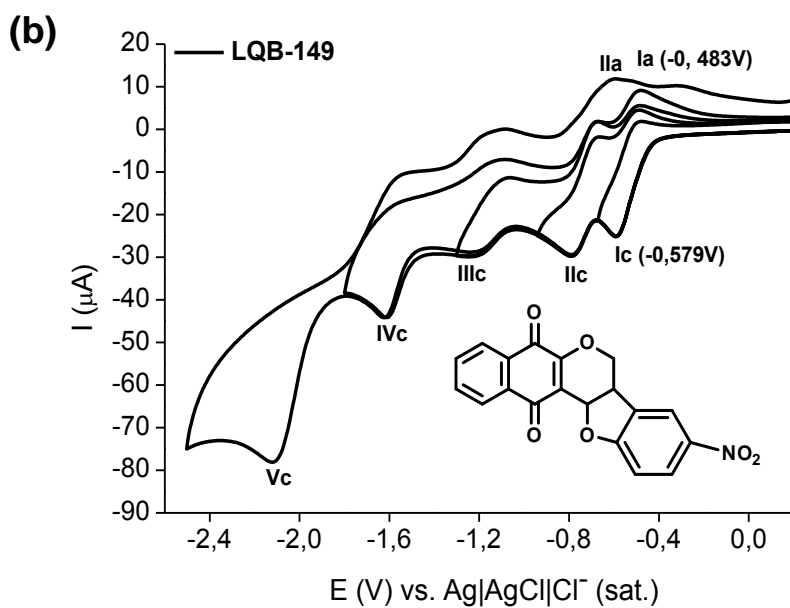
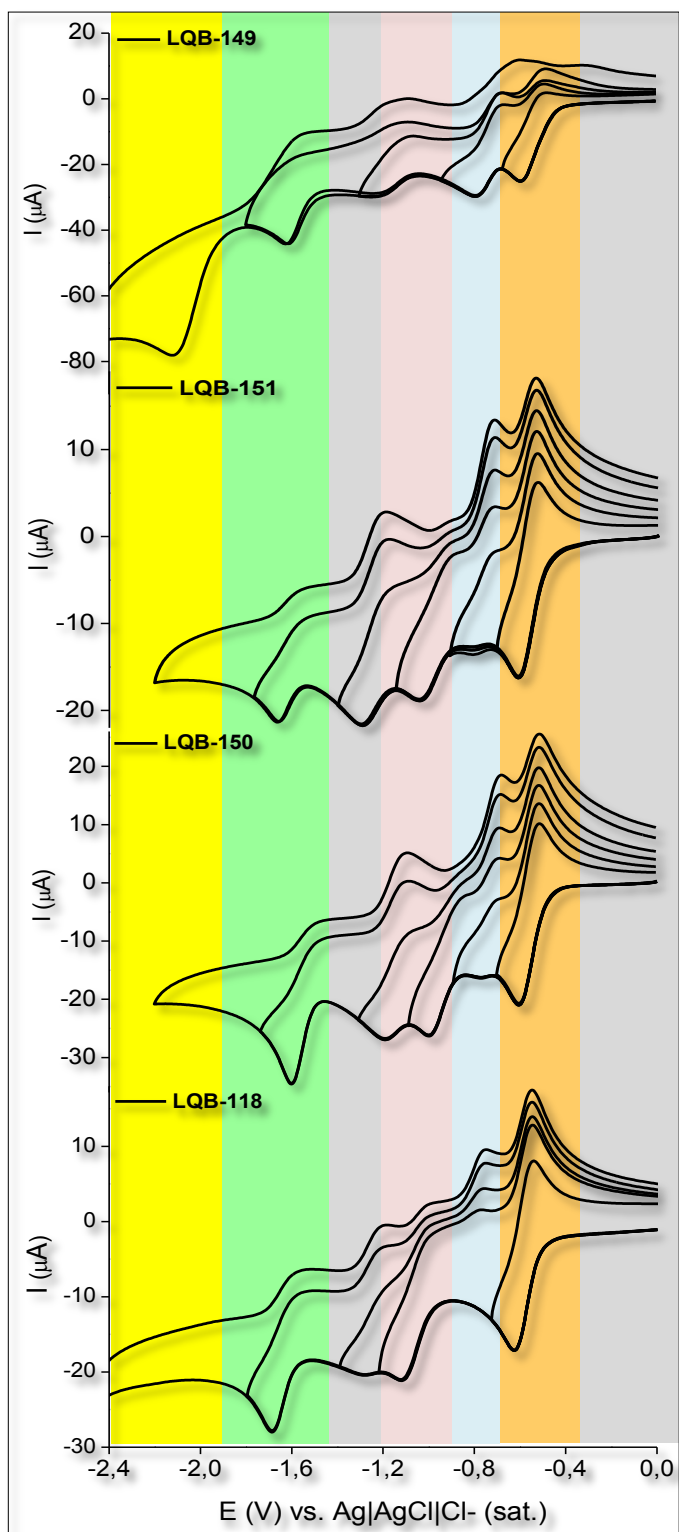


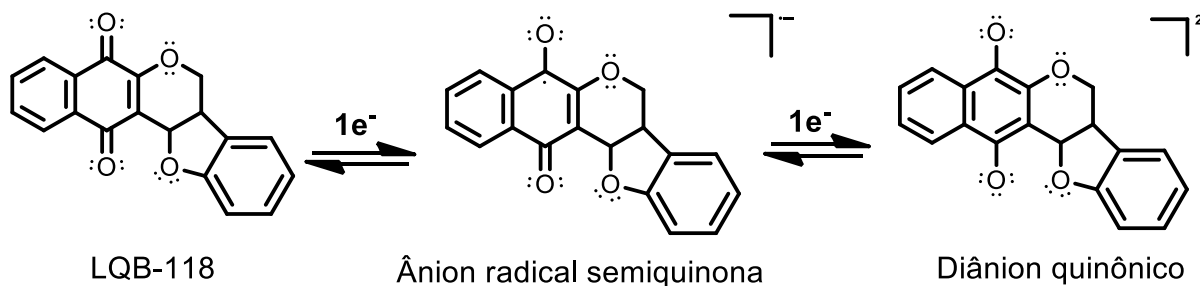
Figura 24 - Comparação entre os voltamogramas cíclicos para LQB-118 (a), LQB-149 (b), LQB-150 (c) e LQB-151 (d) ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF₆ (0,1 mol L⁻¹). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2014.

O composto LQB-118 (padrão) apresenta quatro ondas catódicas, sendo a primeira referente à formação do ânion radical semiquinona, a segunda corresponde ao diânion quinônico (Figura 25) e as ondas adicionais provavelmente referentes a reações químicas acopladas, gerando novos sistemas redutíveis.

Figura 25 - Racionalização mecanística das duas primeiras etapas do processo de redução para a pterocarpanoquinona LQB-118.



Fonte: Autora, 2014.

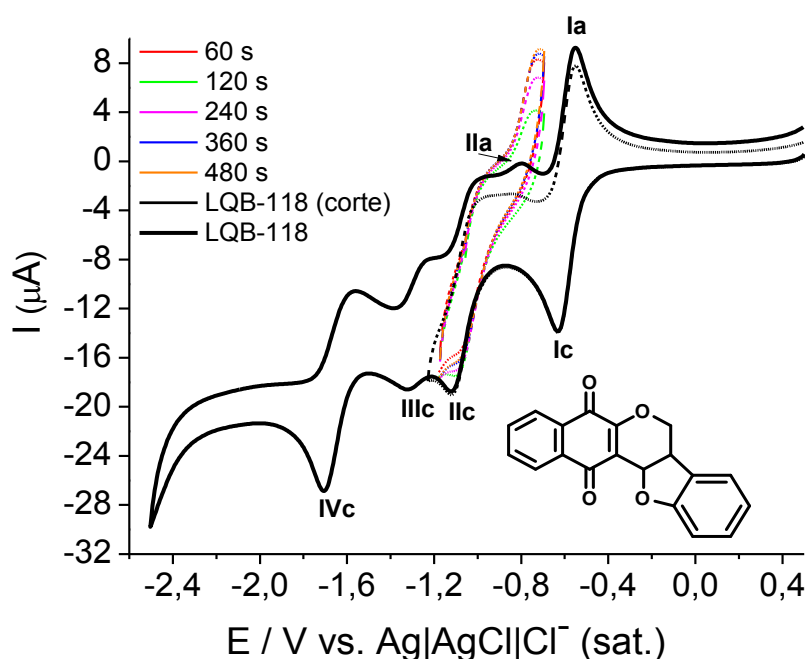
A comparação entre os perfis voltamétricos para as pterocarpanoquinonas LQB-118, LQB-150 e LQB-151 mostra similaridade entre as quatro ondas principais (Ic - IVc) (Figura 24). Os derivados halogenados apresentam uma onda extra, mal definida, designada como I'c (Figura 23 C e D e Figura 24 marcado em azul) intermediária entre o primeiro e o segundo processo redox. Para o derivado LQB-149 que possui tanto a função quinona quanto o grupo nitro, como eletroativos, o voltamograma mostra uma maior complexidade, evidenciando a presença de cinco ondas de redução (Ic-Vc) e quatro ondas de oxidação mal definidas (Figura 23, b). Uma onda de natureza quase - reversível (IIc, -0,787 V) subsequente à primeira onda de redução (Ic, -0,579 V, formação da semiquinona), ausente nas demais substâncias (Figura 24 – marcado em azul), é compatível com a redução do grupo nitro, gerando, provavelmente, um diânion-biradical, relatado recentemente, em sistemas semelhantes, no caso, *orto*-quinonas substituídas com grupos nitroanilina não conjugados (ARMENDÁRIZ-VIDALES et al., 2014)). A última onda de redução, de natureza irreversível (Vc, -2,116 V), de maior intensidade de corrente, também ausente nas demais substâncias (Figura 24 – marcado em amarelo), é relacionada à redução continuada do ânion radical nitro. Um considerável alargamento dos picos pode ser resultado da sobreposição de ondas, referentes à associação da redução da nitroquinona com outros eventos químicos.

Em todos os casos, conforme teste diagnóstico (ΔE_p), o primeiro processo de redução (Ic) mostrou característica de quase-reversibilidade, onde a primeira onda catódica é acompanhada da correspondente onda de oxidação, de intensidade de corrente correspondente à onda de redução. A diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico para as pterocarpanoquinonas foi de 68-96 mV para a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , sendo o radical semiquinônico susceptível a reações químicas posteriores à sua formação.

O segundo processo de redução (IIc), relacionado à formação do diânion quinônico apresentou menor característica de reversibilidade, sendo observado um sinal anódico correspondente (IIa), de baixa intensidade de corrente quando comparado a Ia (Figura 23). Essa menor reversibilidade do intermediário diânion quinônico decorre de sua maior basicidade, sendo, portanto mais reativo que a semiquinona, o que o torna mais susceptível a reações químicas acopladas a sua eletrogeração, como protonação, dimerização ou desproporcionamento. A presença do sinal anódico, designado IIa, evidente tanto no composto padrão (LQB-118), quanto nos derivados halogenados, deve ser destacada (Figura 23). IIa está relacionado ao pico IIc, conforme experimentos utilizando diferentes potenciais de inversão (Figura 23 A, C e D). Na tentativa de intensificar o sinal, aplicou-se no composto padrão LQB-118, um potencial de condicionamento ($E_{ap} = -1,1 \text{ V}$) por tempos variados (60, 120, 240, 360 e 480s) e em seguida, realizaram-se varreduras sucessivas na faixa de potencial de $-0,9 \text{ V}$ a $-1,1 \text{ V}$ (Figura 26).

Observa-se a intensificação da onda IIa, com a aplicação de potencial ($-1,1 \text{ V}$). Constata-se, ainda, que não há uma relação direta entre o tempo de condicionamento, visto que em 60 s, a corrente de pico foi maior que em 120 s (Figura 26). Uma possível explicação para este fato decorre de uma quebra do anel heterocíclico a partir do diânion, gerando um intermediário eletrorredutível, que sofre oxidação em IIa.

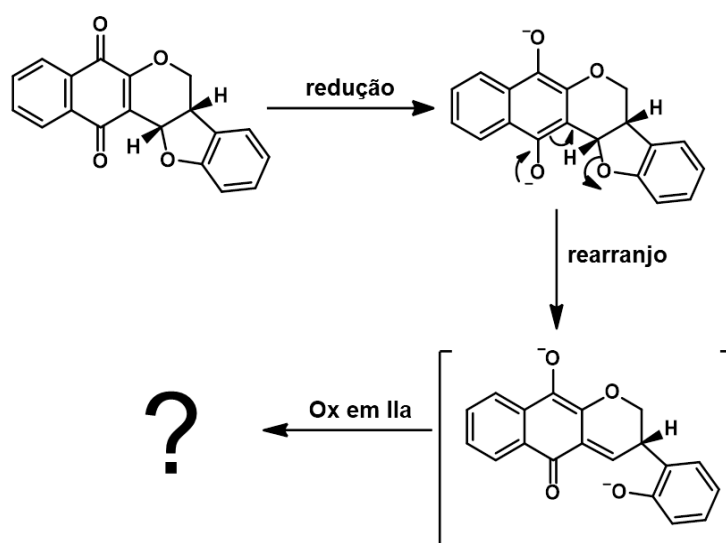
Figura 26 - Experimentos voltamétricos com fixação de potencial em -1,1 V por diferentes tempos de condicionamento. LQB-118 ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2014.

Estudos anteriores de Netto e colaboradores (Netto et al., 2010), relataram a formação de um quinonametídeo transiente, capturado por reação com tiofenol, resultando na geração de adutos de tiofenol (Figura 27). Mecanismo similar pode ser aventado para a presente situação.

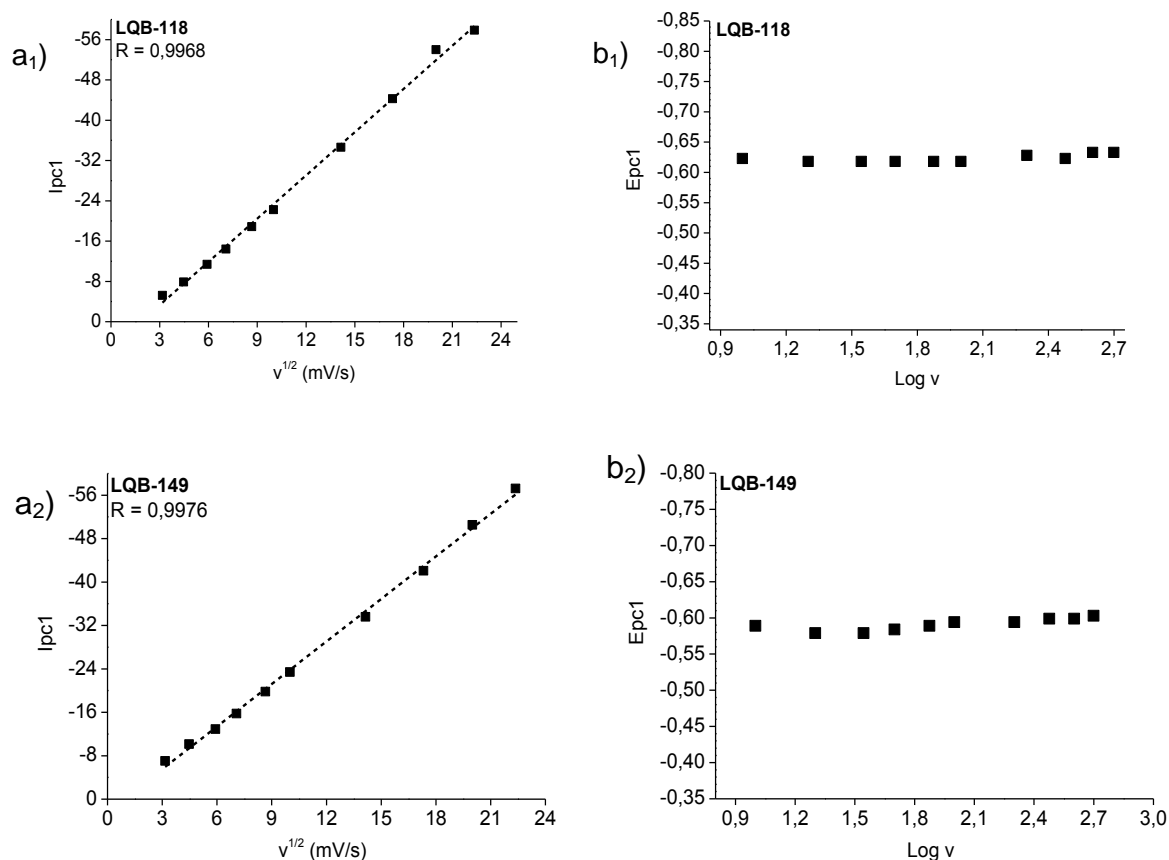
Figura 27 - Possível mecanismo de clivagem heterocíclica da LQB-118, após a redução.

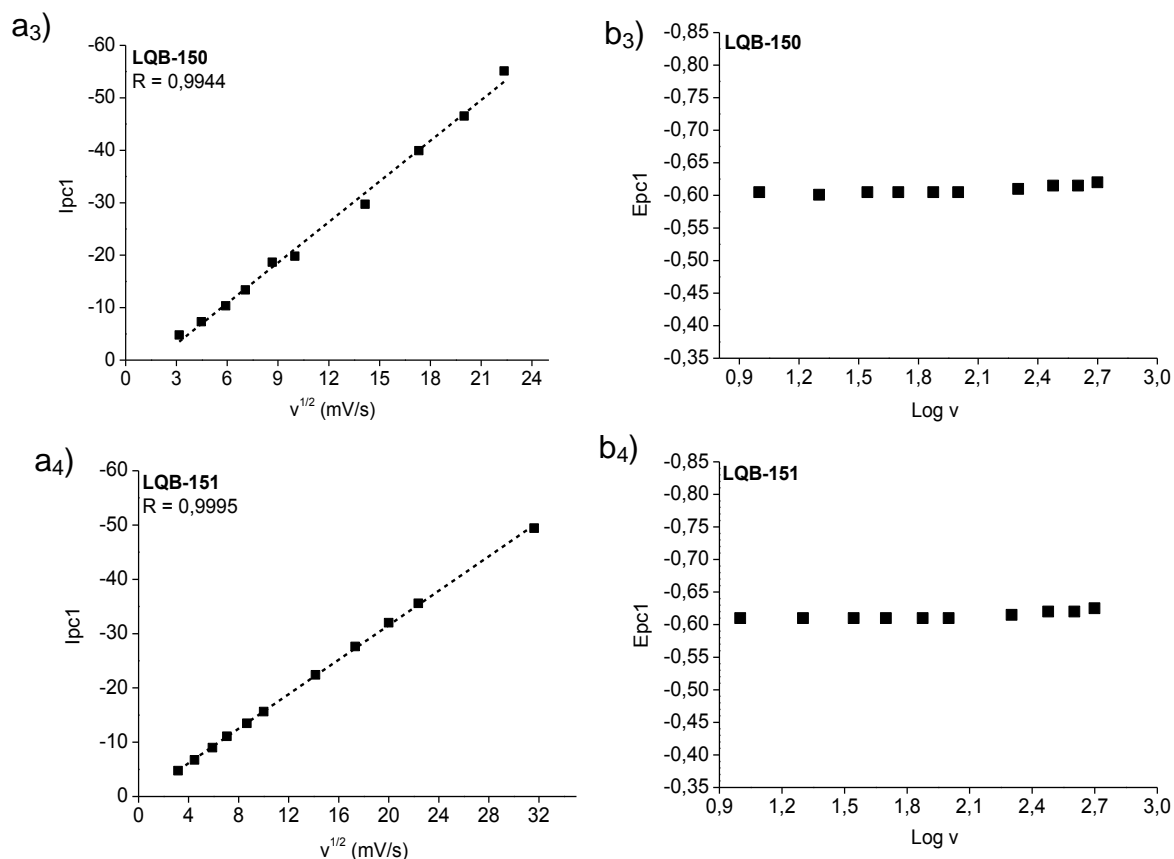


Fonte: Adaptado de NETTO et al., 2010.

