



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**Eletroquímica Medicinal de Quinonas: Integração entre
Eletroquímica, Atividades Biológicas, Interação com
DNA e Métodos Computacionais**

YEN GALDINO DE PAIVA

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**



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

**ELETROQUÍMICA MEDICINAL DE QUINONAS: INTEGRAÇÃO ENTRE
ELETROQUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, INTERAÇÃO COM DNA E
MÉTODOS COMPUTACIONAIS**

YEN GALDINO DE PAIVA

Maceió- AL

2016



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

TESE DE DOUTORADO

**ELETROQUÍMICA MEDICINAL DE QUINONAS: INTEGRAÇÃO ENTRE
ELETROQUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, INTERAÇÃO COM DNA E
MÉTODOS COMPUTACIONAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutora em Ciências.

YEN GALDINO DE PAIVA

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. MARÍLIA OLIVEIRA FONSECA GOULART

MACEIÓ– AL

2016

**Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

P142e Paiva, Yen Galdino de.
Eletroquímica medicinal de quinonas: integração entre eletroquímica, atividades biológicas, interação com DNA e métodos computacionais / Yen Galdino de Paiva. – 2016.
226 f.: il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 163- 191.
Anexos: f. 192- 242.

1. Quinonas. 2. Parâmetros eletroquímicos. 3. Estudos computacionais.
4. Câncer. 5. Doença de Chagas. 6. Mecanismo eletródico. 7. Eletroatividade.
I. Título.

CDU: 66.088:547.567



UFAL

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia

www.ufal.edu.br/unidadeacademica/ib

Av. Lourival de Melo Matta, s/n
Cidade Universitária
Maceió-AL, Brasil
57072-970
Tel. 55 82 3214-1144
e-mail: ppgqb.ufal@gmail.com



IQB/PPGQB

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Yen Galdino de Paiva, intitulada: "Eletroquímica Medicinal de Quinonas: Integração entre Eletroquímica, Atividades Biológicas, Interação com DNA e Métodos Computacionais" e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 12 de dezembro de 2016, às 9:00, na Sala de Seminários do Prédio Núcleo Multidisciplinar da Ufal.

Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Marcelo Navarro
DQF, UFPE

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
PPGQB/CECA/UFAL

Prof. Dr. Antônio Albuquerque de Souza
IFAL, Campus Maceió

Prof. Dr. Vinicius del Colle UFAL/ Campus Arapiraca

A Geo e Zé, por acreditar em mim mais do que
eu mesma

A Meg e Nika

A Jeová e Genilda

A Tino

Dedico

AGRADECIMENTOS

É sempre difícil reproduzir em palavras o tamanho do reconhecimento e gratidão por todos que ajudam em momentos importantes na vida:

Aos meus pais, Geovania e José, pela confiança, carinho, incentivo irrevogavelmente constantes, por sempre acreditarem em mim mais que eu mesma;

A minha irmã pela companhia de todas as horas;

A Genilda e Jeová, pela tão importante participação em minha vida e formação escolar/ acadêmica;

A Meg e Nikita pela constante companhia durante esses anos;

A Maria José Fátima, Lúcia, Wilmar e Tino pelo apoio e incentivo constantes;

obrigada pela presença constante na minha mente e no meu coração, e por tornar esta caminhada mais suave;

Aos demais familiares, amigos e companheiros de laboratório pelo incentivo e pelos momentos de descontração desfrutados durante esta trajetória;

A Prof^a Dr^a Marília Oliveira Fonseca Goulart pela orientação, conhecimentos compartilhados, confiança, paciência, incentivo, ajuda neste trabalho e várias parcerias realizadas;

Aos demais professores do PPGQB pelos ensinamentos compartilhados nas disciplinas;

Aos professores Dr. Eufrânio Nunes (UFMG), Dr. Vitor Ferreira (UFRJ) e Dr. Sílvio Cunha (UFBA) pelo envio das amostras;

A todos que fizeram/ fazem parte do Grupo de Eletroquímica, pela boa convivência durante esta jornada;

A Jadriane, prof^a. Dr^a Karen, Verlúcia, Ítalo, prof. Dr. Gerd, prof. Dr. Fábio, Lilian e profa. Dr^a Claudia Pessoa pelo auxílio experimental muito valoroso;

A João Batista pelo companheirismo nesses anos de convivência;

Aos colegas do LaVeg e da Botânica pelo apoio e incentivo;

Ao prof. Dr. Rivete pela paciência e incentivo, especialmente durante a escrita da tese;

A Elizangela e Dona Lurdes pela conversação, acolhida e bons momentos em sua casa;

Ao CNPq;

As agencias financiadoras FAPAL e CAPES pelo apoio financeiro ao grupo;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho:

MUITO OBRIGADA
;)

Inteligente é quem aos outros conhece;
Sapiente é quem conhece a si mesmo;
Forte é quem os outros vence;
Poderoso é quem domina a si mesmo;
Ativo é quem muito trabalha;
Rico é quem vive contente;
Firme é quem vive em seu posto;
Eterno é quem supera a morte"

Lao- Tsé

RESUMO

A ativação redox em Química Medicinal tem importância fundamental. Estudos eletroquímicos são os mais apropriados para análises nessa área e fornecem parâmetros termodinâmicos e cinéticos de compostos bioativos, em diferentes condições, que podem ser correlacionados com a atividade biológica real. As quinonas são consideradas moléculas com estrutura privilegiada devido a suas propriedades estruturais e atividades biologicamente frente a protozoários e muitas linhas de células cancerígenas.

O presente trabalho realizou a investigação de mais de 40 quinonas híbridas e seus precursores, com diferentes substituições, destacando-se as calcogenoquinonas (Classe 2), as triazólicas (classes 1, 3, 4,7), derivados azaantraquinônicos (classe 6), anilínicos e miscelâneas. Foram utilizadas técnicas eletroquímicas, fluorimétricas, espectrofotométricas, computacionais, juntamente com alguns ensaios biológicos. Em termos eletroquímicos, fez-se o estudo ciclovoltamétrico em meio aprótico (DMF/ TBAPF₆ ou DMF/ TBAP), de processos de redução e oxidação, em ausência e presença de oxigênio. Estudos de UV- vis e fluorescência molecular foram dirigidas a algumas quinonas a fim de avaliar o modo de ligação dos complexos formados com ctDNA. Análises computacionais foram efetuadas para auxiliar na definição de mecanismos eletródicos e para estudos de correlação estrutura/ atividade. Entre os ensaios biológicos, investigou-se o potencial protetor de algumas quinonas frente à peroxidação lipídica e sua atividade em relação a bactérias formadoras de biofilmes. A partir de dados biológicos em linhagens de células cancerígenas e/ou formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, foram feitas comparações com parâmetros eletroquímicos, obtidos em meio aprótico, com tendência positiva: existe uma faixa ideal para a bioativação por redução das quinonas. Se as quinonas são muito facilmente reduzidas, elas perdem atividade, por redução antecipada fora do sítio de ação; por outro lado, se elas são reduzidas em potencial muito negativo, tornam-se também menos ativas. Estes resultados e as correlações positivas encontradas são úteis no planejamento de novos conjuntos de quinonas sintéticas mais seletivas e eficientes em relação a uma série de doenças, principalmente aquelas de base bioquímica ligada ao estresse oxidativo e alquilação biológica.

Palavras-chave: Quinonas, parâmetros eletroquímicos, estudos computacionais, câncer, doença de Chagas, mecanismo eletródico, correlação estrutura- eletroatividade- atividade biológica

ABSTRACT

Redox activation in Medical Chemistry is very important. Electrochemical studies provide thermodynamic and kinetic parameters of bioactive compounds, under different conditions that may be related to their biological activity in living cells. Quinones are considered privileged scaffolds in medicinal chemistry due to their structural properties and biological activities against pathogenic protozoa and many cancer cells lines.

The present thesis focused in the investigation of more than 40 hybrid quinones and their precursors, with different substitutions organized in classes according to the quinone structure and substitution pattern. Electrochemical, fluorimetric and spectrophotometric techniques, computational studies and biological assays were performed. Electrochemical techniques have been used extensively to provide insights into the modes of action of drugs. Although quinones reduction studies reveal a complex mechanism strongly dependent on the reaction media, these compounds displayed a typical electrochemical behavior in aprotic media (DMF/TBAP or TBAPF₆). Oxygen studies showed the formed radical anions interact with oxygen and additionally, biological assays and computational studies were performed, in order to try understanding the molecular mechanism of biological action of these compounds and to make correlations structure/electroactivity/biological activity. Among biological assays, the protecting effect of some quinones against lipid peroxidation and activity on biofilm-producing bacteria were performed. From biological data in different cancer cell lines and/or trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, comparison with electrochemical parameters, obtained in aprotic medium, was held, with a positive trend: there is an ideal range for reduction activation of the quinones. If the quinones are very easily reduced, they turn less active, as well as when they are reduced too negatively (more negative potentials), their biological activity is lost. These results and the positive correlations can inspire the design of the next-generation of bioactive quinones, in terms of increased selectivity and efficiency against several diseases, mainly those biochemically connected to oxidative stress and biological alkylation.

Keywords: Quinones, electrochemical parameters, computational studies, cancer, Chagas disease, electrodic mechanism, structure- electroactivity- biological activity correlation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** (A) Estruturas de 1,4-naftoquinonas de ocorrência natural e que desempenham importante papel em sistemas biológicos. (B) Benzoquinonas de ocorrência natural, importantes no processo de defesa na ordem *Opiliones*, como exemplo *Acanthopachylus aculeatus* (Gonyleptidae). 29
- Figura 02** Representação esquemática do metabolismo de quinonas. 32
- Figura 03** (A) *Trypanosoma cruzi* e (B) barbeiro, vetor da doença de Chagas 34
- Figura 04** Estruturas do Benzonidazol (A), fármaco de primeira linha para o tratamento da doença de Chagas; Nifurtimox (B) e fexinidazol (C). 35
- Figura 05** Menadiona (A) e outras naftoquinonas estudadas por Henderson e colaboradores em que apenas o terceiro composto (esquerda para direita) mostrou-se mais ativo que os demais e identificado como “substratos subversivos” (como nomeia o autor) da TR (Tripanotona redutase) (B). 36
- Figura 06** Naftoquinonas (plumbagina, 3,3'-biplumbagina e 8,8-biplumbagina) estudadas por Fournet e colaboradores (1992), frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* (A). Estruturas das quinonas mais ativas propostas por Salmon- Chemin e colaboradores (2000) (B) e Bolognesi e colaboradores (2008) (C). 36
- Figura 07** *Orto*-naftoquinona CG9-442 estudada por Stoppani e colaboradores e naftoimidazóis derivados da β -lapachona, com seus respectivos valores de ED₅₀ (μ M), sintetizados por Pinto e colaboradores. 38
- Figura 08** Quinonas estudadas por Goulart e colaboradores (1997) com atividade frente a *T. cruzi*, formas tripomastigotas. 38
- Figura 09** (A) Nor- β -lapachona e seu derivado com valor de IC₅₀/24 h (μ M) 86.3 ± 4.6 frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀/24 h (μ M) 103.6 ± 0.6 . para benzinidazol). (B) Quinonas mais ativas sintetizadas por da Silva Júnior e colaboradores (2010). 39
- Figura 10** Isoxazolilnaftoquinonas sintéticas, sendo (E)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-ilimino)-2-hidroxi-naftaleno-1-(4H)-ona, a mais ativa (à esquerda) e 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-ilamino) naftaleno-1,2-diona, bioativa, porém tóxica (à direita). 40

Figura 11 Derivados de 2,3-di-hidrobenzo [b] furano- 4,7- diona mais ativos (A) e derivados mais ativos obtidos por da Silva Júnior e colaboradores (2008) (B).	41
Figura 12 Conjunto das diferentes quinonas utilizadas nos estudos computacionais de de Mofeta e colaboradores (2009).	42
Figura 13 Principais quinonas e derivados quinônicos bioativos obtidos pelo grupo do Prof. Eufranio Nunes Jr. a partir da nor- β -lapachona, seja por modificações no anel C (A) seja por modificações no centro redox (B).	43
Figura 14 Quinonas avaliadas por Diogo e colaboradores (2013). Embora todas tenham sido avaliadas eletroquimicamente, apenas algumas serão abordados no item resultados e discussão do presente trabalho.	44
Figura 15 Quinonas com atividade tripanocida frente a <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> , sendo o TbGAPDH e TbGK alvos potenciais do primeiro composto ($IC_{50}= 0,08 \mu M$) capaz de inibir ambas as enzimas.	45
Figura 16 Compostos derivados da 2-fenoxi-1,4-naftoquinona com atividade biológica frente a células cancerosas (linhagens HT-29 e IGROV-1) e <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> .	46
Figura 17 Estrutura da mitomicina, porfiromicina, doxorubicina e daunorubicina (quinonas com atividade antitumoral).	48
Figura 18 Ativação Biorredutiva da Mitomicina C e formação de adutos com DNA.	49
Figura 19 Estrutura de algumas quinonas que atuam via inibição das topoisomerase II.	51
Figura 20 Mecanismo molecular da toxicidade da quinona doxorubicina: os principais eventos são os danos oxidativos ao DNA, a formação de EROs e processos relacionados a alterações no metabolismo de cálcio intracelular e prostaglandinas, nomeados aqui como outros.	53
Figura 21 Os principais eventos que conduzem à malignidade modulados por TQ. Esta quinona atua em nove dos processos relacionados. Os eventos relacionados ao sistema imunológico permanecem ainda pouco esclarecido.	54
Figura 22 Derivados da nor- β -lapachona estudados por da Silva Júnior e colaboradores (2009) com atividade frente a diversas linhagens tumorais.	55
Figura 23 Derivados da nor- β -lapachona ostentando um anel 1, 2, 3 triazólico estudados por da Silva Júnior e colaboradores (2009) com atividade frente a diversas linhagens tumorais.	55
Figura 24 Derivados da nor- β -lapachona e nor- α -lapachona estudados por Cavalcanti e colaboradores (2013) com atividade frente a diversas linhagens tumorais.	56