A partir do estudo voltamétrico também foram obtidos os valores de intensidade de corrente para a primeira onda de redução em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (i_{pc1} vs. $v^{1/2}$). A linearidade dos pontos mostra que o transporte de massa através da solução até a superfície eletródica para todos os compostos estudados, é de natureza difusional (Figura 28a). Além da presença do pico reverso, a análise do potencial de redução da primeira onda em função do log da velocidade de varredura (E_{pc1} vs. $\log v$), indica que a primeira etapa de redução é de natureza quase reversível (Figura 28b) (DE SOUZA, 2011).

Figura 28 - a) Análise da corrente de pico (i_{pc1}), para a primeira onda de redução para LQB-118 e seus derivados em função de $v^{1/2}$. b) Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹) para as diferentes pterocarpanoquinonas.





Fonte: Autora, 2014.

Grupos substituintes em moléculas eletroativas podem causar várias mudanças no comportamento eletroquímico. De maneira geral, grupos retiradores de elétrons diminuem a densidade eletrônica no sistema quinônico, resultando em um deslocamento no potencial de pico para valores mais positivos, ou seja, facilitam o processo de redução. Por outro lado, os grupos doadores de elétrons aumentam a densidade eletrônica resultando num deslocamento de potencial de pico catódico para potenciais mais negativos, isto é, dificultam o processo de redução (MONKS; JONES, 2002; SARAPUU et al., 2010). Em termos de orbital molecular, os substituintes eletroatraentes diminuem a energia do LUMO (Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia), tornando a transferência de elétrons do eletrodo para a substância eletroativa, em um processo de redução, mais fácil. Já para os substituintes eletrodoadores, ocorre o contrário, há um aumento da energia do LUMO, fato que dificulta o processo de transferência de elétrons para esse orbital (ZUMAN et al., 1967). No presente caso, todos os compostos apresentam substituintes eletroatraentes, e, apesar de estarem ligados ao anel aromático que está separado da porção quinonóide por dois heterociclos, apresentaram potenciais menos negativos, quando comparado ao padrão não-substituído (LQB-118)

seguindo a ordem esperada das constantes σ_p e $\sigma_p(\sigma^-)$ de Hammett do substituinte no anel aromático: $\text{NO}_2 > \text{Br} \sim \text{Cl} > \text{H}$ (CAREY; SUNDBERG, 2007). A constante de Hammett, σ , representa os diferentes efeitos que os substituintes podem exercer no caráter eletrônico de um sistema aromático. Um valor negativo indica a presença de um grupo eletrodoador, enquanto que um valor positivo indica a presença de um grupo eletrorretirador (JIANG et al., 2010). Os valores de $\sigma_p(\sigma^-)$ referem-se ao conjunto de interações por ressonância entre um grupo aceptor de elétrons e um sítio de reações aniônicas. Os potenciais de redução (E_{pc1}) dos compostos obtidos por voltametria cíclica, em meio aprótico, foram comparados com os valores de σ_p e $\sigma_p(\sigma^-)$ de Hammett para os substituintes no anel aromático (CAREY; SUNDBERG, 2007) (Tabela 4, ver gráficos da Figura 23).

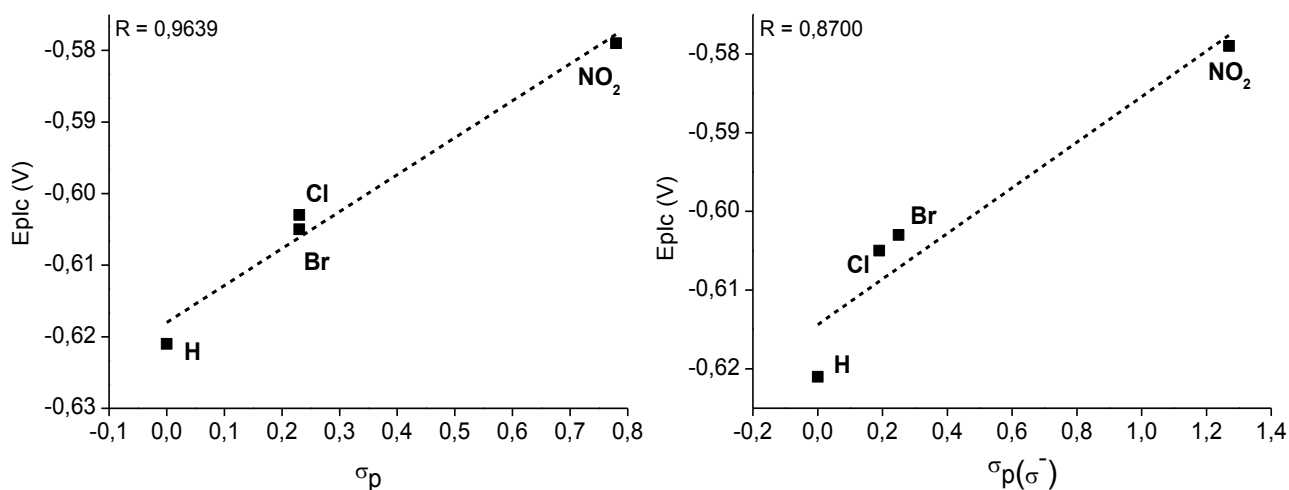
Considerando-se que todos os substituintes estão em posição para, disponível para exercer importantes efeitos de ressonância e que a redução forneceria intermediários carregados negativamente, constantes de substituintes de Hammett, σ , para grupos eletroatrantes foram extraídos de Carey; Sundberg, 2007 e usados na correlação. Calculou-se a melhor reta entre os pontos, obtendo-se os coeficientes de correlação linear (R) (Figura 29).

Tabela 4 – Principais parâmetros eletroquímicos para LQB-118 e seus derivados. Eletrodo de carbono vítreo, E vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e valores das respectivas constantes de Hammett.

Composto	$E_{plc}(\text{V})$	$E_{pla}(\text{V})$	$\Delta E_1 (\text{mV})$	$E_{pllc}(\text{V})$	$E_{plla}(\text{V})$	$\Delta E_2 (\text{mV})$	σ_p^*	$\sigma_p(\sigma^-)^*$
LQB-118	-0,621	-0,548	73	-1,114	-0,751	363	0,00	0,00
LQB-149	-0,579	-0,483	96	-0,789	-0,678	111	0,78	1,27
LQB-150	-0,603	-0,514	89	-0,994	-0,683	311	0,23	0,25
LQB-151	-0,605	-0,537	68	-1,046	-0,716	330	0,23	0,19

* CAREY; SUNDBERG, 2007.

Figura 29 - Gráfico de correlação E_{pc1} das pterocarpanoquinonas LQB-118 (padrão), LQB-149 (nitro), LQB-150 (bromo) e LQB-151 (cloro) vs. constantes de substituintes de Hammett.



Autora, 2014.

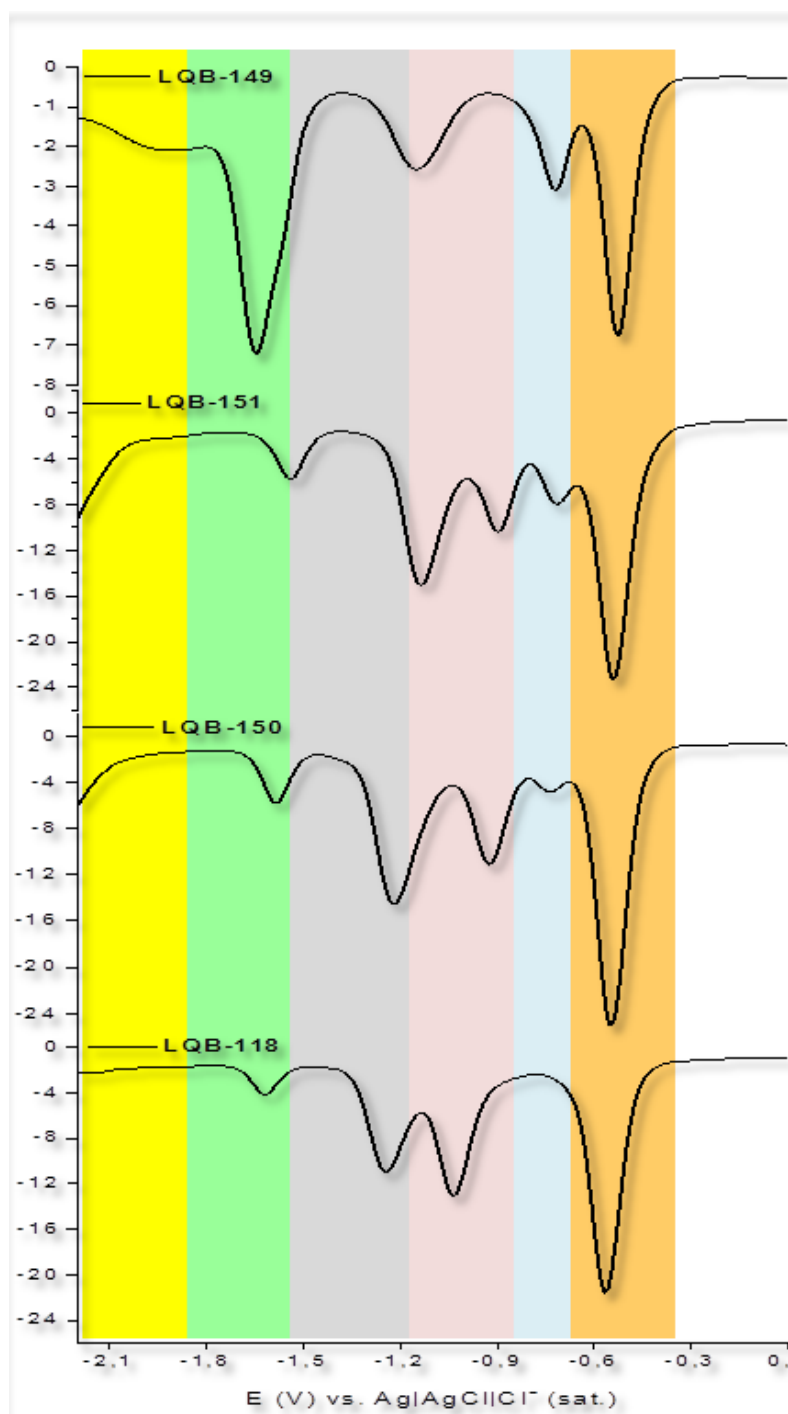
Os valores dos potenciais de redução (E_{plc}) se correlacionaram melhor com σ_p , obtendo-se um $R = 0,9639$. Utilizando-se σ_p (σ^-) não se obteve uma boa correlação linear. O composto LQB-149 apresenta maior facilidade de redução ($E_{plc} = -0,579$ V) e maiores constantes de Hammett (0,78) como consequência do melhor efeito eletroatraente exercido pelo grupo nitro.

4.1.3 Estudo em meio aprótico da LQB-118 e seus derivados por voltametria de pulso diferencial (VPD)

A técnica de voltametria de pulso diferencial foi utilizada em adição à voltametria cíclica para confirmar os perfis voltamétricos das pterocarpanoquinonas, principalmente a existência dos ombros catódicos entre o primeiro e o segundo processo de redução nos derivados halogenados. A figura 30 mostra que os resultados obtidos em voltametria de pulso diferencial foram similares aos observados em voltametria cíclica. Assim como a LQB-118 (padrão), os derivados halogenados apresentaram quatro ondas principais, diferenciando-se do composto padrão, basicamente, pela presença de ombro intermediário a I_c e II_c (Figura 30 - marcado em azul claro). O voltamograma de pulso diferencial para a pterocarpanoquinona LQB-149 (nitro) em meio aprótico também é representado por cinco ondas de redução. As ondas I_c e II_c são correspondentes à redução monoelétrica em sequência da função quinona e da função nitro. A onda IV_c ,

representada por um pico bem definido e agudo de alta intensidade de corrente corresponde à redução estendida do ânion radical nitro (Figura 30). A tabela 4 mostra os potenciais de redução para a LQB-118 e seus derivados em VPD.

Figura 30 – Voltamogramas de pulso diferencial para LQB-118 e seus derivados ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) em DMF/TBAPF₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2014.

Tabela 5 – Potenciais de redução para LQB-118 e seus derivados em voltametria de pulso diferencial. Eletrodo de carbono vítreo, E vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.), v = 5 mV s⁻¹.

Composto	I _c (V)	II _c (V)	III _c (V)	IV _c (V)	V _c (V)
LQB-118	-0,567	-1,036	-1,251	-1,615	-
LQB-149	-0,532	-0,721	-1,146	-1,649	-1,952
LQB-150	-0,547	-0,923	-1,216	-1,584	-
LQB-151	-0,542	-0,899	-1,133	-1,542	-

Fonte: Autora, 2014.

4.1.4 Estudo em meio aprótico da LQB-118 e seus derivados em presença de oxigênio

Dentre os mecanismos de ação propostos para a LQB-118, um dos mais estudados é o da transferência de elétrons seguido de estresse oxidativo (TE/EO) (MAIA et al., 2011; NETTO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013). Como já mencionado, a porção *para*-quinona presente na estrutura da LQB-118 e seus derivados pode ser reduzida ao ânion radical semiquinona, o qual pode transferir um elétron para o oxigênio molecular. O ânion radical superóxido resultante pode ser transformado em peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, os quais iniciam uma cascata de eventos que levam ao estresse oxidativo (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; MAIA et al., 2011; NETTO et al., 2010). Estudos demonstram que a atividade antineoplásica desse composto em linhagens de células cancerígenas como HL-60, Raji e Daudi, pode estar associada a este mecanismo de ação, uma vez que estas são sensíveis ao estresse oxidativo (NETTO et al., 2010). Além disso, já foi demonstrado que a atividade leishmanicida apresentada por esta pterocarpanoquinona está relacionada com a indução à produção de ERO. Desse modo, o estresse oxidativo é acompanhado por uma perda do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e fragmentação do DNA, desencadeando a morte celular do parasito por apoptose pela via mitocondrial, de maneira seletiva (RIBEIRO et al., 2013). Sabe-se que as mitocôndrias desempenham um papel central na vida e morte celular, uma vez que são importantes fontes celulares de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KASSAB; PIWOWAR, 2012; MURPHY, 2009). Em *Leishmania*, o processo de sobrevivência está diretamente relacionado ao funcionamento correto desta única

organela e em última instância, de sua cadeia respiratória (SHAHA, 2006). O estresse mitocondrial gerado pela LQB-118 pode estar relacionado com alguma interação com a cadeia de transporte de elétrons. A interação inibindo o complexo I, II ou III promove a produção de espécies reativas de oxigênio em excesso e conseqüentemente a alteração no potencial de membrana mitocondrial, levando a um colapso bioenergético que compromete a sobrevivência do parasito (CUNHA-JÚNIOR, 2011).

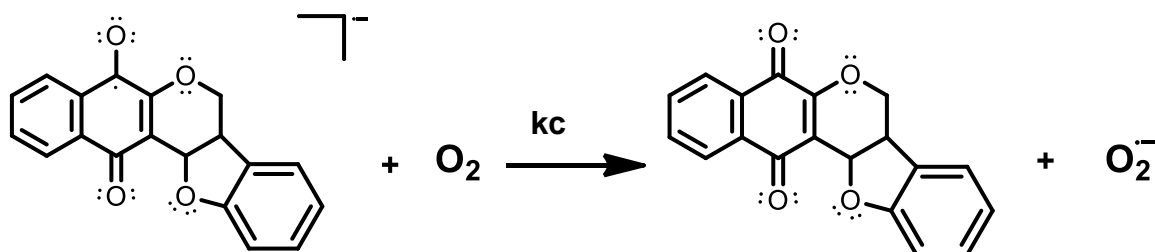
Tendo em vista o relevante papel do oxigênio na produção de ERO, bem como no processo de ciclagem redox com quinonas e nitroaromáticos, a pterocarpanoquinona LQB-118 e seus derivados foram avaliadas quanto à sua reatividade frente ao oxigênio. A verificação da produção de espécies reativas de oxigênio eletroquimicamente pode contribuir para a obtenção de informações úteis que possam esclarecer a atividade citotóxica e antiparasitária desses compostos.

As análises por voltametria cíclica em presença de oxigênio foram realizadas em solvente não aquoso, porque tanto o ânion radical superóxido quanto seu ácido conjugado, o radical hidroperoxila, são instáveis em água e em outros solventes práticos. Dessa forma, nesse caso, o melhor modelo para o estudo do ambiente da membrana celular, onde ocorre o processo de peroxidação lipídica é o meio aprótico, devido à estabilidade dos ânions radicais gerados no processo de redução de quinonas (HILLARD et al., 2008; SONG; BUETTNER, 2010). Neste meio, a redução heterogênea (na superfície do eletrodo) do oxigênio ao ânion radical superóxido ocorre em potencial em torno de $-0,8 \text{ V vs. Ag|AgCl|Cl}^-$ (DE SOUZA, 2011; FERREIRA, 2013)

Na Figura 32a, pode-se observar que o perfil eletroquímico para a primeira onda catódica, em ausência de oxigênio é consideravelmente alterado após a adição sucessiva de oxigênio à cela eletroquímica. Quando em presença de oxigênio, o primeiro potencial de redução das pterocarpanoquinonas estudadas sofre um deslocamento para valores mais positivos. Observa-se ainda que a corrente de pico catódico aumenta em proporção direta à adição de oxigênio, com conseqüente desaparecimento da onda de oxidação, evidenciando que os ânions radicais formados a partir da redução de LQB-118 e de seus derivados interagem com oxigênio em mecanismo eletroquímico (reversível) - químico catalítico (ErC') e o

gerando o ânion radical superóxido e regenerando o grupo quinona (SONG; BUETTNER, 2010), como mostrado na figura 31 para a LQB-118.

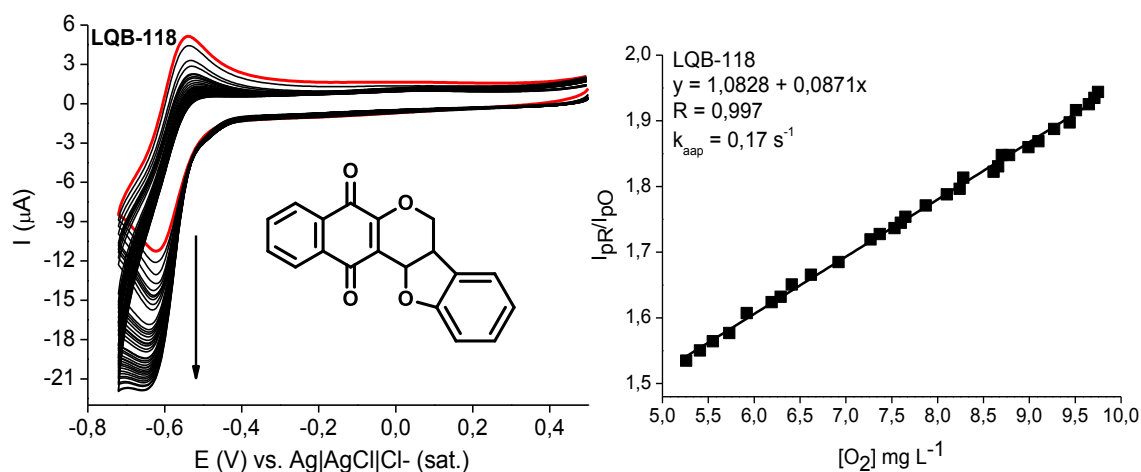
Figura 31 – Mecanismo eletroquímico químico catalítico (ErC') para LQB-118.

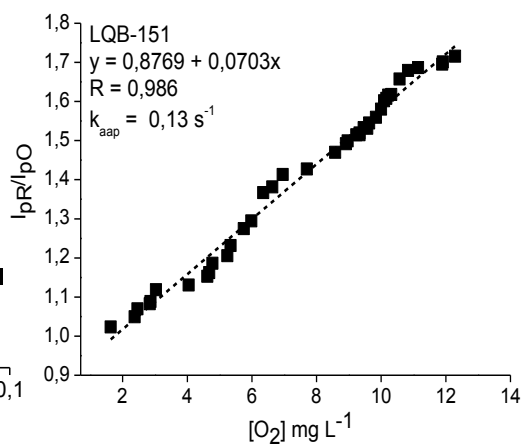
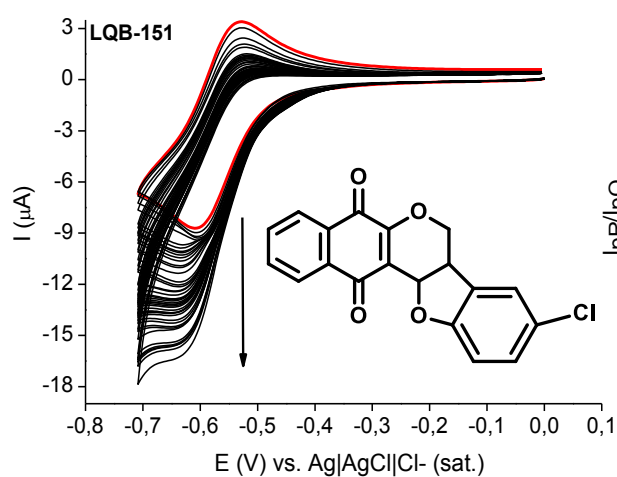
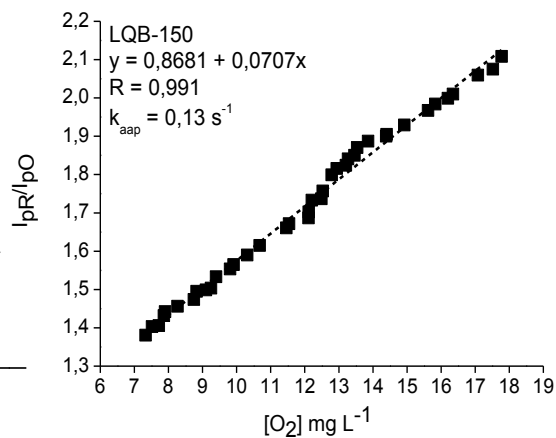
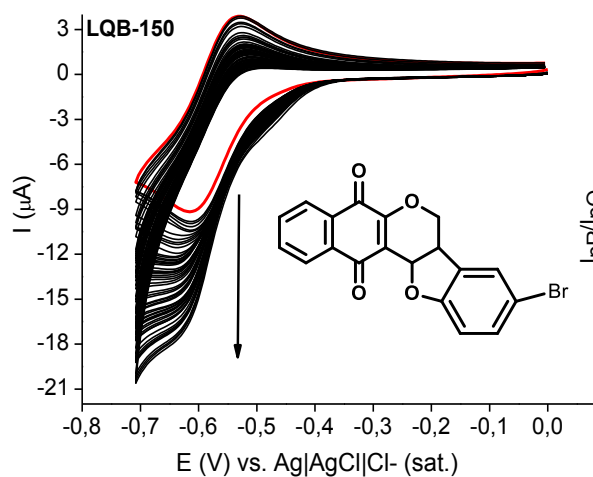
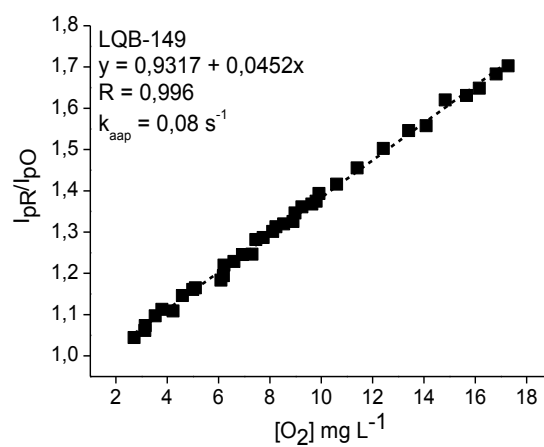
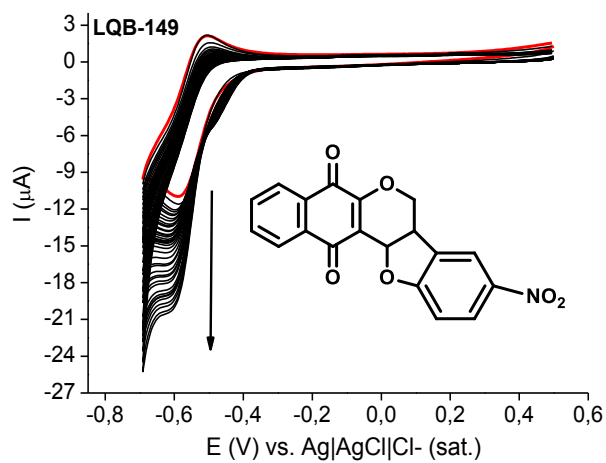


Fonte: Autora, 2014.

Sabendo-se que a solubilidade máxima de oxigênio em DMF a 25° C é 1,85 mmol L⁻¹, por meio dos valores de corrente obtidos em diferentes concentrações de oxigênio traçou-se o gráfico de I_{pR} / I_{pO} vs. [O₂] (Figura 32b), o qual permitiu determinar a constante de velocidade aparente (k_{ap}) entre a semiquinona (Q^{•-}) eletrogerada com o oxigênio. As constantes aparentes de velocidade obtidas e a ordem de reatividade observada foi a seguinte: LQB-118 (0,17 s⁻¹) > LQB-150 (0,13 s⁻¹) = LQB-151 (0,13 s⁻¹) > LQB-149 (0,08 s⁻¹).

Figura 32 - a) Voltamogramas Cíclicos para LQB-118 e seus derivados em DMF/TBAP (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo, em ausência de oxigênio (vermelho) e em presença de diferentes concentrações de oxigênio; $v = 50$ mV s⁻¹. b) Porção linear de I_{pR} / I_{pO} em função da concentração de oxigênio para cálculo da constante aparente de reatividade.





Fonte: Autora, 2014.

A LQB-118 (padrão) apresentou constante catalítica aparente de reatividade frente ao oxigênio de $0,17 \text{ s}^{-1}$. Quando se adiciona ao anel aromático D o grupo nitro

(LQB-149), observa-se uma diminuição da reatividade frente ao oxigênio ($0,08 \text{ s}^{-1}$). Vale salientar que não há conjugação entre as duas partes da molécula. Já com a adição de halogênios ao anel aromático D, observa-se que as pterocarpanoquinonas bromada (LQB-150) e clorada (LQB-151) apresentam a segunda maior reatividade ($0,13 \text{ s}^{-1}$).

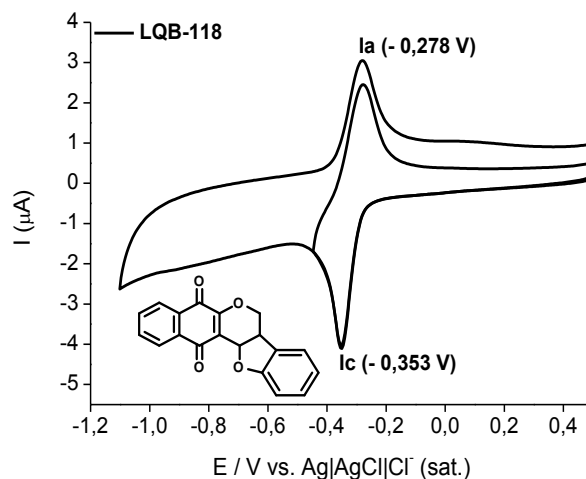
Os presentes resultados sugerem a geração de espécies reativas de oxigênio, podendo ser comparados às evidências farmacológicas para a LQB-118 e seus derivados (MAIA et al., 2011; NETTO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013), em que a morte celular de linhagens de células cancerosas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi induzida por meio da geração de ERO, como descrito anteriormente.

4.1.5 Estudo em meio prótico da LQB-118 e seus derivados por voltametria cíclica

Sabe-se que em meio prótico, as quinonas (Q) sofrem redução bieletrônica em uma única etapa, formando hidroquinonas (Q^{2-}) (WANG et al., 2010). Os potenciais de redução em meio prótico são normalmente menos negativos do que os medidos em meio aprótico. Isso acontece por que meios próticos permitem a transferência de prótons a partir de ânions ou cátions intermediários eletrogerados, conduzindo à sua estabilização (HILLARD et al., 2008)

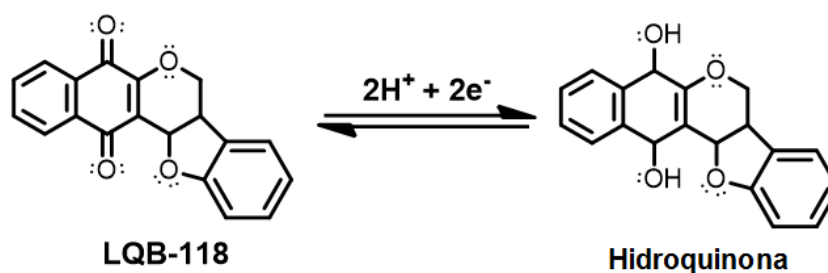
Os estudos eletroquímicos para LQB-118 e seus derivados por voltametria cíclica em meio prótico foram realizados em tampão fosfato, pH 7,4. A fim de viabilizar a total solubilização das pterocarpanoquinonas, optou-se por trabalhar em concentrações baixas, utilizando-se etanol como co-solvente. O comportamento voltamétrico para a LQB-118 em meio aquoso etanólico é mostrado na figura 33. A primeira onda de redução ($I_c = -0,353 \text{ V}$) e sua correspondente onda anódica ($I_a = -0,278 \text{ V}$) formam um par redox (I_c/I_a) referente à transferência de dois elétrons e dois prótons, resultando na formação da hidroquinona correspondente, como mostrado na figura 34. A diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico foi de 75 mV, fato que caracteriza o processo como quase reversível.

Figura 33 - Voltamograma cíclico da LQB-118 ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (20%), tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2014.

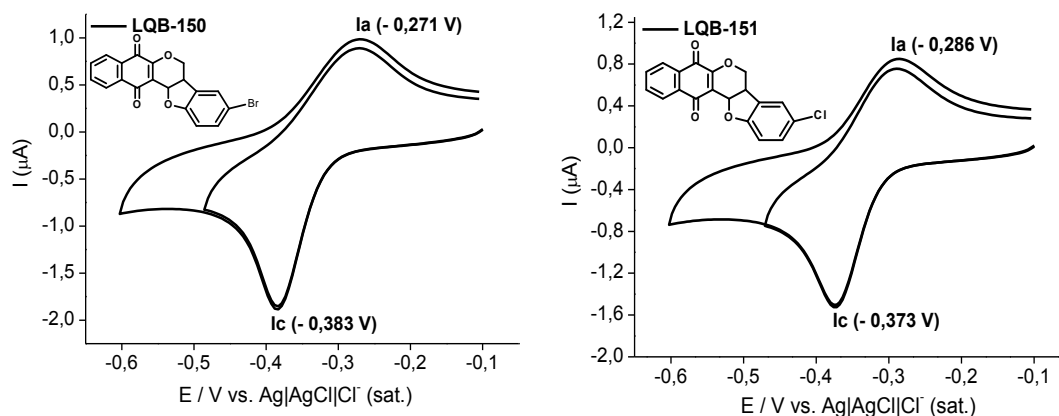
Figura 34 - Mecanismo para a formação da hidroquinona a partir da LQB-118.



Fonte: Autora, 2014.

Os estudos por voltametria cíclica em meio aquoso-etanólico referentes aos derivados da LQB-118 estão representados na figura 35. O perfil dos voltamogramas mostra um sistema constituído de uma onda catódica (I_c), seguido de uma onda de oxidação pouco definida, as quais correspondem à transferência de dois elétrons e dois prótons, levando à formação das hidroquinonas correspondentes. A diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico variou 87-112 mV, o que caracterizam o processo como quase reversível. O derivado bromado (LQB-150) apresentou um ligeiro deslocamento das correntes de pico catódico (para potencial mais negativo) e anódico (para potencial mais positivo), mostrando uma diferença de potencial de 112 mV, enquanto que para o derivado clorado (LQB-151), esta diferença foi de 87 mV (Figura 35). Estudos em meio aquoso com a nitroquinona LQB-149 encontram-se em realização.

Figura 35 - Voltamograma cíclico para os derivados ($c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso etanólico (30%), tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2014.

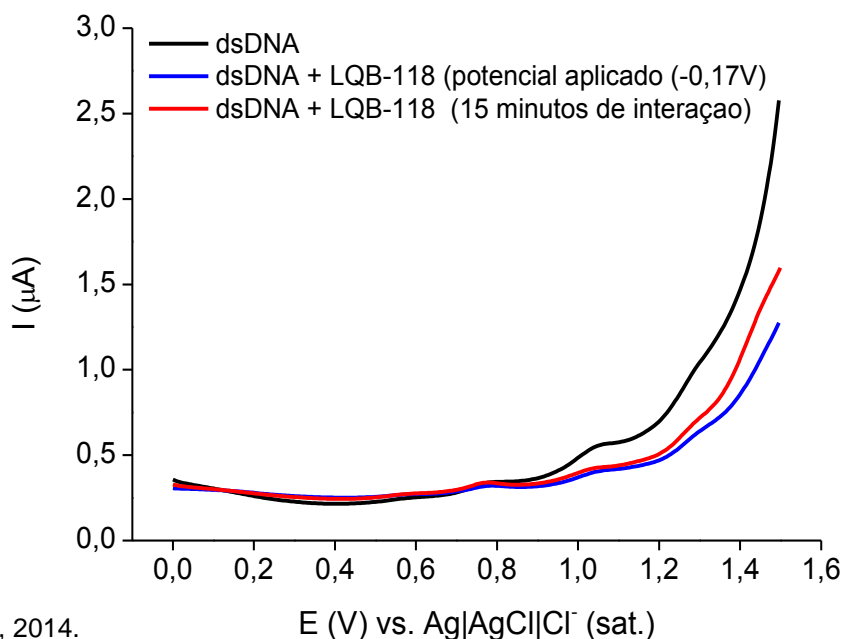
4.1.6 Estudo da interação da LQB-118 com biossensores de DNA utilizando VPD

Os ácidos desoxirribonucléicos exercem relevante papel nos processos biológicos. O DNA é a biomolécula responsável pela transmissão das características hereditárias, além de instruir a síntese de proteínas e enzimas por meio dos processos de replicação e transcrição da informação genética celular (RAUF et al., 2005). A análise das interações entre moléculas orgânicas e o DNA é relevante por estar relacionada aos processos de transcrição e replicação do DNA *in vivo*, mutação de genes e variações das características de cada espécie, bem como por prover informações sobre fármacos cujo alvo biológico de ação é o DNA (YANG et al., 2008).

Quando o dsDNA, imobilizado em superfície eletródica, é incubado em solução de compostos que podem acarretar modificações estruturais ou danos ao mesmo, ocorre exposição das bases púricas na superfície do eletrodo acarretando, então, o aumento ou surgimento de picos referentes à oxidação destas. Considerando-se o ssDNA em relação ao dsDNA, este apresenta picos de oxidação com alta intensidade de corrente e o diagnóstico de possíveis interações de substâncias com o ssDNA é feito pelo decréscimo dessas correntes (DE SOUZA, 2011).

O dano ao DNA pode ser observado de forma direta, onde o biossensor é mantido em contato com solução da substância de interesse por determinado tempo, realizando-se varredura em potencial anódico para mensurar quaisquer alterações. A reatividade da LQB-118 frente à biomolécula do DNA foi investigada, utilizando-se um filme de dsDNA, preparado pela solubilização do DNA dupla fita em tampão acetato, pH 4,5, depositado sobre superfície de um eletrodo de carbono vítreo com o auxílio de uma micropipeta para formar um biossensor de dsDNA. Os estudos por voltametria de pulso diferencial do dsDNA, em presença do composto LQB-118 são representados na Figura 36, os quais foram realizados seguindo duas metodologias. Primeiramente, este biossensor foi imerso na solução contendo LQB-118 e, transcorrido o tempo de contato estabelecido de 15 minutos, efetuaram-se as medidas eletroquímicas, para averiguar possíveis modificações no perfil eletroquímico do DNA. O segundo método consistiu na aplicação de potencial de redução correspondente à redução dos grupos eletroativos da LQB-118, previamente determinado por voltametria de pulso diferencial da amostra em tampão acetato (pH 4,5) e, logo em seguida, realizada a varredura em potencial anódico (Figura 36).