Figura 25 Quinonas estudadas por Bhasin e colaboradores (2013) com potencial anti-câncer.	56
Figura 26 Algumas das quinonas estudadas por Bhasin e colaboradores (2013) com potencial anti-câncer possuindo mais de um centro redox em sua estrutura.	57
Figura 27 Mecanismo proposto em que a nor- β -lapachona, representante da classe das naftoquinonas, promove morte celular seletiva. Estimuladores do estresse oxidativo (EO) favorecem a morte celular através do processo apoptótico.	59
Figura 28 Fluxograma dos experimentos conduzidos neste trabalho.	64
Figura 29 (A) Sistema com três eletrodos para análises eletroquímicas; sendo eletrodo de referência (Ag AgCl, Cl ⁻), eletrodo de trabalho (ECV) e eletrodo auxiliar (fio de platina).	67
Figura 30 Conversão do composto 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em formazan pela enzima succinil desidrogenase.	70
Figura 31 Conversão do composto 7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona-10-óxido (resazurina) em resofurina pela enzima NADPH desidrogenase.	74
Figura 32 Sonda fluorescente C11- Bodipy ^{581/591} ancorada a um lipossoma.	76
Figura 33 Voltamograma cíclico (VC) e de pulso diferencial (VPD) da nor- β -lapachona (1×10^{-3} mol L ⁻¹) em meio aprótico (DMF/TBAP 0,1 mol L ⁻¹), $\nu = 0,100$ V s ⁻¹ .	85
Figura 34 Racionalização mecanística do processo de redução em duas etapas para a nor- β -lapachona (A) e para o processo de desproporcionamento, referente ao seu ânion radical semiquinona (B).	86
Figura 35 Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do log ν (DMF/ TBAP 0,1 mol L ⁻¹) para nor- β -lapachona.	86
Figura 36 Voltamogramas cíclicos dos derivados da nor- β -lapachona (1×10^{-3} mol L ⁻¹) pertencentes a classe 1 em meio aprótico (DMF/ TBAP 0,1 mol L ⁻¹), $\nu = 0,100$ V s ⁻¹	88
Figura 37 Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução dos derivados da nor- β -lapachona em função de $\nu^{1/2}$ e respectivos gráficos de potencial de pico de primeira onda de redução em função do log ν (DMF/ TBAP 0,1 mol L ⁻¹)	89
Figura 38 Voltamogramas cíclico e de pulso diferencial do composto ESNJ85 (1×10^{-3} mol L ⁻¹) em meio aprótico (DMF/ TBAP 0,1 mol L ⁻¹), $\nu = 0,100$ V s ⁻¹ . Eletrodo de	91

trabalho: carbono vítreo (Metrohm 3 mm), eletrodo de referência: Ag|AgCl|Cl⁻ e eletrodo auxiliar: fio de platina.

Figura 39 Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução dos nitroderivados da nor- β -lapachona pertencentes a classe 1 em função de $v^{1/2}$ e respectivos gráficos de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹). 92

Figura 40 Voltamogramas cíclicos dos demais compostos da classe 1 dos derivados da nor- β -lapachona (1 x 10⁻³ mol L⁻¹) em meio aprótico (DMF/ TBAP ou DMF/ TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹), $v = 0,100$ V s⁻¹ (A, B e C). Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ para composto ESNJ 245 (D) 94

Figura 41 Possíveis produtos de oxidação das calcogenoquinonas em meio aprótico advindos dos processos de desprotonação, clivagem da ligação C-S e ataque nucleofílico (Nu). 95

Figura 42 Voltamogramas cíclicos do tiofenol (1 x 10⁻³ mol L⁻¹) pertencente à classe 2 dos derivados da nor- β -lapachona em meio aprótico (DMF/ TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹), $v = 0,100$ V s⁻¹. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $v^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/ TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹). 98

Figura 43 Proposta do metabolismo de fase 1 de compostos da classe 2 de possível ocorrência em ambiente biológico e promovido pelo citocromo P450. Abaixo apenas a representação do grupo heme da enzima que apresenta 4 nitrogênios pirrólicos e o enxofre da cisteína (Cys). 99

Figura 44 Voltamograma cíclico da quinona PW49 (1 x 10⁻³ mol L⁻¹) pertencente a classe 3 em meio aprótico (DMF/ TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹), $v = 0,100$ V s⁻¹. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $v^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹) 100

Figura 45 Voltamograma cíclico da quinona 3402 (1 x 10⁻³ mol L⁻¹) pertencente a classe 4 em meio aprótico (DMF/ TBAPF 0,1 mol L⁻¹), $v = 0,100$ V s⁻¹. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $v^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹). 101

Figura 46 Voltamogramas cíclicos das nitroquinona ESNJ 110 e ESNJ 104 (1×10^{-3} mol L⁻¹) pertencente a classe 5 em meio aprótico (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹), $\nu = 0,100$ V s⁻¹. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do log ν (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹). 103

Figura 47 Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial da quinona RLB 763 (1×10^{-3} mol L⁻¹) pertencente a classe 5 em meio aprótico (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹), $\nu = 0,100$ V s⁻¹. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do log ν (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹) 104

Figura 48 Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial da quinona 3397 (1×10^{-3} mol L⁻¹) pertencente a classe 7 em meio aprótico (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹), $\nu = 0,100$ V s⁻¹. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do log ν (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹). 105

Figura 49 Voltamogramas cíclicos para algumas quinonas em DMF/TBAP ou DMF/TBAPF₆ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo (3 mm), em presença de diferentes concentrações de oxigênio; $\nu = 0,05$ V s⁻¹ (à esquerda). Curva de saturação para I_{pr}/ I_{pO} em função da concentração de oxigênio para cálculo da constante aparente de reatividade (à direita). 107

Figura 50 Correlação entre os potenciais de pico catódico (E_{pc1}) e a concentração inibitória mínima (IC_{50}) em quatro linhagens de células cancerígenas e uma linhagem não tumoral para as quinonas da classe 2. 115

Figura 51 Avaliação do efeito citotóxico dos compostos tiofenol, 3-metil tiol, 4-metil tiol, 4-cloro tiol e 4-metóxi tiol (0,01, 0,1, 1, 5 e 10 μ M) sobre células A549 utilizando ensaio colorimétrico por redução do MTT. Resultados expressos em percentual de células viáveis em comparação ao grupo exposto apenas ao meio de cultivo RPMI (controle). Veículo representa células tratadas com DMSO (0,04%) nas mesmas concentrações que as amostras. 117

Figura 52 Medida da produção de espécies reativas por NBT em células A549 tratadas com Tiofenol, 3-Metil Tiol, 4-Metil Tiol, 4-Cloro Tiol e 4-Metóxi Tiol (0,01, 0,1 e 1 μM) e mantidas sob condição de estímulo com TNF- α (30 ng/mL) ou veículo (DMSO, 0,04%) por 24 h. As barras representam a media \pm erro padrão da média (EPM) da densidade óptica (DO) em cada grupo. 118

Figura 53 Correlação entre os potenciais de pico catódico (E_{pc1}) e a concentração inibitória mínima (IC_{50}) em cinco linhagens de células cancerígenas e uma linhagem não tumoral para as quinonas da classe 8. 120

Figura 54 Estrutura da quinona plumbagina destacando, em vermelho, o grupo farmacofórico elencado por Kuete e colaboradores (2011) como responsável pela atividade biológica conferida a variados grupos de compostos estudados. 123

Figura 55 Curva de tempo de morte frente a *S. aureus* submetido ao composto tioaceto tiol. 124

Figura 56 Proteção contra a peroxidação lipídica (%). (-□-) DMSO; (-*-) Trolox (1,9 mg mL⁻¹), os demais símbolos representam as amostras estudadas a 10 μM . 125

Figura 57 Espectros no UV-vis de quinonas sob adição de concentrações crescentes de ctDNA e seus respectivos gráficos de $A_0/A-A_0$ vs. $1/[\text{DNA}]$ (insert). **A)** Espectro da ESNJ104, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 2 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **B)** Espectro da ESNJ243, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 1 a 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **C)** Espectro da ESNJ244, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 2 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **D)** Espectro da ESNJ245, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 2 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **E)** Espectro da RSL150, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 2 a 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **F)** Espectro da RSL152, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 1 a 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **G)** Espectro da RSL71, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 1 a 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. 127

Figura 58 Espectros no UV-vis do ctDNA sob adição de concentrações crescentes de quinonas e seus respectivos gráficos de $A_0/A-A_0$ vs. $1/[\text{Q}]$, insert. **A)** Espectro de ctDNA, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de PW49 de 2 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **B)** Espectro de ctDNA, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ESNJ242 de 2 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **C)** Espectro de ctDNA, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de RSL149 de 0,2 a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **D)** Espectro de ctDNA, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de RSL151 de 0,2 a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. 129

Figura 59 Titulação fluorimétrica de quinonas em complexo BE- ctDNA ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl pH 7,4, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. **A)** Perfil espectral em presença de ESNJ104 ($5 - 25 \mu\text{mol L}^{-1}$); **B)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **C)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **D)** Perfil espectral em presença de ESNJ242 ($10 - 45 \mu\text{mol L}^{-1}$); **E)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **F)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **G)** Perfil espectral em presença de RSL149 ($10 - 40 \mu\text{mol L}^{-1}$); **H)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **I)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **J)** Perfil espectral em presença de RSL150 ($5 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$); **K)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **L)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **M)** Perfil espectral em presença de RSL151 ($10 - 45 \mu\text{mol L}^{-1}$); **N)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **O)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **P)** Perfil espectral em presença de RSL152 ($5 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$); **Q)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **R)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$. 133

Figura 60 Regressão linear de $\ln K_b$ vs $1/T$, para obtenção dos parâmetros termodinâmicos. **A)** Quinona ESNJ104; **B)** Quinona ESNJ242; **C)** Quinona RSL149; **D)** Quinona RSL150; **E)** Quinona RSL151 e **F)** Quinona RSL152. 136

Figura 61 Estruturas das nitroquinonas ESNJ110 e ESNJ 104 referidas no texto como Mol01 e Mol02 otimizadas com M06-2X/6-31G. 138

Figura 62 Estrutura de Mol01 e Mol02 dividida em regiões. 141

Figura 63 Resultados da validação leave-N-out e y-randomization para os melhores modelos selecionados pelo OPS relativos a atividade biológica **(A)** sem influência do solvente e **(B)** com influência do solvente. Os pontos vermelhos representam os modelos gerados com os valores de y randomizados e o ponto azul representa os valores de R^2 e Q^2 para o modelo real. 146

Figura 64 Contribuição de cada descritor para o vetor de regressão no modelo de atividade biológica **(A)** sem e **(B)** com solvente. 148

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Quinonas estudadas neste trabalho agrupadas por classe utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico e suas respectivas subclasses identificando o conjunto de experimentos correlacionados às mesmas. As diferentes cores relacionam-se aos diferentes experimentos realizados.	26
Tabela 02 Lista de reagentes utilizados.	65
Tabela 03 Quinonas com atividade biológica <i>in vitro</i> frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> pertencentes ao estudo de QSAR (valores de atividade biológica já publicados) (DIOGO <i>et al.</i> , 2013 e CARDOSO <i>et al.</i> , 2015).	82
Tabela 04 Parâmetros eletroquímicos, a partir da técnica de voltametria cíclica dos compostos pertencentes a classe 2 em meio aprótico (DMF/ TBAPF ₆ 0,1 mol L ⁻¹), $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.	97
Tabela 05 Valores de índice de seletividade [IC ₅₀ (células não tumorais)/ IC ₅₀ (célula tumoral)] das quatro linhagens de células anticancerígenas.	113
Tabela 06 Valores de IC ₅₀ e Índice de Seletividade (IS) frente a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> . Dados extraídos de CARDOSO <i>et al.</i> , 2015.	117
Tabela 07 Valores de IC ₅₀ com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em triplicata em cinco linhagens de células cancerígenas e uma linhagem não tumoral para as quinonas da classe 8.	119
Tabela 08 Valores de índice de seletividade [IC ₅₀ (células não tumorais)/ IC ₅₀ (célula tumoral)] das linhagens de células anticancerígenas para as quinonas da classe 8.	120
Tabela 09 Valores de MIC (concentração inibitória mínima), CBM (concentração bactericida mínima) e CFM (concentração fungicida mínima) para as quinonas avaliadas.	122
Tabela 10 Valores das absorbâncias das quinonas avaliadas, ctDNA e complexo formado num determinado comprimento de onda e a uma dada concentração a 25 °C.	130
Tabela 11 Valores das constantes de interação das quinonas com ctDNA por titulação espectrofotométrica a 25°C e respectivo coeficiente de determinação.	130
Tabela 12 Valores das constantes de quenching das quinonas com o ctDNA por competição com o brometo de etídio (BE) e correspondente decréscimo na fluorescência a 25°C.	135

Tabela 13 Parâmetros de interação do ctDNA com as quinonas a 20, 25, 30, 35 e 40°C.	137
Tabela 14 Combinações de Carga e Multiplicidade usados nos cálculos de Mol01 e Mol02.	139
Tabela 15 Energias livres de formação das estruturas Mol01 e Mol02 após a segunda e terceira redução em kcal/mol.	140
Tabela 16 Diferenças de Cargas Líquidas de Região das estruturas Mol01 e Mol02 para cada etapa de redução.	141
Tabela 17 Descritores selecionados com OPS para o melhor modelo correlacionado com a atividade biológica sem solvente e com solvente.	143
Tabela 18 Parâmetros estatísticos obtidos com a regressão PLS (modelo de atividade sem solvente).	144
Tabela 19 Parâmetros estatísticos obtidos com a regressão PLS (modelo de atividade com solvente).	144
Tabela 20 Valores de pIC50 (atividade biológica) sem solvente e com solvente previstos pelos modelos QSAR e os correspondentes observados experimentalmente bem como das respectivas diferenças para o conjunto de quinonas elencadas para este estudo.	147
Tabela 21 Descritores selecionados pelo OPS para os modelos com DMF e sem o referido solvente obtidos a partir do programa E-Dragon.	149