Figura 36 - (—) VPD do biossensor de dsDNA em ausência de LQB-118. (—) VPD do biossensor de dsDNA em presença de LQB-118 ($2 \cdot 10^{-5}$ mol. L⁻¹) com aplicação de potencial de redução (-0,17 V). (—) VPD do biossensor de dsDNA em presença de LQB-118 ($2 \cdot 10^{-5}$ mol. L⁻¹), após 15 minutos de contato. Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (20%), tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5$ mV s⁻¹.

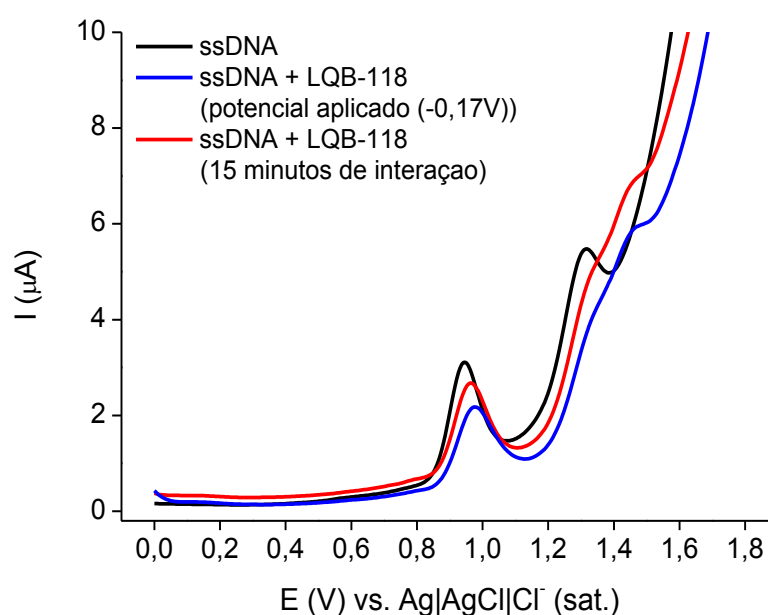


Fonte: Autora, 2014.

Considerando o voltamograma apenas do biossensor (—), os estudos realizados com o tempo (—) e com aplicação de potencial de redução ($E_{ap.} = -0,17\text{ V}$) (—) evidenciaram que tanto a LQB-118 quanto os produtos da eletrorredução **não** são reativos ao DNA, ou seja, LQB-118 **não** apresentou interação frente ao dsDNA.

Ao contrário do dsDNA, em meio aquoso tamponado, pH 4,5, o voltamograma eletroquímico do ssDNA é caracterizado por duas ondas anódicas bem definidas de alta intensidade de corrente, referentes à oxidação das bases púricas, guanina e adenina (Figura 37). Assim, a interação das bases com moléculas DNA-reativas resulta em alterações nas correntes de pico e/ou potenciais de oxidação destas bases. A partir da Figura 37, observa-se que o sinal de oxidação da base guanina sofreu um decréscimo significativo de suas intensidades de corrente, tanto em 15 minutos de contato, quanto após aplicação de potencial, enquanto que com a adenina houve interação, caracterizada pela deformação da feição do pico, portanto, sugere-se que a LQB-118 interagiu com o ssDNA.

Figura 37 – (—) VPD do biossensor de ssDNA em ausência de LQB-118. (—) VPD do biossensor de ssDNA em presença de LQB-118 ($1 \cdot 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$) com aplicação de potencial de redução ($-0,17\text{ V}$). (—) VPD do biossensor de ssDNA em presença de LQB-118 ($1 \cdot 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$) após 15 minutos de contato. Todas as análises foram realizadas em meio aquoso etanólico (20%), tampão acetato ($0,1\text{ mol L}^{-1}$) pH 4,5. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 5\text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2014.

Diante dos dados referentes aos estudos em biossensor eletroquímico de DNA e, considerando que assim como a LQB-118, a β -lapachona e a *nor*- β -lapachona também não interagem diretamente com o dsDNA, fica reforçada a ideia de que esses compostos induzem a danos secundários ao DNA, por exemplo, via produção de ERON, e não por meio da ação direta sobre a macromolécula (intercalação ou alquilação) (CAVALCANTI, 2010).

4.2 PARTE II

4.2.1 Síntese das amidas derivadas do ácido lipóico (AL)

Na segunda parte deste trabalho, investigou-se a síntese de amidas derivadas do ácido lipóico (AL). Esses compostos despertam grande interesse já que, como já exemplificado, podem ter sua atividade realçada. Além disso, as combinações moleculares obtidas por reações de AL com grupos amino-substituídos bioativos, são potentes candidatos a serem antioxidantes multipotentes, ou seja, compostos com outros efeitos farmacológicos, além das propriedades antioxidantes, podendo atuar no tratamento de diversas patologias complexas, como por exemplo, a doença de Alzheimer (ROSINI et al., 2005; HARNETT et al., 2002; KOUFAKI et al., 2001; KOUFAKI et al., 2001; ZANG et al., 2006).

Por outro lado, é preciso considerar que a formação da ligação amida não é trivial e pode muitas vezes apresentar dificuldades, tais como baixos rendimentos, possibilidade de racemização, degradação, e dificuldades de purificação (MONTALBETTI; FALQUE, 2005). Adicionalmente, o ácido lipóico pode sofrer degradação térmica, fotoquímica, degradação em meio ácido e por oxidação (KULKAMP et al., 2009). Dessa forma, necessitou-se de uma metodologia para ser realizada em condições brandas, protegida da luz e em meio neutro.

A priori, descartou-se a metodologia clássica para formação de amidas (ácido carboxílico + amina \rightarrow amida + água), uma vez que se faz necessário aquecimento vigoroso e, neste caso, comprometeria a integridade do ácido lipóico. Portela et al., 2012 enfatizam, em seus estudos, que o ácido lipóico é uma substância lábil e decompõe-se, gradualmente, em temperatura ambiente. Temperaturas acima de seu ponto de fusão (59-62°C) causam imediata polimerização, com necessário descarte, uma vez que o AL polimerizado é praticamente insolúvel na maioria dos solventes.

Sendo assim, optou-se por converter a carboxila do ácido lipóico em um grupo funcional mais reativo, utilizando cloreto de tionila (SOCl_2) para formar o cloreto de acila, que posteriormente seria isolado e reagiria com a amina, conforme mecanismo descrito na figura 7 (pág. 26). A reação foi abortada por não ter sido verificado *via* cromatografia em camada delgada o surgimento do produto de

interesse. Uma possível explicação para isso está relacionada com a formação de ácido clorídrico, com degradação do ácido lipóico. Daí, a conversão direta deste ácido em cloreto de acila não foi possível. Uma proposta para solucionar esse problema, seria optar pela formação da amida *in situ*, adicionando a amina ao meio reacional sem isolar o cloreto de acila. Para neutralizar o HCl formado no processo, poder-se-ia adicionar trietilamina, a qual também serviria para evitar a conversão da amina em seu sal não reativo. Esta possibilidade de otimização ainda não foi executada.

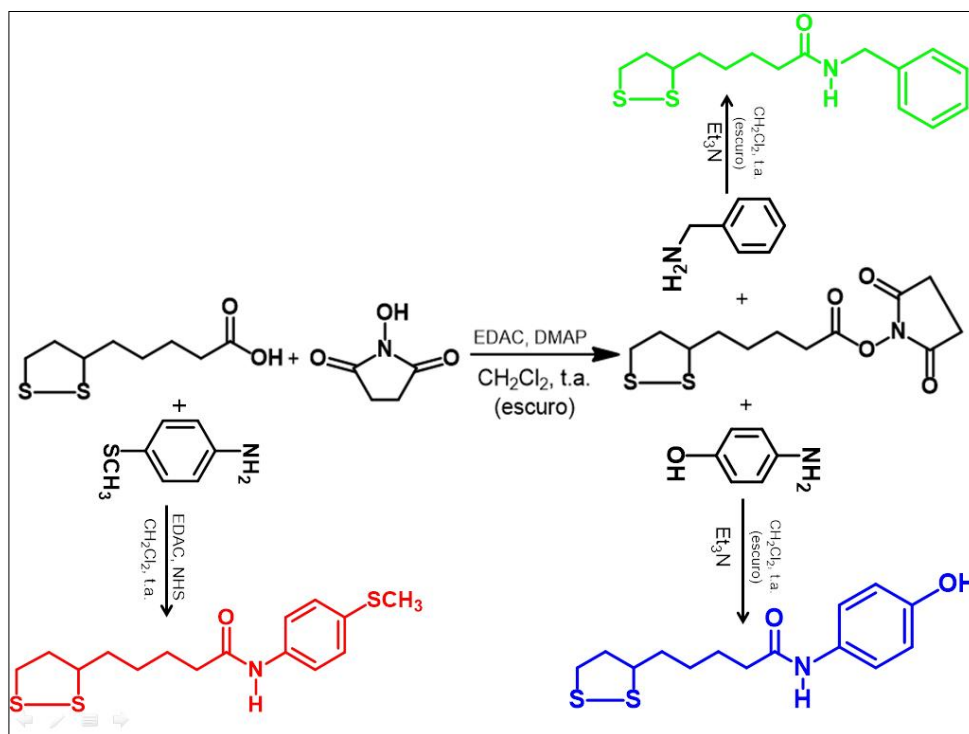
Uma segunda metodologia usada para ativar o ácido lipóico foi através da utilização de reagentes de acoplamento, como DCC, DIC e EDAC (Figura 8, pág. 27) para formar cloretos de ácido, anidridos ou ésteres (VALEUR; BRADLEY, 2008) a depender dos nucleófilos disponíveis. A primeira tentativa de síntese consistiu em converter o ácido lipóico em seu éster ativado, utilizando DCC como reagente de acoplamento e com a pretensão de isolá-lo para, em seguida, reagir com aminas, originando amidas. No entanto, um derivado de ureia pouco solúvel obtido como sub-produto dificultou o processo de purificação e esta tentativa também não foi bem sucedida. A solução foi encontrada com a utilização de EDAC como reagente de acoplamento, já que o derivado de ureia resultante é solúvel em água e pode ser eliminado por lavagens sucessivas (MONTALBETTI; FALQUE, 2005).

Foram sintetizadas três amidas derivadas do ácido lipóico, sendo uma inédita, conforme esquema proposto na figura 38.

Para a síntese da amida **1** (**AL-SCH₃**) seguiu-se o método descrito por Lu et al. (2011), onde, a amida foi gerada *in situ* a partir do AL na presença da amina 4-(metiltio)anilina (**B**), através da adição de EDAC como reagente de acoplamento. Até o momento, não há registros na literatura sobre a síntese e caracterização desta amida, portanto, é inédita. Inicialmente, a carbodiimida reage com o ácido carboxílico para formar a *o*-acilisouréia. Este intermediário pode reagir diretamente com a amina para se obter a amida desejada e ureia como sub-produto, mas muitas vezes, ocorre racemização e transferência de acetil formando um intermediário *N*-acilureia não reativo. Esta reação lateral e indesejada pode ser consideravelmente reduzida através da adição de um nucleófilo, por exemplo, NHS, DMAP e HOBt, que

reagem mais rapidamente e geram um intermediário ainda mais ativo para acoplar, neste caso, com a amina que já está presente no meio reacional (Figura 38).

Figura 38 – Esquema representativo da síntese das três amidas derivadas do ácido lipóico.

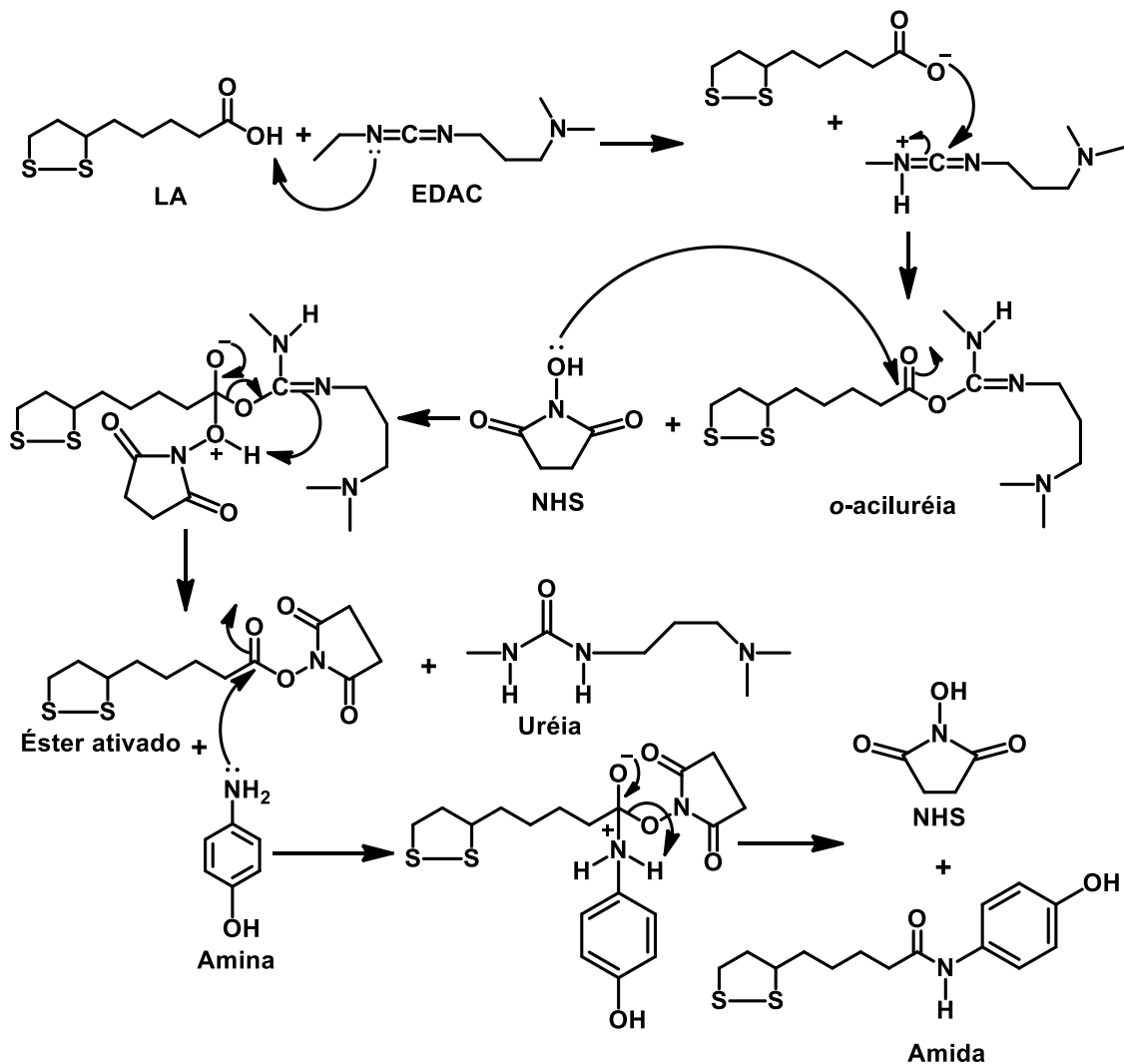


Fonte: Autora, 2014.

Já a síntese das amidas **AL-Bn** e **AL-OH** foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, o éster ativado (**AL-NHS**) foi preparado a partir do ácido e na segunda etapa, reagiu-se o éster ativado com as respectivas aminas, na presença de trietilamina, de acordo com o procedimento descrito por Matulaitiene et al. (2013). Realizou-se a preparação do éster **AL-NHS** seguindo dois procedimentos (A e B), ambos diferindo apenas nas etapas de elaboração e purificação. No procedimento A, o material bruto foi purificado em coluna de sílica (eluente: hexano/acetato de etila) e obteve-se o produto desejado com rendimento de 20%. Sabendo-se que a sílica é ácida, observou-se que parte do éster formado sofria hidrólise na coluna, regenerando o ácido lipóico. Na tentativa de otimizar o rendimento, no procedimento B, o resíduo foi tratado conforme procedimento descrito na seção 3.4.3.2 e ao excluir a etapa de purificação em coluna de sílica, o rendimento foi aumentado para 63%. Todas as reações foram realizadas em atmosfera de nitrogênio.

O mecanismo reacional para as referidas sínteses está exemplicado na figura 39.

Figura 39 – Mecanismo da reação de formação da amida AL-OH.



Fonte: Autora, 2014.

4.2.2 Caracterização do éster ativado e amidas derivadas do ácido lipóico

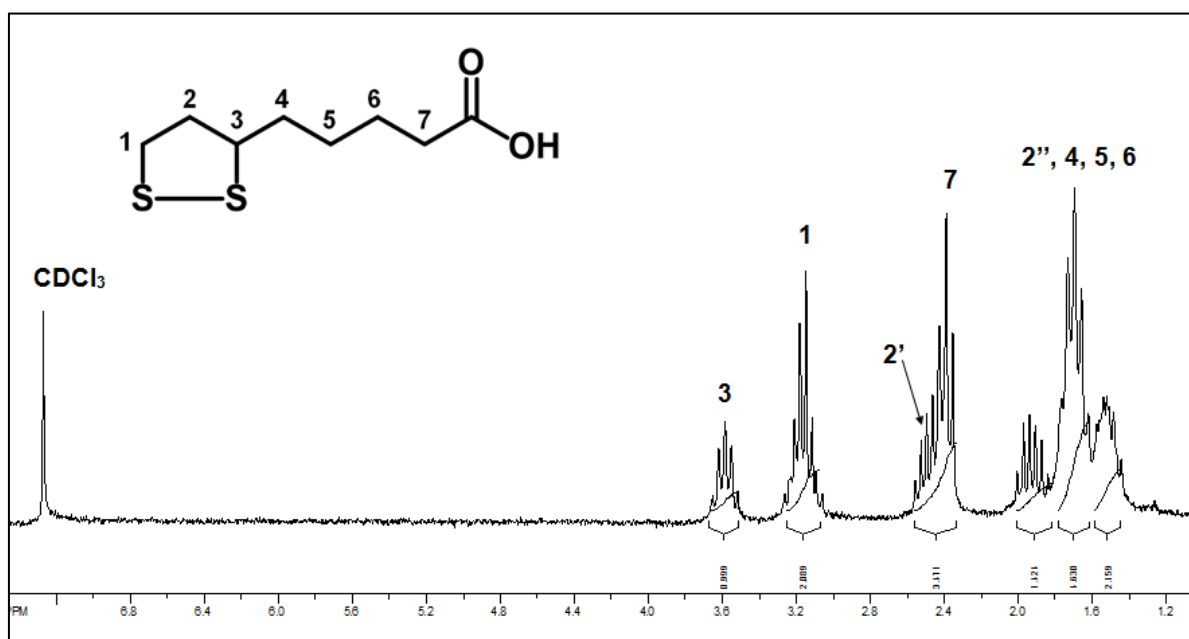
Observação: A numeração adotada para os átomos nas estruturas não corresponde à numeração da nomenclatura IUPAC. Isso foi feito para que compostos com estruturas análogas pudessem ter os seus dados de RMN comparados, quando necessário.