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	Quinonas	29
2.2	Doenças tropicais negligenciadas	32
2.2.1	Doença de Chagas	33
2.2.1.1	Quinonas anti- chagásicas	35
2.3	Câncer	46
2.3.1	Quinonas com atividade anti-câncer	47
2.4	Correlação entre parâmetros eletroquímicos e doenças como câncer e doença de Chagas	58
3	OBJETIVOS	61
3.1	Objetivos gerais	61
3.2	Objetivos específicos	61
4	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1	Reagentes e Solventes	63
4.2	Estudo eletroquímico	67
4.2.1	Instrumentos, eletrodos e cela	67
4.2.2	Limpeza padrão do eletrodo de carbono vítreo (ECV)	67
4.2.3	Meio Aprótico	68
4.2.4	Estudos em Meio Aprótico em Presença de Oxigênio	69
4.3	Ensaio de viabilidade celular	70
4.4	Medida da produção de espécies reativas por NBT	72
4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i>	73
4.6	Biofilme estático e quantificação de células viáveis por fluorescência	74

4.7	Peroxidação lipídica	76
4.7.1	Preparo do tampão fosfato pH 7,4 (50 mmol L ⁻¹)	76
4.7.2	Preparo da solução diluída da sonda C11- Bodipy ^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4- fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico ácido- Molecular Probes)	77
4.7.3	Preparo dos lipossomas multilamelares com L- α -fosfatidicolina (Lecitina de soja-PC)- R1A-039	77
4.7.4	Extrusão de lipossomas multilamelares	77
4.7.5	Preparo do AAPH/ABAP (2,2'-azobis(2-metilpropionamida) di- hidrocloreto): gerador de radical peroxila	78
4.7.6	Preparo do Trolox para a curva padrão	78
4.7.7	Monitoramento da peroxidação lipídica	78
4.8	Investigação da Interação com DNA por Espectroscopia de Absorção (titulação no UV-Vis)	78
4.8.1	Preparo do tampão Tris- HCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4)	79
4.8.2	Preparo do gel de ctDNA	79
4.8.3	Titulação espectroscópica	79
4.9	Investigação da Interação ctDNA- ligante por fluorescência	80
4.10	Estudos computacionais	81
4.10.1	Cálculos estruturais eletrônicos e análise de sítios de captura de elétrons	81
4.10.2	QSAR	81
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1	Meio Aprótico	83
5.1.1	Estudo eletroquímicos em meio aprótico: Aspectos gerais	83
5.1.2	Estudos de Quinonas, em Meio Aprótico, em Presença de Oxigênio	105
5.3	Atividade Citotóxica	110
5.4	Avaliação da atividade antimicrobiana biofilme	121

5.5	Peroxidação lipídica	124
5.6	Estudos por UV- Vis: avaliação da interação DNA- quinonas	125
5.6.1	Avaliação do modo de ligação	131
5.6.2	Avaliação da interação DNA-quinona por fluorescência molecular	132
5.7	Cálculos estruturais eletrônicos e análise de sítios de captura de elétrons	138
5.8	QSAR	142
6	CONCLUSÕES	151
	REFERÊNCIAS	1153
	ANEXOS: TRABALHOS PUBLICADOS	177

1 INTRODUÇÃO

A manutenção da vida depende da ocorrência de reações redox, as quais envolvem a transferência de elétrons entre dois ou mais sistemas bioquímicos conectados. Células, tecidos, fluidos biológicos e organelas devem manter um ambiente redox apropriado para garantir a sobrevivência e a sinergia dos processos metabólicos. Tal ambiente também é resultado de um gradiente eletroquímico para manter a energia e o fluxo de elétrons necessários às estruturas celulares que trabalham para o equilíbrio dinâmico das unidades morfofuncionais (SCHAFFER *et al.*, 2001; SCHAFFER *et al.*, 2004; DE ABREU *et al.*, 2011).

A transferência de elétrons (TE) é um dos processos essenciais para a manutenção da sinergia dos eventos celulares e homeostase em ambientes redox a exemplo dos diversos receptores químicos, fotossíntese, respiração celular, mecanismos de sinalização celular, apoptose dentre outros (KOVACIC, 2008; KOVACIC *et al.*, 2010) que coordenam a maquinaria fisiológica. Embora os parâmetros eletroquímicos não forneçam uma correlação perfeita com dados biológicos, pois o ambiente celular é complexo, as técnicas eletroquímicas desempenham importante papel para caracterização da biofuncionalização de tais processos nesses sistemas naturais. Alguns fatores devem ser considerados com relação ao desempenho de funções importantes nos aspectos mecanísticos da atividade biológica de compostos *in vivo* tais como permeabilidade de membrana, difusão, solubilidade, coeficiente de partição, biodisponibilidade, metabolismo e interações enzimáticas. Em virtude das similaridades dos processos biológicos e eletroquímicos no que concerne à transferência de elétrons, pode-se considerar que os processos redox que ocorrem na interface eletrodo-solução e no ambiente fisiológico celular compartilham aspectos comuns. Portanto, tentar mimetizar as condições biológicas e suas diferentes propriedades físico-químicas torna-se premissa para a melhor compreensão dos processos redox e do mecanismo de ação de um grupo ou classe de compostos em estudo (DE ABREU *et al.*, 2011).

Estudos eletroquímicos envolvendo compostos bioativos fornecem parâmetros termodinâmicos e cinéticos que podem ser correlacionados com a atividade biológica para diversos compostos. Dessa maneira, informações termodinâmicas como Epc (potencial de pico catódico), Epa (potencial de pico anódico) dentre outros e dados de natureza cinética de reações de transferência de elétrons heterogênea e reações químicas acopladas como, por exemplo, a constante aparente de reatividade com o oxigênio molecular fornecem informações sobre a viabilidade dos processos de transferência de elétrons *in vivo* ou *in vitro* (DE ABREU *et al.*, 2011; PETRO *et al.*, 2013).

Nesse contexto da eletroquímica, as quinonas são uma classe de compostos muito estudada pela pluralidade de processos vitais em que estão envolvidas e sua distribuição nos vários táxons. Em termos de comportamento, podem atuar como compostos antioxidantes, pró-oxidantes, benéficos ou tóxicos, possuindo sob o aspecto farmacológico, variadas atividades biológicas. Tais características fazem a química das quinonas, intrigante e interdisciplinar, com repercussões em outras áreas como biologia e medicina. Essa versatilidade está relacionada a alguns aspectos como o potencial de redução sensível ao efeito dos substituintes, efeito do solvente e do meio reacional e interações com macromoléculas como DNA, proteínas, enzimas, citocinas, em vários compartimentos celulares. Assim, diante da importância da ativação redox em Química Medicinal e da pluralidade inerente a esta classe de compostos, ligada principalmente às suas propriedades redox, há grande interesse em estudá-la (PAIVA *et al.*, 2015).

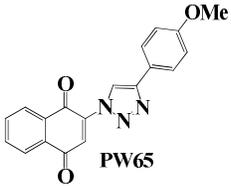
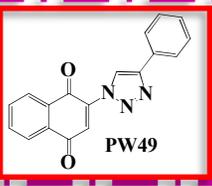
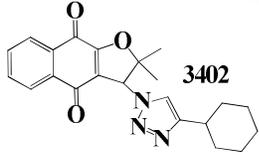
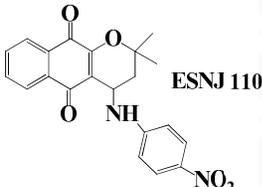
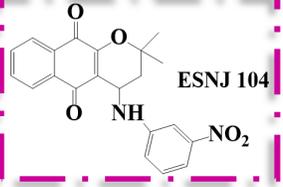
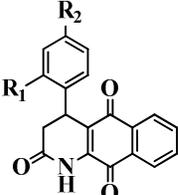
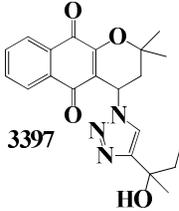
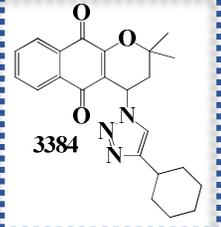
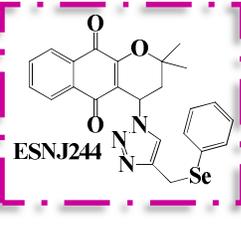
A revisão bibliográfica do presente trabalho trata das quinonas e suas características químicas e biológicas com destaque para alguns membros dessa classe, ativos em câncer e doença de Chagas, considerada uma enfermidade negligenciada, e por fim, uma breve correlação geral entre parâmetros eletroquímicos e doenças, já que alterações na homeostase celular promovidas por diversas patologias trazem consequências para a química redox das células. O presente trabalho realizou a investigação de quinonas, agrupadas em oito classes, utilizando várias técnicas: eletroquímicas, fluorimétricas, espectrofotométricas, computacionais, juntamente com alguns ensaios biológicos (**Tabela 01**).

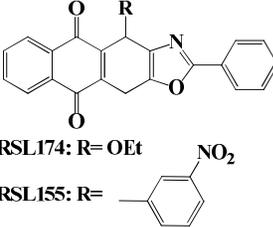
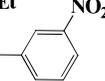
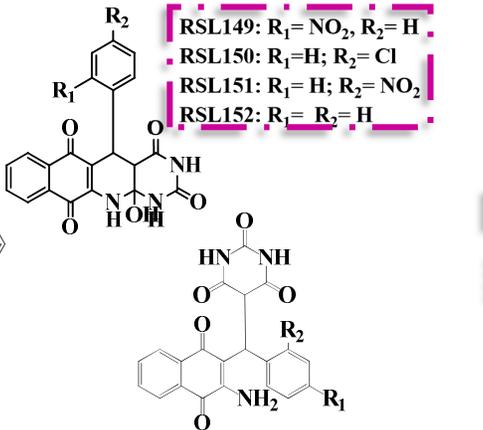
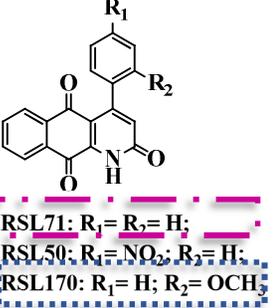
Em termos eletroquímicos, fez-se o estudo ciclovoltagemétrico em meio aprótico (DMF/TBAPF₆ ou DMF/TBAP), de processos de redução e oxidação, em ausência e presença de oxigênio. Tais estudos foram realizados em meio aprótico tendo em vista a dificuldade de solubilidade da maioria das quinonas e o uso de solventes orgânicos aproxima-se do ambiente lipofílico celular. A dificuldade em se individualizar os processos redutivos em compostos que apresentam dois grupos eletroativos passíveis de redução, como algumas nitroquinonas estudadas neste trabalho, conduziu a necessidade de auxílio de estudos computacionais a fim de propor um mecanismo para tais compostos. Os estudos em presença de oxigênio, realizados em solvente não aquoso, em virtude da estabilidade dos ânions radicais gerados no processo de redução dessa classe, como já mencionado, se aproxima do ambiente de membrana celular, alvo de peroxidação lipídica dessas espécies. Ainda considerando esse processo de peroxidação lipídica, as quinonas da classe 8 (**Tabela 01**) foram selecionadas para estudos envolvendo o modelo de lipoperoxidação e avaliação da capacidade antioxidante das mesmas.

Quinonas podem ter como alvo biológico o DNA celular, além disso, a interação ligante-DNA pode interferir na atividade de várias proteínas, enzimas e nos próprios mecanismos associados ao reparo dessa macromolécula e divisão da célula. Além das técnicas eletroquímicas, estudos de UV-vis e fluorescência molecular foram dirigidas a algumas quinonas a fim de avaliar o modo de ligação dos complexos formados com ctDNA. Ensaios biológicos frente a diversas linhagens cancerígenas (MTT)/ formas tripomastigotas de *T. cruzi* possibilitaram correlações úteis com os potenciais de redução obtidos a partir dos estudos eletroquímicos já mencionados. Como produto de outros ensaios biológicos realizados frente a bactérias gram-negativas, gram-positivas e o fungo *Candida albicans* selecionou-se a quinona mais bioativa para estudos de formação de biofilme e avaliação do perfil de ação: se bacteriostático ou bactericida. Por fim, algumas das quinonas já publicadas foram otimizadas na ausência e presença de DMF para estudos de QSAR.

Tabela 01 Quinonas estudadas neste trabalho agrupadas por classe utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico e suas respectivas subclasses identificando o conjunto de experimentos correlacionados às mesmas. As diferentes cores relacionam-se aos diferentes experimentos realizados.