4.2.2.1 Ácido lipóico (AL)

O ácido lipóico foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão disponíveis na literatura, porém optou-se por apresentar os espectros dessa substância nas Figuras 40 e 41, com as devidas atribuições dos sinais, pois os mesmos são úteis na interpretação dos espectros obtidos dos derivados correspondentes.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 40) do **AL** apresentou um multipletto mais desprotegido em δ 3,51 que foi atribuído ao hidrogênio **H3**, pertencente ao carbono metínico, vizinho ao enxofre. O multipletto em δ 3,11 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos **H1**. Um triplete em δ 2,42 foi atribuído aos hidrogênios **H7**, nas proximidades da carboxila. Observou-se ainda, a presença de um multipletto em δ 2,49, o qual se refere a um dos hidrogênios diastereotópicos existentes em **H2**. O multipletto entre δ 2,00-1,52 (m, 7H) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos presentes em **H4**, **H5** e **H6**, além do outro hidrogênio da posição **H2**.

Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o material de partida, LA. δ (ppm) 3,51 (m, 1H; **H3**), 3,11 (m, 2H; **H1**), 2,42 (t, 2H; **H7**), 2,49 (m, 1H; **H2'**), 2,00-1,52 (m, 7H; **H2''**, **H4**, **H5** e **H6**).

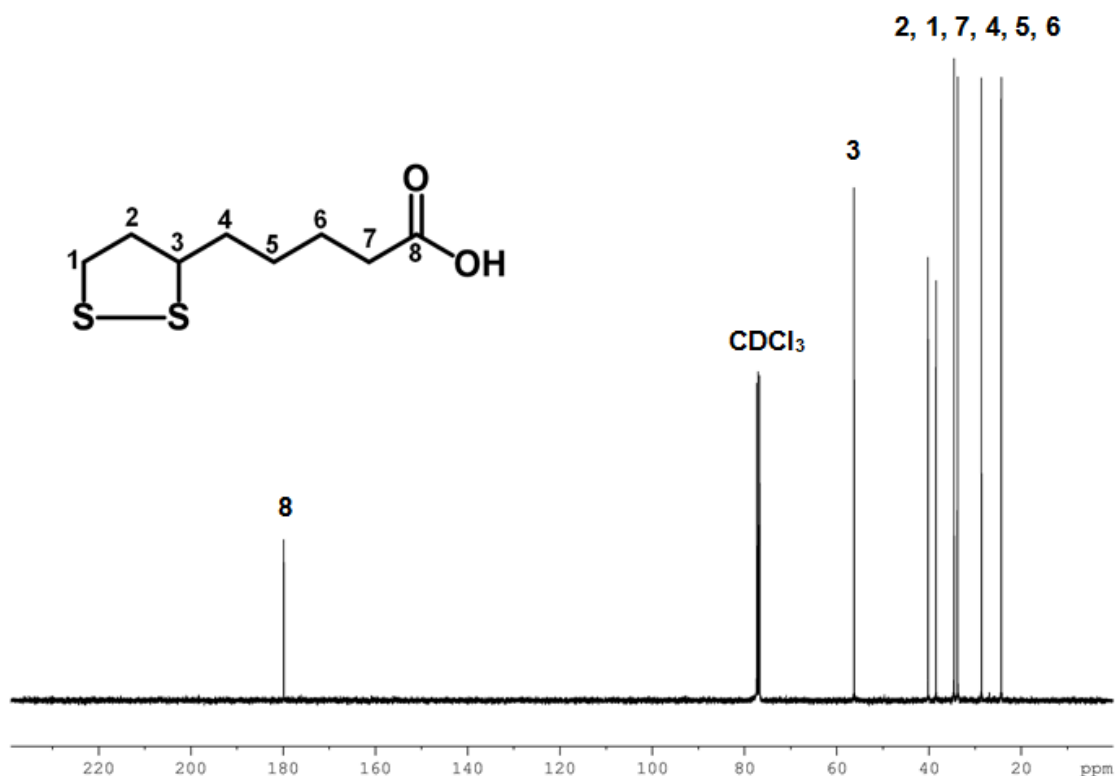


Fonte: Autora, 2014.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 42), observou-se a presença de um sinal em δ 182,50 que foi atribuído ao carbono da carboxila (C8). O sinal em δ 58,92

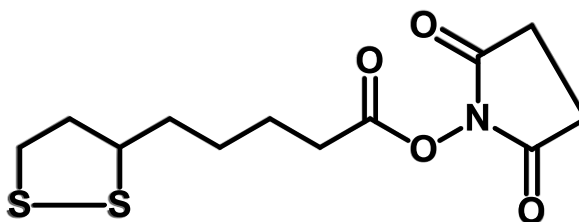
caracteriza o carbono metínico do composto (**C3**). Os diversos sinais presentes entre δ 42,86 e δ 27,01 foram atribuídos aos carbonos metilênicos da seguinte maneira: δ 42,86 (**C2**), δ 41,15 (**C1**), δ 37,22 (**C7**), δ 36,46 (**C4**), δ 31,30 (**C5**), δ 27,01 (**C6**).

Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o material de partida, **AL**.
 δ (ppm): 27,01 (**C6**), 31,30 (**C5**), 36,46 (**C4**), 37,22 (**C7**), 41,15 (**C1**), 42,86 (**C2**), 58,92 (**C3**), 182,50 (**C8**).



Fonte: Yeast Metabolome Database (<http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB00334>)

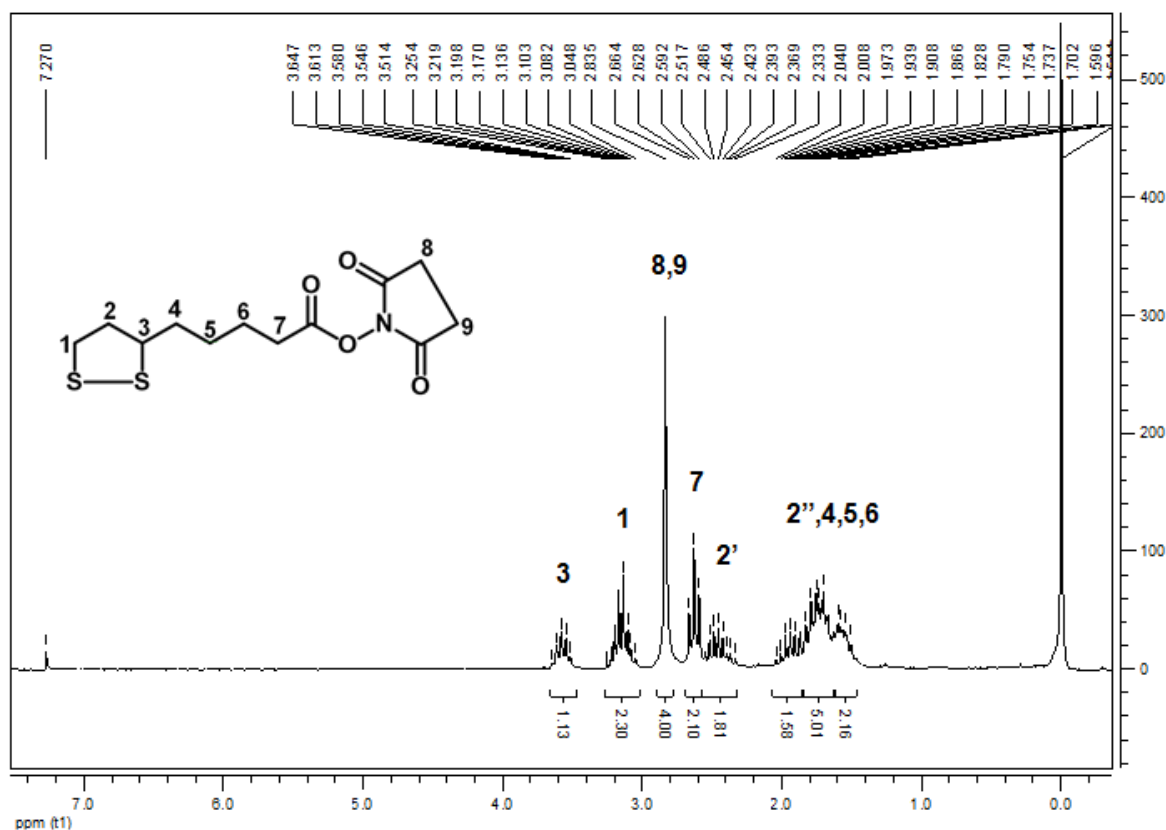
4.2.2.2 2,5-dioxopirrolidin-1-il-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato (AL-NHS)



O composto **AL-NHS** já havia sido sintetizado anteriormente no trabalho de LIU et al.(2005), e seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão disponíveis na literatura. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dessa substância obtida no presente trabalho estão apresentados nas Figuras 42 e 43, com as devidas atribuições dos sinais.

A atribuição dos sinais de RMN de ^1H do composto **AL-NHS** foi auxiliada pela comparação com o espectro de RMN de ^1H do material de partida, o AL (Figura 40). As principais alterações observadas no espectro foram: a presença de um singlete em δ 2,83, com valor de integração igual a quatro, o qual foi atribuído aos átomos de hidrogênio metilênicos **H8** e **H9** que estão em carbonos ligados diretamente à carbonila de amida. Os demais sinais encontram-se em conformidade com a estrutura da molécula e as suas atribuições encontram-se na Figura 42.

Figura 42 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o composto AL-NHS (2). δ (ppm) 3,58 (m, 1H; **H3**), 3,13 (m, 2H; **H1**), 2,83 (s, 4H; **H8** e **H9**), 2,62 (t, 2H; **H7**), 2,48 (m, 1H; **H2'**), 1,99-1,46 (m, 7H; **H2''**, **H4**, **H5** e **H6**).

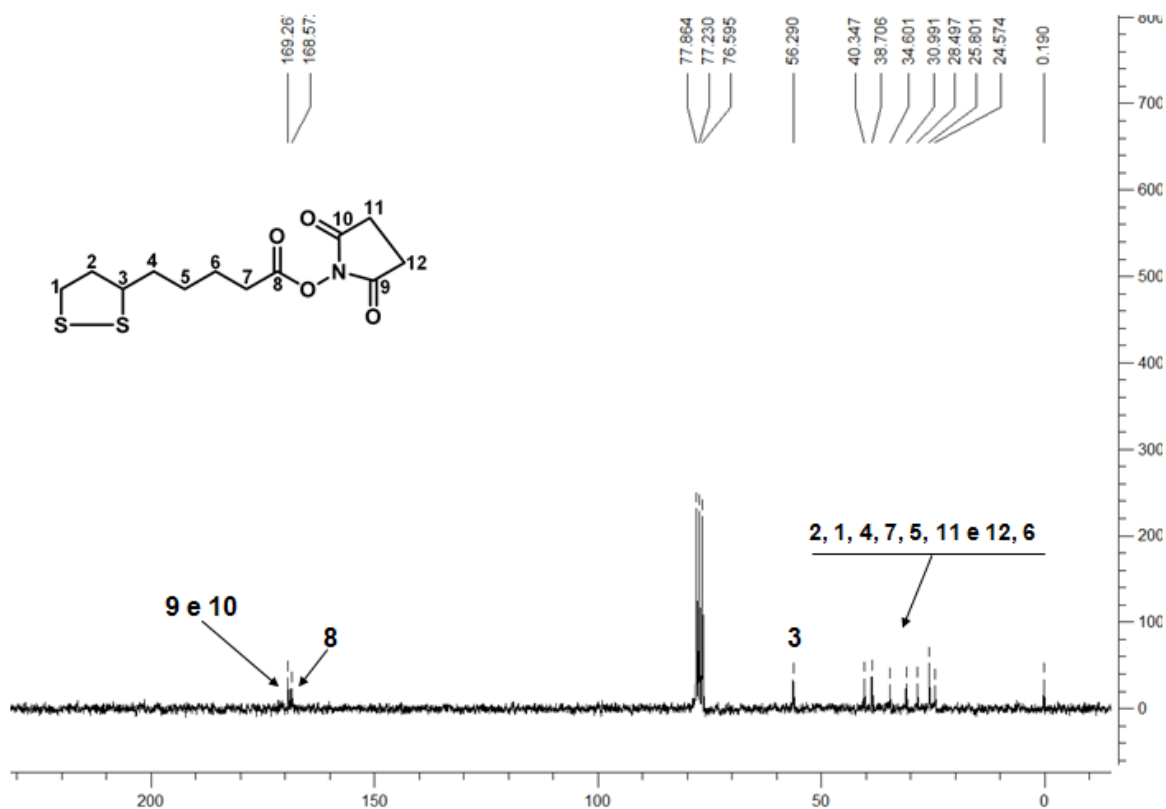


Fonte: Autora, 2014.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 43), a alteração observada em relação ao material de partida (Figura 41) foi a presença de dois sinais em δ 168,57 e 169,26 que foram atribuídos aos carbonos das carbonilas **C8** (carbonila de éster) em δ 168,57 e δ 169,26 referentes à **C10** e **C11** (duas carbonilas de imidas, mais desprotegidas e caem num mesmo campo devido à simetria). Os demais sinais

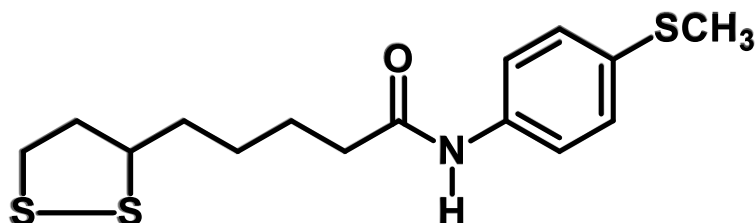
encontram-se em conformidade com a estrutura da molécula e as suas atribuições encontram-se na Figura 43.

Figura 43 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o composto AL-NHS (2).
 δ (ppm): 24,57 (C6), 25,80 (C11 e C12), 28,49 (C5), 30,99 (C7), 34,70 (C4), 38,70 (C1), 40,34 (C2), 56,29 (C3), 168,57 (C8), 169,26 (C9 e C10).



Fonte: Autora, 2014.

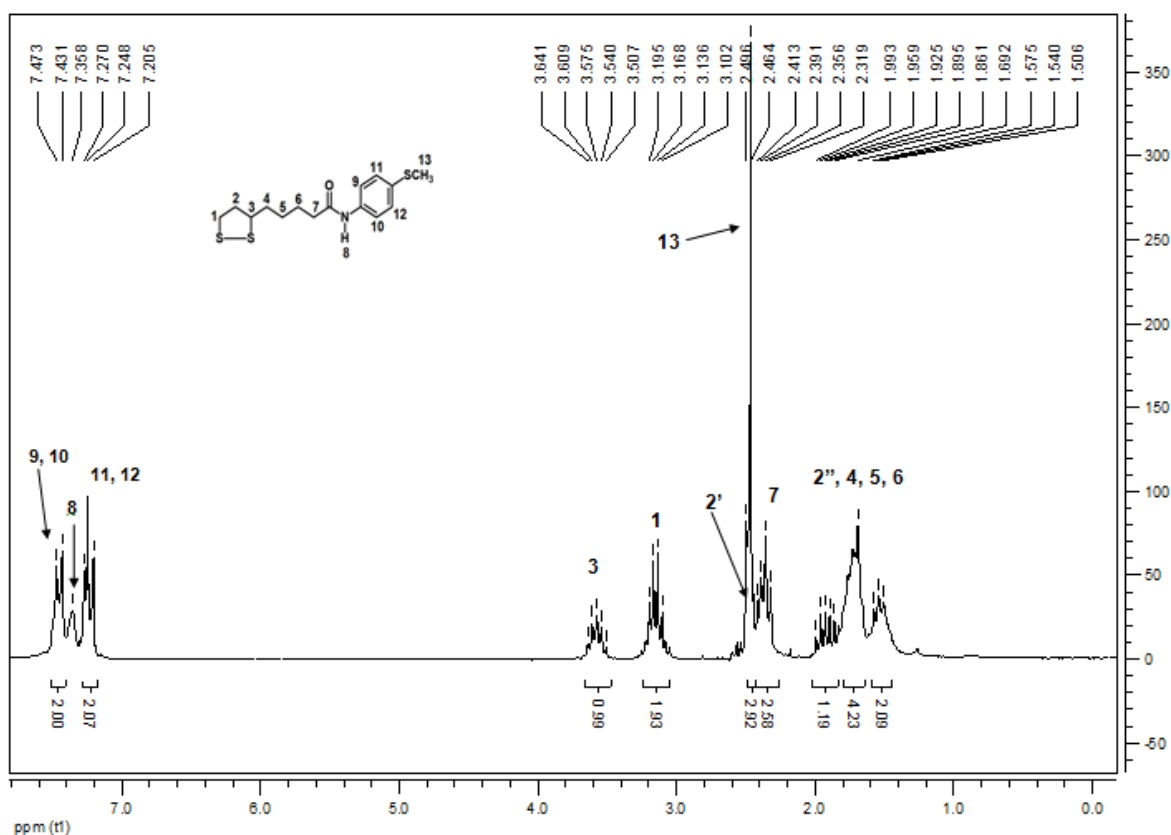
4.2.2.3 5-(1,2-ditiolan-3-il)-N-(4-metiltio)-fenil-pentanamida (AL-SCH₃)



Para este composto, não há registros na literatura. Os sinais na região dos aromáticos merecem ser destacados por estarem ausentes no espectro de RMN de ^1H do material de partida (Figura 40) e são bons indícios da formação do produto desejado. Foram inferidas desse modo as seguintes atribuições: um duplete entre δ

7,43-7,47 ao sinal dos hidrogênios aromáticos **H9** e **H10**, um singlete largo em δ 7,35 ao sinal **H8** de amida, um singlete em δ 2,49 ao sinal dos hidrogênios metílicos (**H13**) ligados ao enxofre. Os demais sinais encontram-se em conformidade com a estrutura da molécula e as suas atribuições estão na Figura 44.