QUINONAS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<p>ESNJ13: R₁= H; R₂= H; R₃= H ESNJ58: R₁= F; R₂= H; R₃= H ESNJ59: R₁= OMe; R₂= H; R₃= H ESNJ87: R₁= Me; R₂= H; R₃= H ESNJ85: R₁= NO₂; R₂= H; R₃= H</p> <p>ESNJ103</p> <p>ESNJ245</p> <p>ESNJ101</p>	<p>Classe 1 Subclasse 1.1 Subclasse 1.2</p>	X						X		X	
<p>3- metil tiol</p> <p>4- metil tiol</p> <p>4- metóxi tiol</p> <p>4- Fluor tiol</p> <p>4- cloro tiol</p> <p>Pentafluor tiol</p> <p>tiofenol</p> <p>tioacetato tiol</p> <p>benzil tiol</p> <p>ciclohexano tiol</p> <p>4- metil sulfanil tiol</p> <p>AA Boc</p>	<p>Classe 2 Subclasse 2.1 Subclasse 2.2 Subclasse 2.3 Subclasse 2.4 Subclasse 2.5</p>	X	X	X X	X	X	X			X	

 <p>PW65</p>	 <p>PW49</p>	 <p>ESNJ242</p>	<p>Classe 3 Subclasse 3.1 Subclasse 3.2</p>	X					X	X		
 <p>3402</p>	 <p>ESNJ243</p>			<p>Classe 4 Subclasse 4.1</p>	X					X		
 <p>ESNJ 110</p>	 <p>ESNJ 104</p>		<p>Classe 5 Subclasse 5.1</p>		X					X		X
 <p>RLB874: R₁=H; R₂=NO₂; RLB904: R₁=NO₂; R₂=H; RLB763: R₁=H; R₂=Cl; RLB800: R₁=R₂=H; RLB827: R₁=CH₃O; R₂=H</p>				<p>Classe 6</p>	X	X						
 <p>3397</p>	 <p>3384</p>	 <p>ESNJ244</p>	<p>Classe 7 Subclasse 7.1 Subclasse 7.2</p>		X	X				X		

 <p>RSL174: R= OEt RSL155: R= </p>	 <p>RSL149: R₁= NO₂, R₂= H RSL150: R₁=H; R₂= Cl RSL151: R₁= H; R₂= NO₂ RSL152: R₁= R₂= H RSL138: R₁= NO₂; R₂= H RSL170- INTERM.: R₁= H; R₂= OCH₃</p>	 <p>RSL71: R₁= R₂= H; RSL50: R₁= NO₂; R₂= H; RSL170: R₁= H; R₂= OCH₃</p> <p>Classe 8 Subclasse 8.1 Subclasse 8.2</p>	X	X	X				X	X		
--	---	---	---	---	---	--	--	--	---	---	--	--

1: Estudos em meio aprótico; 2: Estudos em meio aprótico em presença de oxigênio; 3: Ensaio de viabilidade celular; 4: Medida da produção de espécies reativas por NBT; 5: Avaliação da atividade antimicrobiana; 6: Biofilme estático e quantificação de células viáveis por fluorescência; 7: Investigação de Interação com DNA por Espectroscopia de Absorção (titulação no UV- Vis); 8: Peroxidação lipídica; 9: QSAR; 10: Cálculos estruturais eletrônicos e análise de sítios de captura de elétrons.

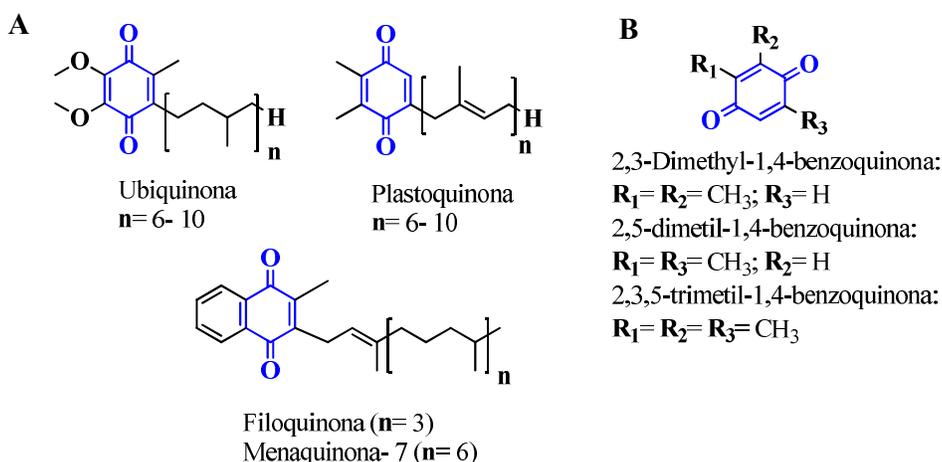
Fonte: Autora.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Quinonas

As quinonas representam uma classe de compostos de ocorrência natural, ubíqua em vários táxons e cujas propriedades físico-químicas continuam a despertar interesse farmacológico, bioquímico e químico (DA SILVA *et al.*, 2016). No reino *Plantae*, estes compostos são amplamente distribuídos em diversas famílias de angiospermas como *Polygonaceae*, *Rubiaceae*, *Leguminosae*, *Rhamnaceae* dentre outras (LU *et al.*, 2013) participando de vários processos vitais como a fotossíntese (plastoquinonas) (DA SILVA *et al.*, 2003; KISHIKAWA *et al.*, 2014), eventos de fosforilação, sinalização redox e proteção contra fitopatógenos (RAJENDRAN, 2016). Em animais estão envolvidas em diversos processos biológicos importantes como, por exemplo, a coagulação sanguínea, crescimento ósseo e metabolismo (filoquinona e a menaquinona), respiração celular (ubiquinonas) (DA SILVA *et al.*, 2003; KISHIKAWA *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2016) e mecanismos de defesa para repelir predadores como ocorre, por exemplo, em aracnídeos da ordem *Opiliones* (EISNER *et al.*, 2004) (**Figura 01**).

Figura 01 (A) Estruturas de 1,4-naftoquinonas de ocorrência natural e que desempenham importante papel em sistemas biológicos. (B) Benzoquinonas de ocorrência natural, importantes no processo de defesa na ordem *Opiliones*, como exemplo *Acanthopachylus aculeatus* (*Gonyleptidae*).



Fonte: Autora (adaptado de NELSON *et al.*, 2013; EISNER *et al.*, 2004).

As ubiquinonas (co-enzimas Q), encontradas nas células de todos os organismos aeróbios são capazes de mediar importantes reações redox no retículo endoplasmático,

mitocôndrias, complexo de Golgi, cloroplastos e na membrana plasmática de algumas bactérias (MADEO *et al.*, 2013), sendo cruciais na produção de energia, durante o metabolismo oxidativo e a fotossíntese (BARREIROS *et al.*, 2006; MADEO *et al.*, 2013).

Dependendo do sistema em particular, as quinonas podem agir como anti-oxidantes e proteger as células contra Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), ou agir como agentes citotóxicos, gerando tais espécies reativas, as quais são importantes nos processos envolvendo certas doenças como câncer, doenças degenerativas dentre outras. A geração de EROs e seus efeitos citotóxicos estão associados não apenas a doenças como ao estado redox da célula/tecido e ao ambiente eletroquímico celular (PAIVA *et al.*, 2015). Esse comportamento dual (antioxidante/ pró-oxidante) torna o anel quinonoídico uma estrutura peculiar e privilegiada em Química Medicinal (DA SILVA *et al.*, 2012).