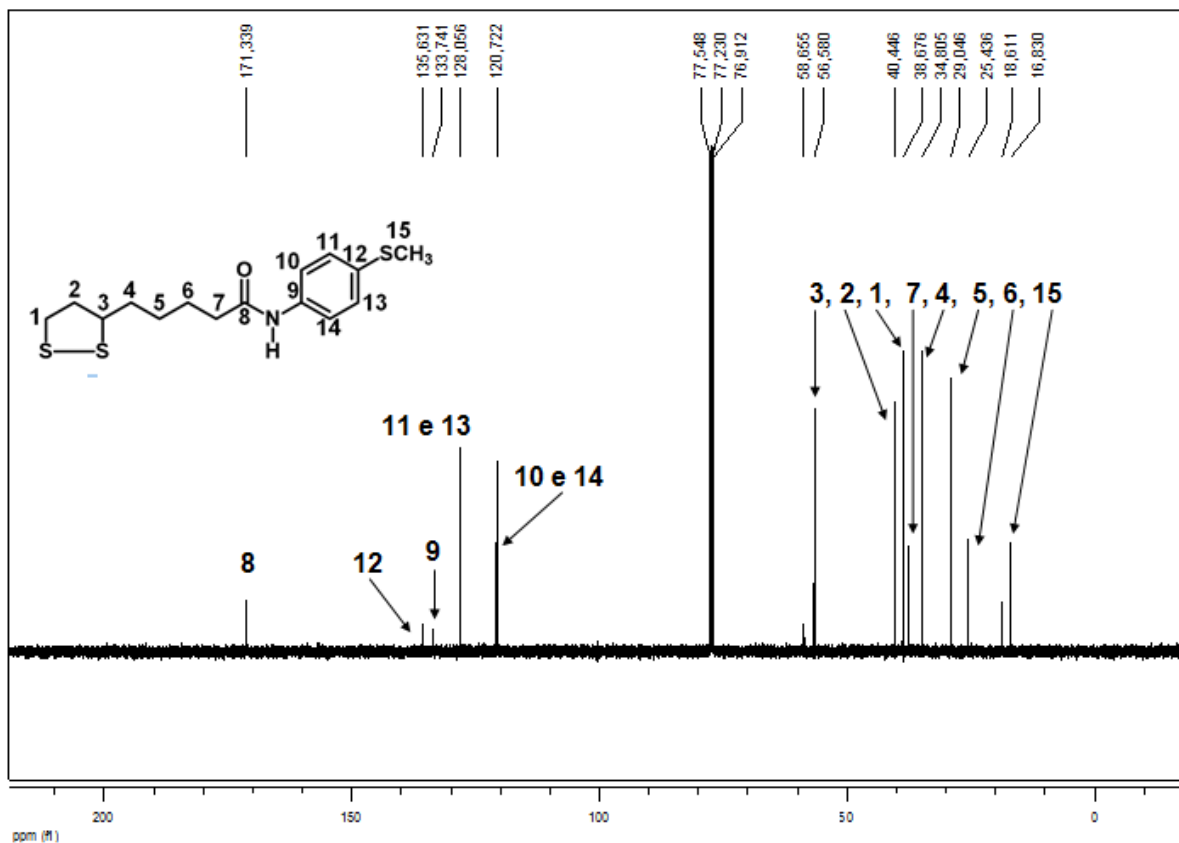
Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o composto AL-SCH₃ (1).
 δ (ppm): 7,43-7,47 (d, 2H; **H9** e **H10**), 7,35 (s largo, 1H; **H8**), 7,20-7,24 (m, 2H; **H11** e **H12**), 3,57 (m, 1H; **H3**), 3,13 (m, 1H; **H1**), 2,49 (s, 3H; **H13**), 2,41 (m, 1H; **H2'**), 2,31 (t, 2H; **H7**), 1,99-1,50 (m, 7H; **H2''**, **H4**, **H5** e **H6**).



Fonte: Autora, 2014.

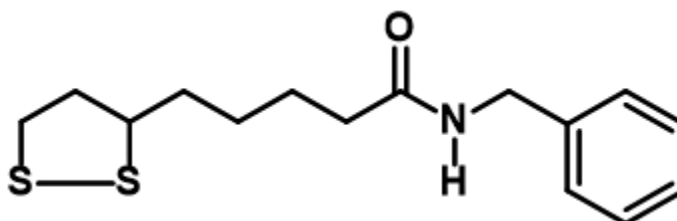
Novamente, as principais alterações observadas no espectro de ^{13}C em relação ao AL (Figura 41) foram o surgimento de sinais na região de aromáticos e de metila ligada a enxofre, desprotegida em relação aos grupos metila alifáticos. Desse modo, foram atribuídos os seguintes sinais: δ 135,63 (**C12**), δ 133,74 (**C9**), δ 128,05 (**C11** e **C13**), δ 120,72 (**C10** e **C14**), δ 16,83 (**C15**) (Figura 46). As demais atribuições foram realizadas por comparação com o LA, mencionadas anteriormente, e estão de acordo com a estrutura da molécula.

Figura 45 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o composto AL-SCH₃ (1).
 δ (ppm): 16,83 (C15), 25,43 (C6), 29,04 (C5), 34,80 (C4), 38,67(C7), 39,52 (C1),
 40,44 (C2), 56,58 (C3), 120,72 (C10 e C14), 128,05 (C11 e C13), 133,74 (C9),
 135,63 (C12), 171,33 (C8).



Fonte: Autora, 2014.

4.2.2.4 N-benzil-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamida (AL-Bn)

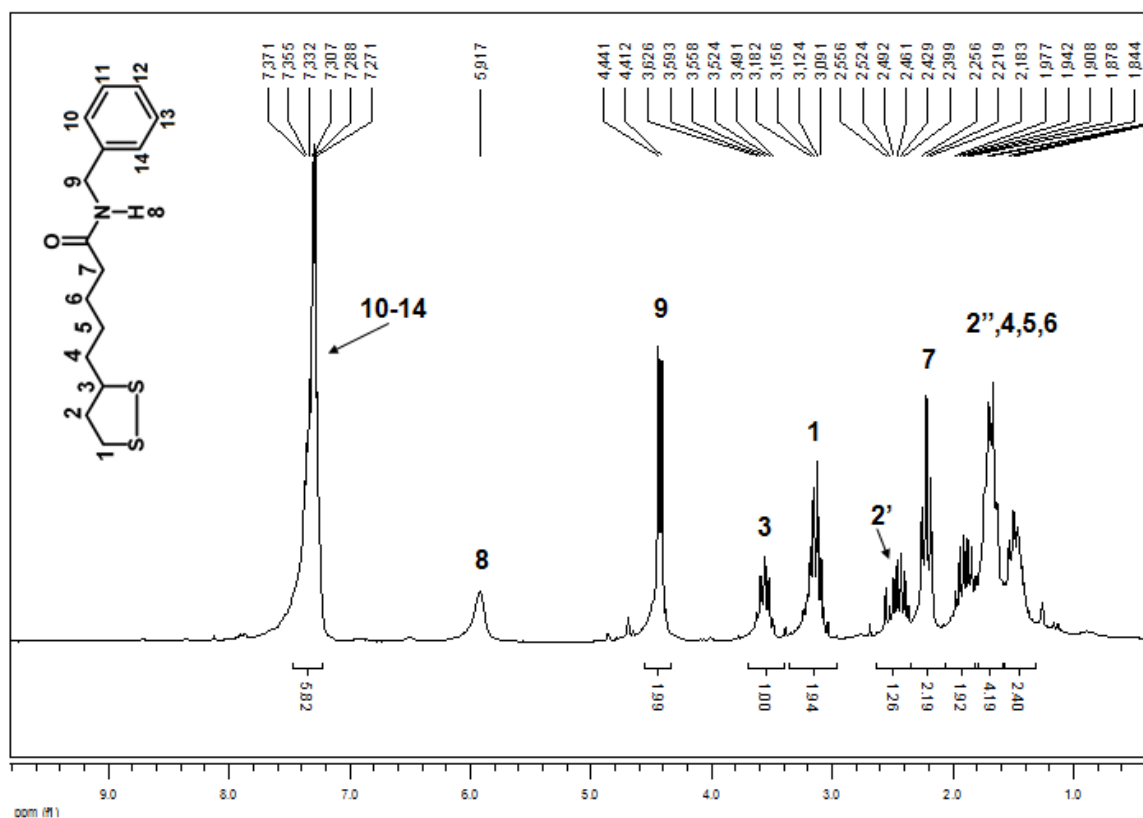


Embora o composto LA-Bn já tenha sido sintetizado (SALVINO et al., 2000; IMPELLIZZERI et al., 2012), faz-se a descrição dos espectros de RMN, uma vez que nos trabalhos mencionados não se encontra descrita a caracterização dessa amida.

A atribuição de sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para a LA-Bn também se baseou na comparação com os espectros descritos nas seções

anteriores. Nas figuras 46 e 47 podem ser observados os espectros de hidrogênio e carbono desse composto com as devidas atribuições. Nota-se que os sinais referentes ao material de partida estão presentes, em conformidade com a Figura 40. O núcleo aromático (**H10 a H14**) mais uma vez foi facilmente identificado pela presença de um multiplete entre δ 7,26-7,37. Um singleto largo em δ 5,91 sugere a presença de hidrogênio (**H8**) de amida e finalmente o duplete em δ 4,41, cujo valor de integração foi igual a dois, foi atribuído ao sinal dos hidrogênios metilênicos **H9**.

Figura 46 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o composto AL-Bn (3).
 δ (ppm): 7,26-7,37 (m, 5H; **H10-H14**), 5,91 (s largo, 1H; **H8**), 4,41 (d, 2H; **H9**), 3,59 (m, 1H; **H3**), 3,12 (m, 2H; **H1**), 2,49 (m, 1H; **H2'**), 2,18 (t, 2H; **H7**), 1,97-1,52 (m, 7H; **H2'',H4,H5,H6**).

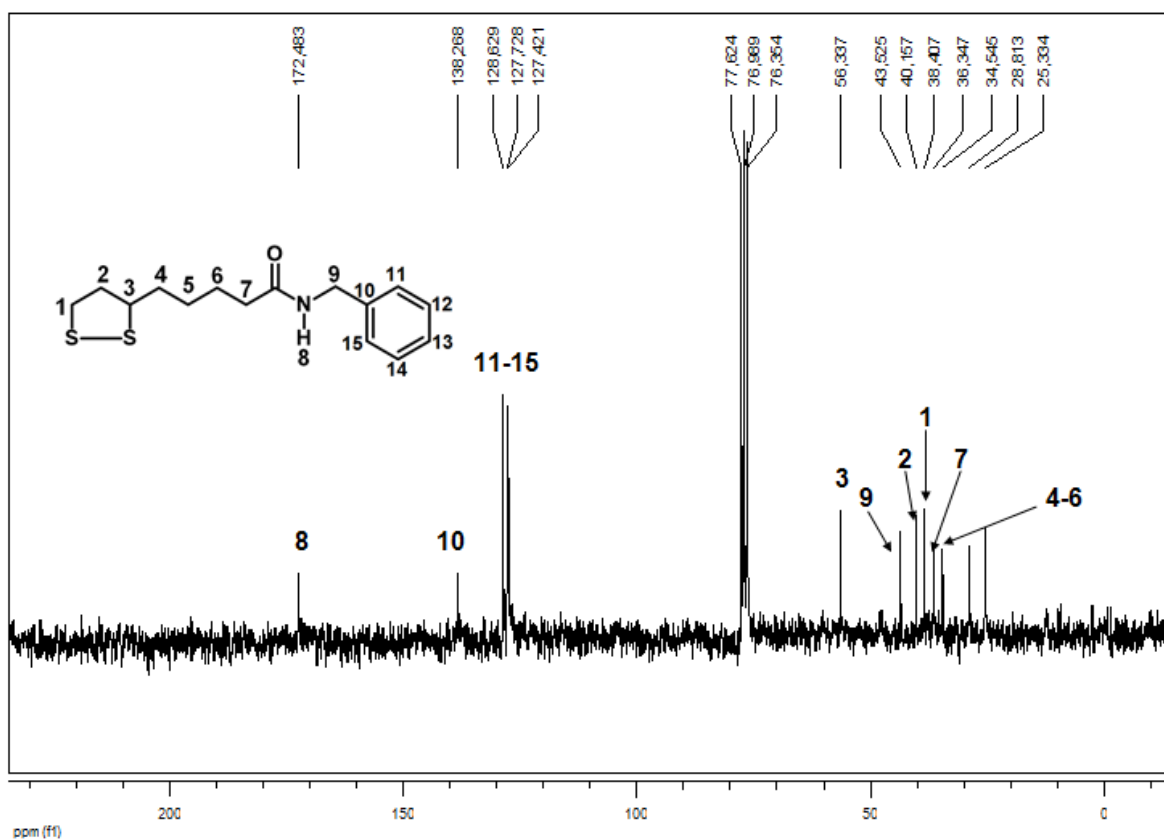


Fonte: Autora, 2014

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 47), observou-se o surgimento de um sinal em δ 172,72 que foi atribuído ao carbono **C8** e é um sinal com deslocamento químico característico de carbonila de amida. Os sinais dos carbonos do grupo aromático (**C10 a C15**) ficaram evidentes entre δ 138,50 e 127,66, sendo o **C10** o mais desprotegido. O sinal de carbono metilênico **C9** em δ 43,76 apareceu na região

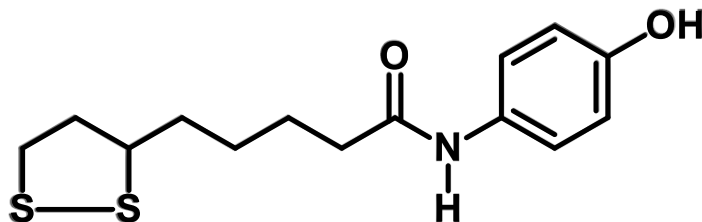
esperada, juntamente com os demais já previstos a partir da comparação com o material de partida.

Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o composto LA-Be (3).
 δ (ppm): 25,57 (C6); 29,05 (C5); 34,78 (C4); 36,58 (C7); 38,64 (C1); 40,39 (C2); 43,76 (C9); 56,57 (C3); 127,66 – 128,87 (C11 a C15); 138,50 (C10); 172,72 (C8).



Fonte: Autora, 2014.

4.2.2.5 5-(1,2-ditiolan-3-il)-N-(4-hidroxifenil)pentanamida (AL-OH)

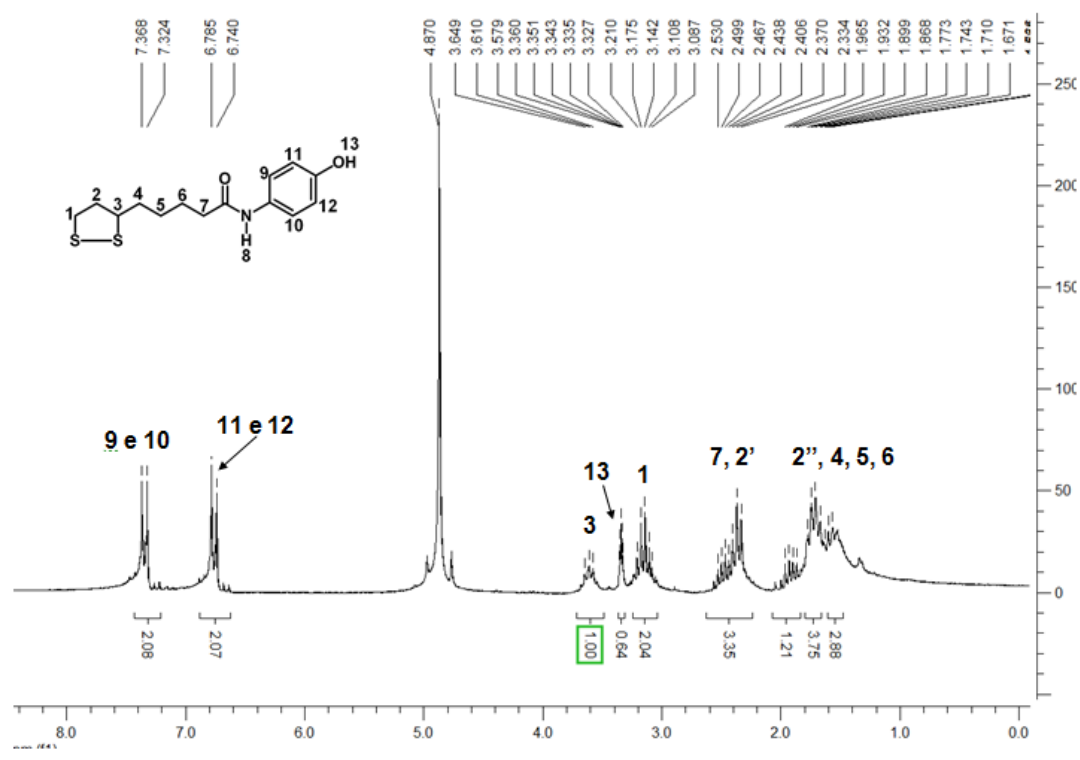


Na literatura não há detalhes sobre a síntese e caracterização deste composto, sendo encontrado apenas um registro de patente. A amida AL-OH possui estrutura muito semelhante ao composto AL-SCH₃ descrito anteriormente e, portanto, a sua elucidação estrutural segue uma lógica similar. No espectro de RMN

^1H , ambos apresentam multipletos localizados na região aromática referente aos hidrogênios **C9** a **C12**, um singlete largo em δ 3,32 foi atribuído ao hidrogênio **C13** da hidroxila fenólica (Figura 48). Em comparação com o material de partida, os demais sinais estão de acordo com a estrutura esperada para os compostos sintetizados e encontram-se atribuídos na figura 48.

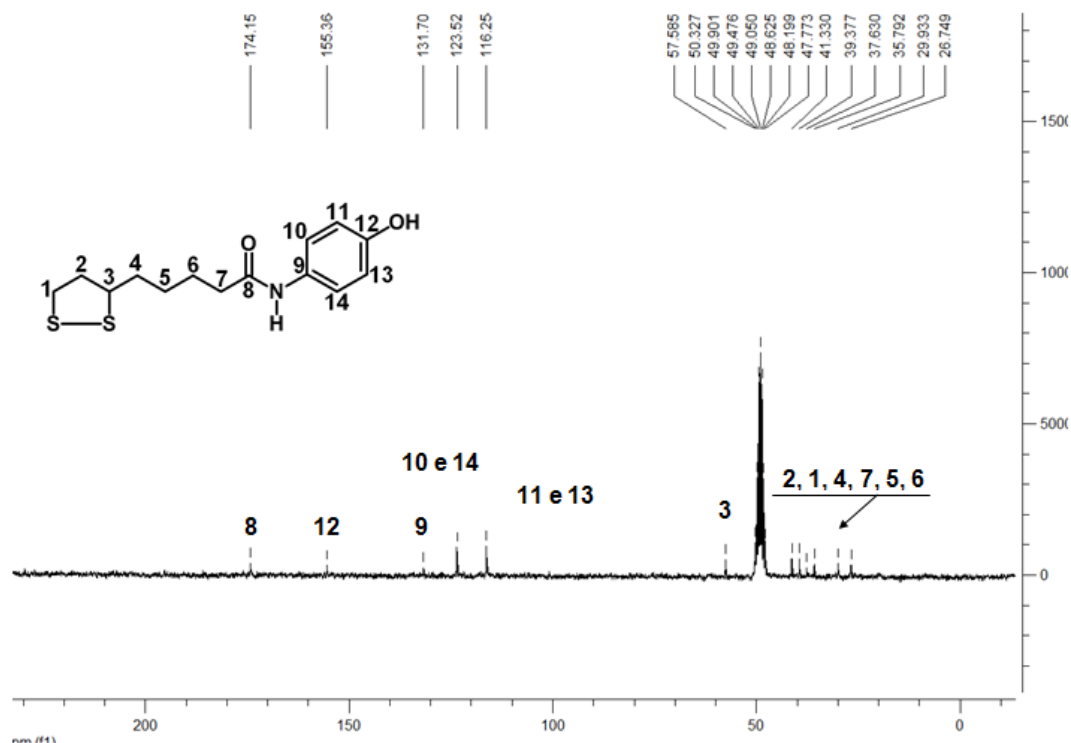
O espectro de RMN de ^{13}C para LA-OH apresenta todos os sinais referentes à estrutura do material de partida (Figura 41) e os sinais na região de aromáticos referentes ao grupo fenila (Figura 50). Observou-se também o surgimento de um sinal em δ 174,15, que foi atribuído ao carbono C8 e é um sinal com deslocamento característico de carbonila de amida.

Figura 48 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, MeOD) para o composto AL-OH (4).
 δ (ppm): 7,32-7,36 (m, 2H; **H9** e **H10**), 6,74-6,78 (m, 2H; **H11** e **H12**), 3,57 (m, 1H; **H3**), 3,32 (s largo, 1H; **H13**), 3,14 (m, 2H; **H1**), 2,53 (t, 2H; **H7**), 2,40 (m, 1H; **H2'**), 1,96-1,56 (m, 7H; **H2''**, **H4**, **H5**, **H6**).



Fonte: Autora, 2014.

Figura 49 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, MeOD) para o composto LA-OH (4).
 δ (ppm): 26,74 (C6); 29,93 (C5); 35,79 (C7); 37,63 (C4); 39,37 (C1); 41,33 (C2);
 57,58 (C3); 116,25 (C11 e C13); 123,52 (C10 e C14); 131,70 (C9); 155,36 (C12);
 174,15 (C8).



Fonte: Autora, 2014.

4.2.3 Ensaio de peroxidação lipídica

Sabe-se que a capacidade de uma molécula se movimentar através de compartimentos biológicos depende da sua lipofilia (CLEMENTE, 2011). Como já descrito, o ácido lipóico atua no ambiente celular tanto nas membranas (predominantemente lipofílica) quanto no citosol (meio hidrofílico) (VALKO et al., 2006). A adição de aminas aromáticas bioativas ao ácido lipóico deram origem a amidas relativamente mais lipofílicas. Em vista da melhor correlação entre as propriedades antioxidantes das amidas derivadas do ácido lipóico e a lipofilia das mesmas, calculou-se teoricamente o coeficiente de partição n-octanol-água (log P). De todos os compostos conjugados sintetizados, a amida AL-SCH₃ (log P = 4,47) é a mais lipofílica, seguida da AL-Bn (log P = 3,73) e AL-OH (log P = 2,78). A amida AL-OH, bem como seu material de partida, o ácido lipóico, parecem ter a lipofilia

ideal para atravessar a barreira hematoencefálica (Log P entre 1 e 3) (ROLEIRA et al., 2010).

Tabela 6 – Valores de log P calculados utilizando-se o programa ACDLabs 6.0 para o ácido lipóico e para as amidas derivadas.

Composto	Log P
Ácido lipóico	2,16 ± 0,29
AL-OH	2,78 ± 0,30
AL-Bn	3,19 ± 0,43
AL-SCH ₃	4,47 ± 0,43

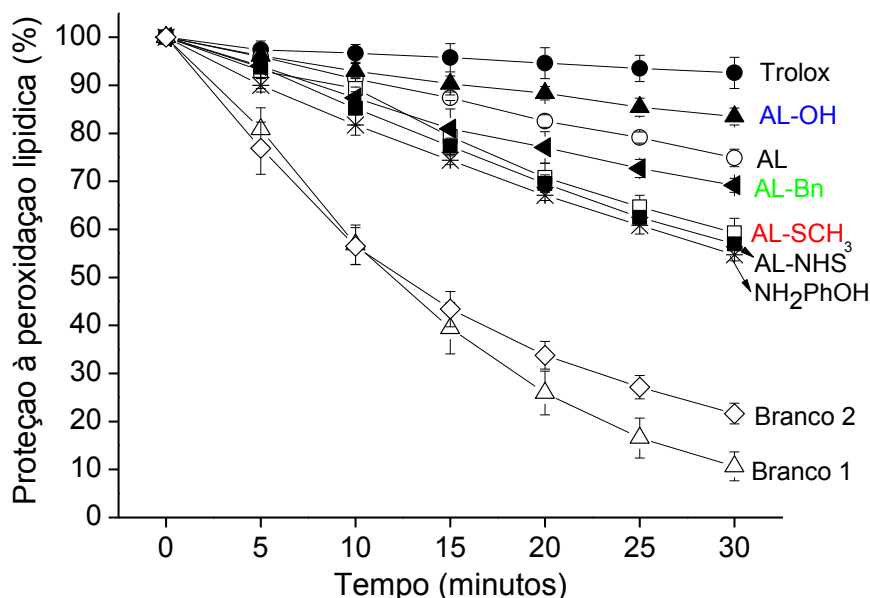
Fonte: Autora, 2014.

Como antioxidantes lipossolúveis se concentram no interior das membranas celulares ou nas lipoproteínas, onde a proteção contra a peroxidação lipídica é extremamente importante (NAGUIB, 1998), optou-se pela realização do método de proteção antioxidante frente à peroxidação lipídica.

A proteção frente à peroxidação lipídica pelo ácido lipóico e pelas amidas derivadas foi avaliada usando um modelo de lipoperoxidação em membrana mediado pelo radical peroxila (lipossomas unilamelares de lecitina de soja) como descrito na seção 3.2.5 e mostrado na figura 22 (pág. 59). A 37°C, o AAPH, um azo composto hidrossolúvel gerador de radicais livres, sofre termólise, originando radicais peroxila. Na ausência de antioxidantes, há um ataque à membrana pelas espécies reativas e conseqüentemente há perda de fluorescência, enquanto, na presença de antioxidantes, há formação de produtos estáveis e a tendência é a manutenção da fluorescência.

A figura 50 mostra a proteção à peroxidação lipídica (%), em função do tempo (tempo total de 30 min), onde primeiro foram feitos dois brancos: (1) lipossoma + sonda C11-BODIPY^{581/591} + tampão fosfato (pH 7,4) + AAPH (-Δ-) e (2) lipossoma + sonda C11-BODIPY^{581/591} + metanol + AAPH (-Δ-), enquanto que Trolox (-●-) foi o controle positivo.

Figura 50 – Proteção frente à peroxidação lipídica (%). (-○-) AL (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (-■-) AL-NHS (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (-▲-) AL-OH (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (-□-) AL-SCH₃ (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (-◄-) AL-Bn (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (-*-) amina NH₂PhOH (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (-●-) Trolox (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) como controle positivo, (-△-) Tampão fosfato + AAPH; (-◇-) Tampão fosfato + metanol usados como controles negativos.

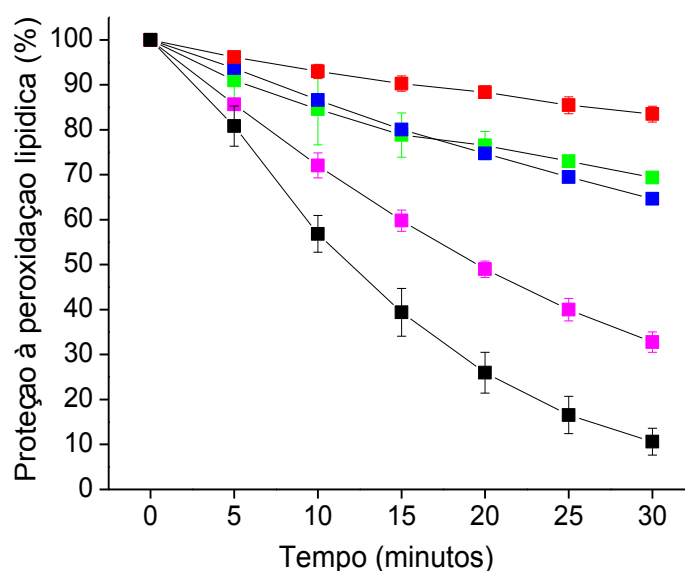


Fonte: Autora, 2014

A peroxidação lipídica lipossomal induzida por AAPH foi observada na ausência de antioxidantes (Branco 1 e branco 2, Figura 50). A potente atividade antioxidante do trolox é bem conhecida e inibe a peroxidação lipídica, fato que é verificado pela ausência de decaimento do sinal de fluorescência e porcentagem de proteção à peroxidação lipídica próxima a 100%. Os ensaios de peroxidação lipídica mostraram que em até 10 minutos de análise cinética, todos os compostos protegeram a membrana de forma muito semelhante ao trolox. Após esse tempo, começou-se a observar um afastamento entre os pontos, caracterizando o início da desproteção em relação ao controle positivo. No tempo total da medida (30 minutos), o AL-OH (-▲-) em metanol apresentou efeitos protetores na membrana próximos ao trolox (na mesma concentração) e mais efetivo que seus precursores, o ácido lipóico (-○-) e a amina *p*-NH₂PhOH (-*-). Assim como o trolox, a amida AL-OH contém um grupo hidroxila fenólico que pode explicar, em parte, a melhor atuação frente à peroxidação lipídica durante todo o tempo de análise quando comparada com os demais derivados. O efeito protetor aqui evidenciado é relevante, visto que a conjugação proposta neste trabalho favoreceu a proteção da membrana em todos os casos (Figura 50).

A fim de verificar a eficiência antioxidante da amida AL-OH, realizaram-se medidas de proteção frente à peroxidação lipídica, em concentrações variadas (Figura 51). Constatou-se que, em 5 minutos de análise, em concentração 4 v. menor (de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $25 \mu\text{mol L}^{-1}$) manteve-se a proteção à membrana. A partir de 10 minutos, observou-se um decaimento da proteção. No tempo final (30 minutos), o gráfico mostra que em concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ o sistema apresentou uma relevante proteção, com valores próximos de 70% e só em $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, esse valor cai para próximo de 40%. Obteve-se um valor de IC_{50} para AL-OH de $31 \mu\text{mol L}^{-1}$. Como mostrado no gráfico, o composto AL-OH protege a membrana de forma bem próxima ao Trolox cujo valor de IC_{50} já foi determinado por Koufaki e colaboradores (2001) e é de $24,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, além disso, de acordo com esse mesmo estudo, para o ácido lipóico o IC_{50} foi maior que $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. Confirma-se, portanto, que as combinações moleculares planejadas e realizadas favoreceram a proteção frente à peroxidação lipídica.

Figura 51 – Proteção contra a peroxidação (%) da amida AL-OH em diferentes concentrações: (-■-) AL-OH ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), (-■-) AL-OH ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), (-■-) AL-OH ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$), (-■-) AL-OH ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (-■-) Tampão fosfato + metanol.



Fonte: Autora, 2014.

4.2.4 Estudo eletroquímico em meio prótico do AL e AL-OH

O voltamograma cíclico do ácido lipóico, na região de oxidação, apresentou um pico de natureza irreversível localizado em torno de +0,85 V (Figura 52), estando próximo dos potenciais de pico apresentados na literatura (FERREIRA et al., 2012). A partir do estudo voltamétrico também foram obtidos os valores de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($I_{p,c}$ vs. $v^{1/2}$). A linearidade dos pontos mostra que o transporte de massa através da solução até a superfície eletródica para o ácido lipóico é de natureza difusional (Figura 53).

Figura 52 – (A) Tampão fosfato pH 7,4, (B) Voltamograma cíclico para o ácido lipóico ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso - Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, (C) Proposta de mecanismo para a oxidação do ácido lipóico.

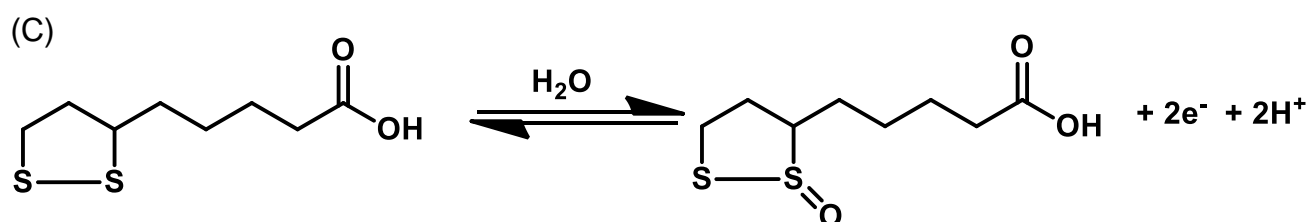
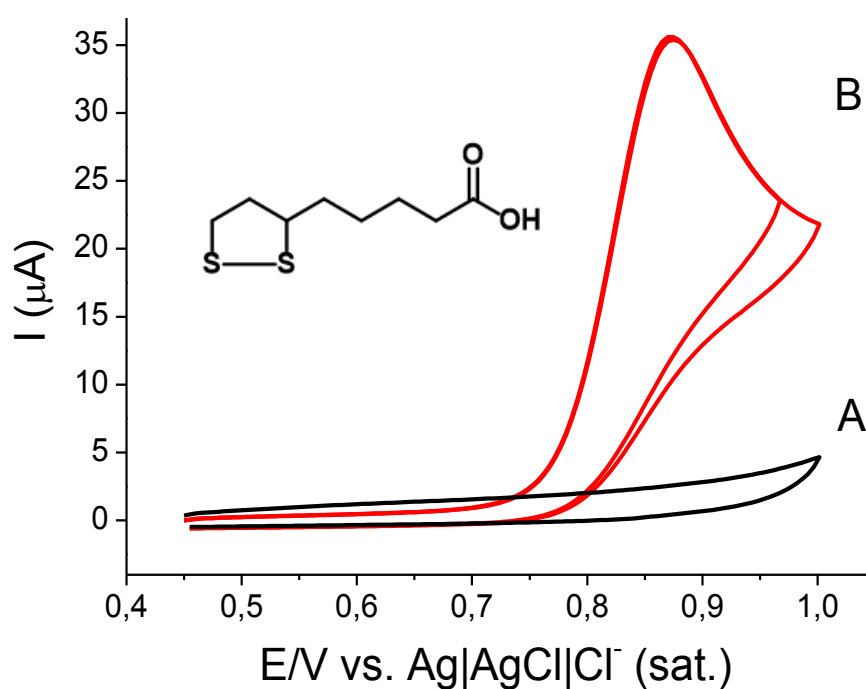
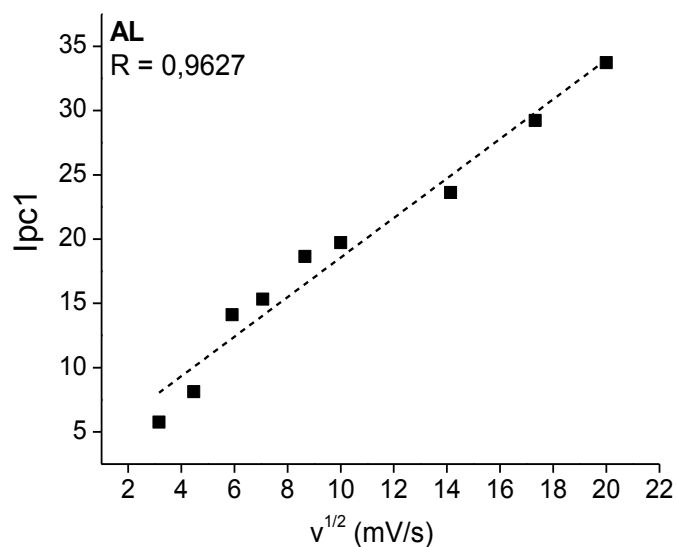


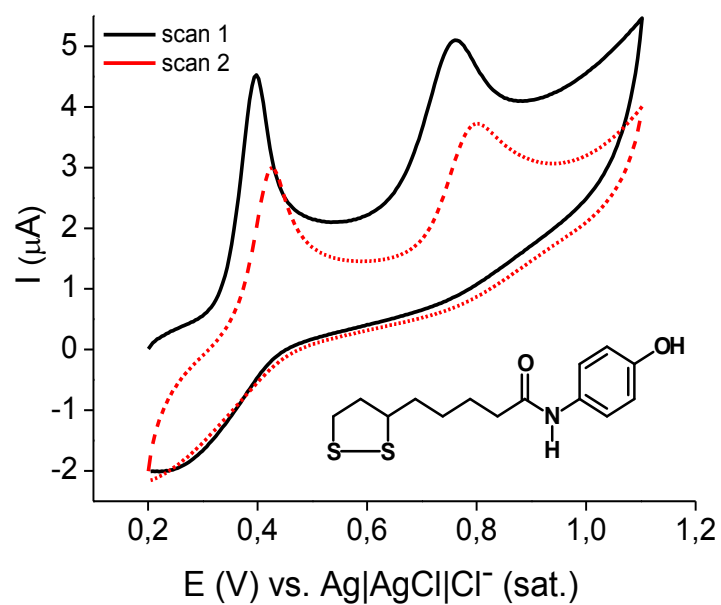
Figura 53 - a) Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a onda de oxidação do ácido lipóico em função de $v^{1/2}$.



Fonte: Autora, 2014.

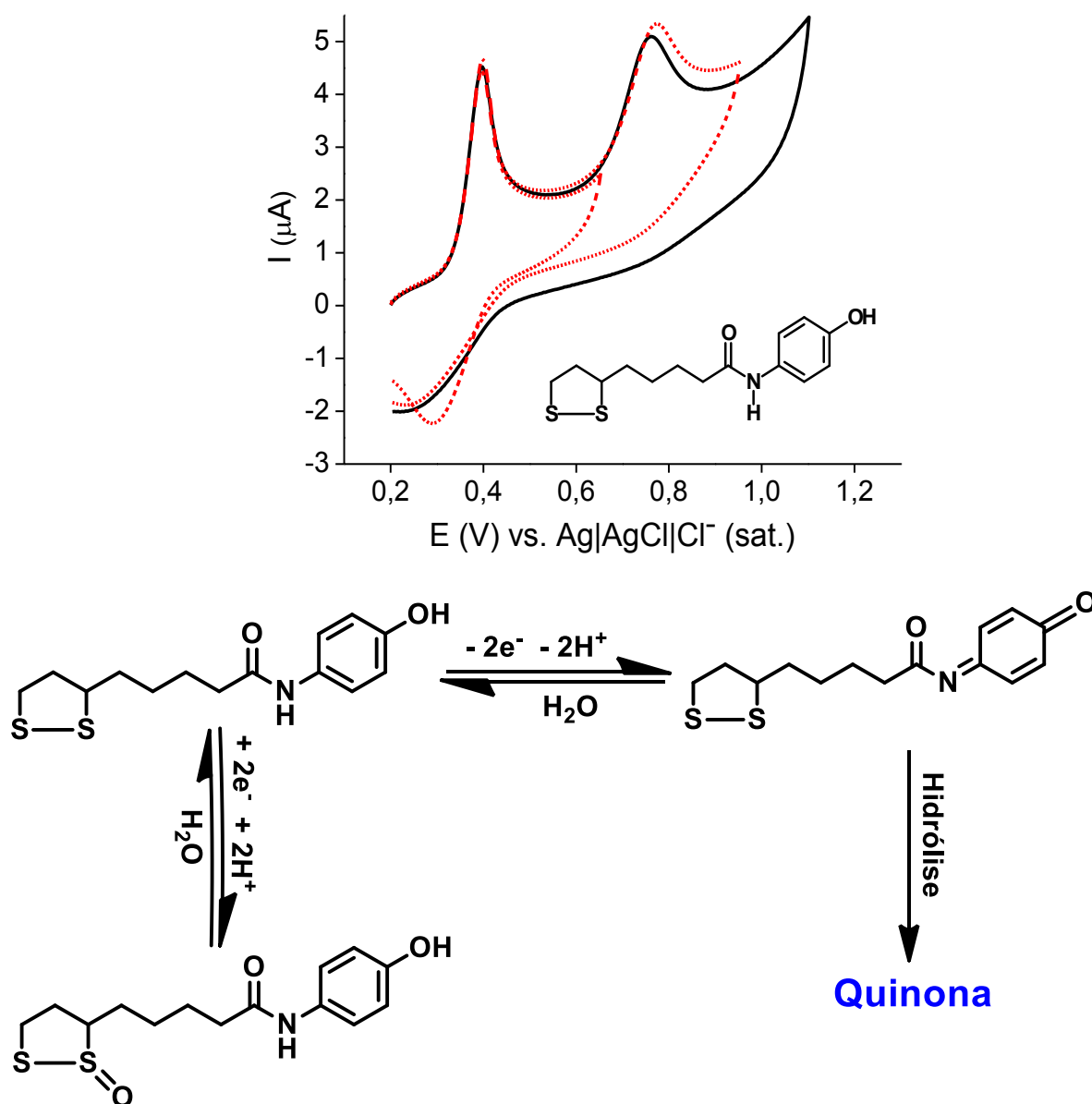
LA-OH também foi estudada eletroquimicamente em meio prótico - tampão fosfato pH 7,4, utilizando-se metanol como co-solvente para viabilizar a solubilização. O perfil voltamétrico da mesma evidencia dois picos de oxidação, característicos de sistemas multifuncionais representados por grupo fenólico (em torno de +0,4 V) e pontes dissulfeto (em torno de +0,8 V). Além disso, observa-se a presença de um pico reverso em torno de +0,3 V que pode ser referente à quinona resultante da hidrólise da amida oxidada, como mostrado na figura 55, B. A comparação entre a primeira e a segunda varredura mostra que houve uma diminuição da corrente de pico e um deslocamento do potencial, o que é característica de adsorção da AL-OH na superfície do eletrodo (Figura 54, A). Dessa forma, o eletrodo foi limpo com alumina (3 μm) e sua área eletroativa foi mantida antes de cada varredura a fim de se obter o voltamograma com evidência de pico reverso (Figura 55). Estudos eletroquímicos complementares encontram-se em realização.

Figura 54 - Voltamograma cíclico para a amida AL-OH ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso metanólico (20%) tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2014.

Figura 55 – (A) Voltamograma cíclico para a amida AL-OH ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso metanólico (20%) tampão fosfato pH 7,4. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (a limpeza do eletrodo foi realizada antes de cada varredura), (B) Proposta de mecanismo de oxidação da amida LA-OH.



Fonte: Autora, 2014.

5 CONCLUSÕES

Os estudos eletroquímicos das pterocarpanoquinonas em meio aprótico revelaram que o mecanismo de redução é complexo com ondas adicionais relacionadas a mudanças estruturais e geração de produtos eletroativos.

Houve evidência de interação com o oxigênio e geração de ERO, o que pode ser correlacionado, em parte, com a ação citotóxica exercida pelas pterocarpanoquinonas em células cancerosas e sua atividade leishmanicida.

A interação direta e após redução da pterocarpanoquinona LQB-118 com dsDNA não foi observada nos estudos com biossensor eletroquímico de DNA.

Foram sintetizadas três amidas derivadas do ácido α -lipóico, sendo uma inédita (AL-SCH₃), utilizando-se EDAC como reagente de acoplamento e NHS para formação do éster ativado.

A atividade antioxidante do ácido lipóico e das amidas sintetizadas foi estudada pelo método de lipoperoxidação, onde foi possível mostrar que todas protegeram a membrana frente à lipoperoxidação, com destaque para AL-OH, com valores de IC₅₀ próximos ao Trolox, controle positivo, e mais efetiva que a exercida pelo precursores ácido lipóico e amina NH₂-OH, evidenciando o sucesso da estratégia de hibridação molecular.

PERSPECTIVAS

- ✓ Determinar completamente o mecanismo de redução das pterocarpanoquinonas por meio de eletrólises, ESR e espectroeletróquímica;
- ✓ Avaliar a interação dos derivados da LQB-118 com DNA;
- ✓ Investigar a citotoxicidade das amidas sintetizadas;
- ✓ Avaliar a proteção que as amidas exercem no ensaio de peroxidação lipídica frente à formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em extrato hepático.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-ZAHER, A. O. et al. The potential protective role of alpha-lipoic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. **Toxicology**, v. 243, p. 261–270, 2008.
- ARMENDARIZ-VIDALES, G. et al. Nature of electrogenerated intermediates in nitro-substituted nor- β -lapachones: the structure of radical species during successive electron transfer in multiredox centers. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 79, p. 5201-5208, 2014.
- BERNARDO, P. H. A. et al. Synthesis and potent cytotoxic activity of 8-and 9-anilinophenanthridine-7,10-diones. **Tetrahedron Letters**, v. 52, p. 92-94, 2011.
- BRETT, A. M. O.; CHIORCEA, A. M.; Effect of pH and applied potential on the adsorption of DNA on highly oriented pyrolytic graphite electrodes. Atomic force microscopy surface characterization. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 178-183, 2003.
- BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; PIEDADE, A. J. P. Chapter 3: Electrochemistry of DNA. **Comprehensive Chemical Kinetics. Applications of Kinetic Modelling**. Edited by R.G. Compton and G. Hancock. ISBN: 978-0-444-50164-6, v. 37, p. 91-119, 1999.
- BILSKA, A; WLODEK, L. Lipoic acid – the drug of the future? **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 570-577, 2005.
- BOLTON, J. L. et al. Role of Quinones in Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, p. 135-160, 2000.
- BUARQUE, C. D. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis,antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 6885–6891, 2011.
- ÇAKATAY, U. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Medical Hypotheses**, v. 66, p. 110–117, 2006.
- CAREY, F.; SUNDBERG, R. **Advanced Organic Chemistry**. Part A: Structure and Mechanisms. 6^a ed. New York: Springer, 2007. p. 228.
- CAVALCANTI, B. C. **Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminados nor- β -lapachônicos: estudos de mecanismo de ação**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, 2010, 171 p.
- CHAU, Y. et al. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor b-lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 24, p. 660–670, 1998.

CHOUDHARI, S. K. et al. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. **Oral Oncology**, v.50, p. 10–18, 2014.

CIRCU, M. L.; Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 749–762, 2010.

CLEMENTE, G. Estudo comparativo de procedimentos experimentais e computacionais para cálculo da lipofilia molecular. **Saúde & Tecnologia**, v. 5, p. 29–34, 2011. ISSN: 1646-9704.

CUNHA-JÚNIOR, E. F. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1555–1559, 2011.

DA SILVA, A. J. M. et al. Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of New (+/-) 1,4 Naphthoquinones Structurally Related to Lapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p. 2731–2738, 2002.

DA SILVA, A. J. M. et al. Antitumoral, Antileishmanial and Antimalarial Activity of Pentacyclic 1,4-Naphthoquinone Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 176-182, 2009.

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

DE ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. L.; GOULART, M. O. F.; Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation electrochemical and bioactive properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 19-35, 2002.

DE MOURA, M.A.B.F. **Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da nor- β -lapachona. Contribuição da farmacoeletroquímica na pesquisa de mecanismo de ação de novos fármacos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2008.

DE OLIVEIRA, A. M. The effects of lipoic acid and α -tocopherol supplementation on the lipid profile and insulin sensitivity of patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 92, p. 253– 260, 2011.

DE PAIVA, Y. G. et al. Redox activation of bioactive compounds and electrochemical driven supramolecular interaction: the example of quinones and ferrocifens. Comunicação Pessoal.

DE SOUZA, A. A. **Estudos bioeletroquímicos de nitroquinonas derivadas da nor- β -lapachona.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2011, 164 p.

DESLAURIERS, J. et al. Preventive effect of α -lipoic acid on prepulse inhibition deficits in a juvenile two-hit model of schizophrenia. **Neuroscience**, v. 272, p. 261–270, 2014.

DOZIO, E. et al. The natural antioxidant α -lipoic acid induces p27^{Kip1}-dependent cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, p. 29–34, 2010.

EL-NAJJAR, N. et al. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. **Phytochemistry Research**, v. 10, p. 353–370, 2011.

ENGLER, T. A. et al. Synthetic pterocarpans with anti-hiv activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.3, p. 1229-1232,1993.

DRUMMEN, G. P. C. et al. C11-Bodipy^{581/591}, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 4, p. 473-490, 2002.

FERREIRA, F. R. **Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2013, 151 p.

GHANIZADEH, A. Gold nanoparticles and lipoic acid as a novel anti-inflammatory treatment for autism, a hypothesis. **Journal of Medical Hypotheses and Ideas**, v. 6, p. 40–43, 2012.

GRUSMAN, A. et al. Synthesis and characterization of new and potente α -lipoic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1183-1190, 2004.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HARDAS, S. S. et al. Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain. **Redox Biology**, v. 1, p. 80–85, 2013.

HARNETT, J. J. et al. Novel lipoic acid analogues that inhibit nitric oxide synthase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p. 1439–1442, 2002

HE, L. et al. α -lipoic acid protects heart against myocardial ischemia–reperfusion injury through a mechanism involving aldehyde dehydrogenase 2 activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 678, p.32–38, 2012.

HENDERSON, L. C. et al. A comparative assessment of α -lipoic acid *N*-phenylamides as non-steroidal androgen receptor antagonists both on and off gold nanoparticles. **Bioorganic Chemistry**, v. 40, p. 1–5, 2012.

HENRIKSEN, E. J. Exercise training and the antioxidant α -lipoic acid in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 3 – 12, 2006.

HILLARD, E. A. et al. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical Communications**, p. 2612-2628, 2008.

HOLMQUIST, L. et al. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 154–164, 2007.

IMPELLIZZERI, S. et al. Photoinduced Enhancement in the Luminescence of Hydrophilic Quantum Dots Coated with Photocleavable Ligands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 2276–2283, 2012.

JIANG, Y. et al. Effect of nitro substituent on electrochemical oxidation of phenols at boron-doped diamond anodes. **Chemosphere**, v. 78, p.1093–1099, 2010.

JIMÉNEZ-GONZALÉZ, L. et al. Pterocarpans: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. **Phytochemistry Review**, v. 7, p. 125–154, 2008.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-1879, 2006.

KARA, H. E. S. Redoxmechanism of anticancer drug idarubicin and in-situ evaluation of interaction with DNA using an electrochemical biosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 99, p. 17–23, 2014.

KAROLIN et al. Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 7801-7806, 1994.

KASSAB, A; PIWOWAR, A. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. **Biochimie** , v. 94, p. 1837-1848, 2012.

KISHIKAWA, N; KURODA, N. Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 261–270, 2014.

KULKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova** [online], vol.32, n.8, p. 2078-2084, 2009.

KOUFAKI, M; DETSI, A. KIZIRIDI, C. Multifunctional Lipoic Acid Conjugates. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p. 4728-4742, 2009.

KUMAGAI, Y. et al. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, p. 221-247, 2012.

LEE, H. S.; NA, M. A.; KIM, W. O. α -Lipoic acid reduces matrix metalloproteinase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Nutrition Research**, v. 30, p. 403–409, 2010.

LIU, W. et al. Compact Biocompatible Quantum Dots Functionalized for Cellular Imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 1274-1284, 2008.

LU, C.; KIM, B.; CHAI, K. Y. Design, synthesis and evaluation of PEGylated lipoic acid derivatives with functionality as potente anti-melanogenic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5184-5188, 2011.

LUO, J. et al. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer Cell**, v. 6, p. 297- 305, 2004.

MACDONALD, R. C. et al. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, n. 2, p. 297-303, 1991.

MACDONALD, M. L.; MURRAY, I. V. J.; AXELSEN, P. H. Mass spectrometric analysis demonstrates that BODIPY 581/591 C11 overestimates and inhibits oxidative lipid damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1392-1397, 2007.

MAIA R.C., et al. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2 hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. **Investigational New Drugs**, v. 29, p. 1143–1155, 2011.

MARTINEZ, M. J. A; BENITO, P. B. Biological activity of quinones. **Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 303–366, 2005.

MATULAITIENE, I. et al. SERS characterization of imidazole ring terminated self-assembled monolayer formed from lipoic acid histamide on silver electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 700, p.77–85, 2013.

MERIC, B. et al. Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4,4'-dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 3, p. 1339–1346, 2002.

MIDDLETON, E; KANDASWAMI, C; THEOHARIDES, T. C. The effects of plantflavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and câncer. **Pharmacology Review**, v. 52, p. 673–751, 2000.

MONKS, T. J. et al. Quinone Chemistry and Toxicity. **Toxicology and applied Pharmacology**, v. 112, p. 2-16, 1992.

- MONKS, T. J; JONES, D. C. The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers. **Current Drug Metabolism**, v. 3, p.425–438, 2002.
- MONTALBETTI, C. A. G. N; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10827–10852, 2005.
- MOURA, F. A. et al. Lipoic Acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. Comunicação pessoal.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 1–13, 2009.
- NAGUIB, Y. M. A. A Fluorometric Method for Measurement of Peroxyl Radical Scavenging Activities of Lipophilic Antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 290–298, 1998.
- NETTO, C. D. et al. (+/-)-3,4-Dihydroxy 8,9methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 920–925, 2009.
- NETTO, C. D. et al. New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 18, p. 1610–1616, 2010.
- NETTO, C. D. **Síntese de Pterocarpanos e Pterocarpanoquinonas: Substâncias com Potencial Atividade Antineoplásica, Antimalarial e Leishmanicida**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- NOHP, H; JORDAN, W; YOUNGMAN, R. J. Quinones in Biology: Functions in Electron Transfer and Oxygen Activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 2, p. 211-279, 1986.
- PACK, R. A. et al. Differential effects of the antioxidant α -lipoic acid on the proliferation of mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes and leukaemic T cells. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 733–745, 2001.
- PACKER, L; KRAEMER, K; RIMBACH, G. Molecular Aspects of Lipoic Acid in the Prevention of Diabetes Complications. **Nutrition**, v.17, p. 888–895, 2001.
- PERLINGER, J. A. et al. Addition of Hydrogen Sulfide to Juglone. **Environmental Science and Technology**, v. 36, 2663–2669, 2002.
- PORTELA, A. S. et al. Vapor pressure curve determination of α -lipoic acid raw material and capsules by dynamic thermogravimetric method. **Thermochemica Acta**, v. 544, p. 95–98, 2012.
- PORTES, J. A. et al. A new type of pterocarpanquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. **Veterinary Parasitology**, v.186, p. 261–269, 2012.

RAUF, S., iet al., Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, p. 205–217, 2005.

RIBEIRO, G. A. et. al. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 3, p. 1–11, 2013.

ROLEIRA, F. M. F. et al. Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 5816–5825, 2010.

ROSINI, M. et al., Rational Approach To Discover Multipotent Anti-Alzheimer Drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 360-363, 2005.

ROSSI, C. et al. Intestinal tumour chemoprevention with the antioxidante lipoic acid stimulates the growth of breast câncer. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2696–2704, 2008.

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, 2008.

SALVINO, J. M. et al. Polymer-Supported Tetrafluorophenol: A New Activated Resin for Chemical Library Synthesis. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v.2, p. 691-697, 2000.

SOKOŁOWSKA, M. et al. The effect of lipoic acid on cyanate toxicity in the rat heart. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 87–92, 2014.

SONG, Y., BUETTNER G. R. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. **Free Radical and Biological Medicine**, v. 49, pg. 919-962, 2010.

TAN, A. S; BERRIDGE, M. V. Evidence for NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)-mediated quinone-dependent redox cycling via plasma membrane electron transport: A sensitive cellular assay for NQO1. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48 , p. 421–429, 2010.

TRIVEDI, P. P; JENA, G. B. Role of α -lipoic acid in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: Studies on inflammation, oxidative stress, DNA damage and fibrosis. **Food and Chemical Toxicology**, v.59, p.339–355, 2013.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v.7, p. 65-74, 2009.

VALEUR, E; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 606–631, 2009.

VALKO, M.; *et al.*, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interac.**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L., *et al.*, Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes de marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VENTURA, C. P. **Uso de micro-ondas na síntese de novos(+/-) pterocarpanos com atividade sequestradora de radicais livres.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 160p.

WANG, Y. *et al.* The electrochemical reduction of 1,4-benzoquinone in 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethane-sulfonyl)-imide, [C₂mim][NTf₂]: A voltammetric study of the comproportionation between benzoquinone and the benzoquinone dianion. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 648, p. 134-142, 2010.

VAN AARDT, T. G.; VAN RENSBURG; FERREIRA, D. Synthesis of isoflavonoids. Enantiopure cis- and trans-6a-hydroxypterocarpanes and a racemic trans-pterocarpan. **Tetrahedron**, v. 57, p. 7113-7126, 2001.

YADAV, J. S. *et al.* Organic synthesis in water: Green protocol for the conjugate addition of thiols to *p*-quinones. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 274, p. 116–119, 2007.

ZHANG, H; YANG, D; TANG, G. Multipotent antioxidants: from screening to design. **Drug Discovery Today**, v.11, p. 749-754, 2006.

ZUMAN, P.; **Substituent effects in Organic Polarography**; Plenum Press: New York, v. 273, p. 46-48, 1967.