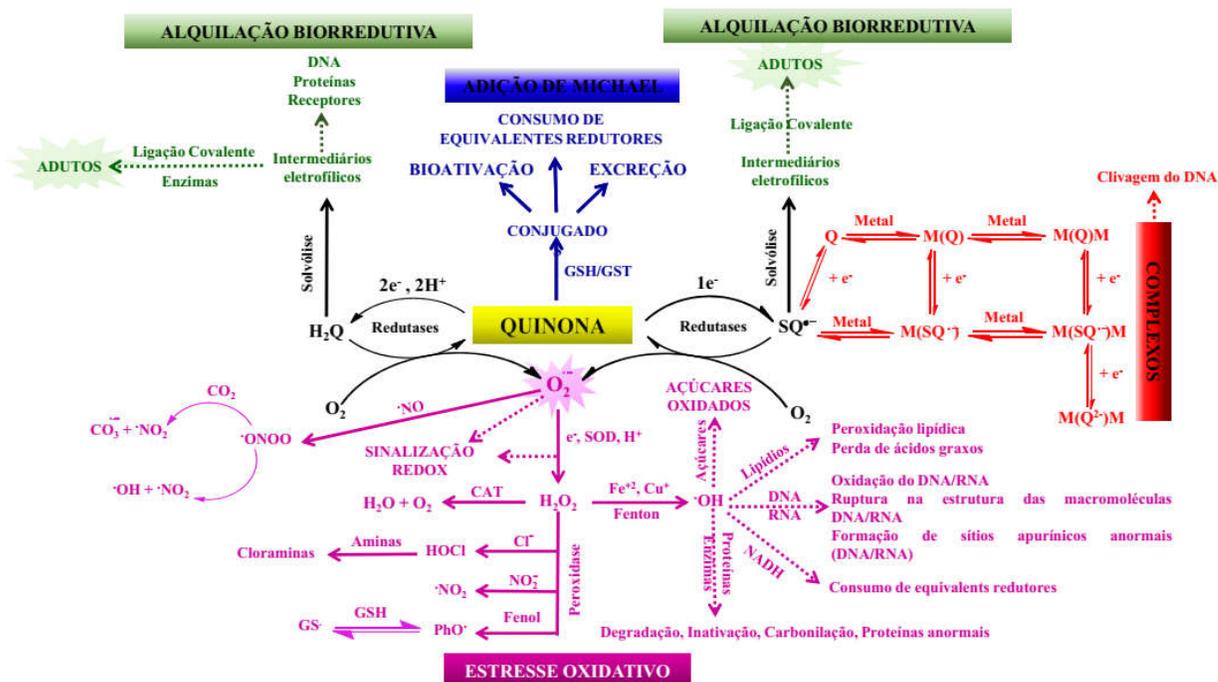
As quinonas podem ser excelentes oxidantes e agentes eletrofílicos, propriedades químicas importantes em ambientes biológicos, as quais modulam sua toxicologia e lhes “permitem participar, respectivamente, de reações do ciclo redox e reações de Michael” (SOUSA *et al.*, 2016). A maioria das semiquinonas está sob a forma de ânion radical em pH fisiológico, (uma vez que não são suficientemente básicas para serem protonadas) (DE ABREU *et al.*, 2011), a qual é um oxidante muito mais fraco do que a quinona original porém, mais danosa às células em virtude de sua habilidade para gerar peróxido de hidrogênio cataliticamente em ambiente biológico via ciclo redox (DE ABREU *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2016). A presença de substituintes aceptores de elétrons aumenta o poder oxidante dessas substâncias, enquanto que a presença de substituintes doadores, promove o efeito oposto (SOUSA *et al.*, 2016). Assim, em relação às hidroquinonas formadas nestas reações de redução, a ordem de facilidade de oxidação dependerá das características dos substituintes, especialmente se forem ligados ao centro eletroativo por conjugação (HILLARD *et al.*, 2008; DE ABREU *et al.*, 2011).

Quinonas se destacam sob o ponto de vista médico-toxicológico participando de reações redox ligando-se a sítios específicos de proteínas integrais de membrana como o citocromo b_6f (KURISU *et al.*, 2003; MADEO *et al.*, 2013) e a succinato desidrogenase (YANKOVSKAYA *et al.*, 2003; MADEO *et al.*, 2013) as quais compõem centros reacionais em bactérias. Estudar processos em tais sistemas biológicos são cruciais para a compreensão do papel da eletroquímica de quinonas proporcionado uma visão diferenciada de como as proteínas evoluíram para adequar a energia das reações de transferência de elétrons às necessidades dos diversos tipos celulares (MADEO *et al.*, 2013).

As quinonas desempenham um papel importante na medicina, relacionadas especialmente ao processo de estresse oxidativo em sistemas biológicos sendo capazes de restabelecer a transferência de elétrons em condições fisiológicas deficitárias decorrentes de certas patologias (MADEO *et al.*, 2013), o que remete a essa classe um papel protetor. Por exemplo, na síndrome de Hughes, o tratamento com a co-enzima Q tem se mostrado eficiente quanto à alteração na dinâmica mitocondrial, resultando em redução do estresse oxidativo, inibição da oxidação de LDL, redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e maior controle da aterosclerose (PEREZ-SANCHEZ *et al.*, 2012; MADEO *et al.*, 2013). Outra quinona de destaque no campo da medicina é a flavoproteína NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO1) cujos produtos das suas reações catalíticas geram antioxidantes endógenos importantes para a detoxificação do ambiente celular (ROSS *et al.*, 2000; MADEO *et al.*, 2013) podendo proteger contra a ação de outras quinonas exógenas ou, a depender da quinona de partida, tais reações podem colaborar para gerar certos intermediários, os quais reagem com oxigênio gerando EROs. Algumas drogas anti-tumorais como a mitomicina C são eficientemente bioativada pela NQO1 (MADEO *et al.*, 2013).

Quanto à redução do grupo quinona, a redução de um elétron é catalisada por redutases como a NADPH-citocromo P450 redutase mediada pela flavina dinucleotídeo (FAD), NADPH ubiquinona oxidoreductase ou citocromo b5 redutase, levando à formação de semiquinonas instáveis, as quais transferem elétrons para o oxigênio molecular restaurando a quinona de origem (FERREIRA, 2013). Esse processo gera ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual sofre dismutação, via enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ainda o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), por catálise com metais de transição (reação de Fenton), ou por reação com H_2O_2 (reação de Haber-Weiss), gera HO^{\cdot} no interior da célula. A fim de restaurar a homeostase, a célula possui o sistema enzimático antioxidante baseado em glutatona (GSH), uma vez que tais espécies reativas podem reagir com os endobióticos celulares, promovendo danos severos e posterior apoptose. A redução envolvendo dois elétrons, catalisada pela NAD(P)H: quinona oxidoreductase (DT-diaforase), produz hidroquinonas, relativamente mais estáveis, porém, susceptíveis à auto-oxidação, levando à formação de novas semiquinonas (**Figura 02**) (REICHSTEIN *et al.*, 2012; FERREIRA, 2013; DA SILVA *et al.*, 2016).

Figura 02 Representação esquemática do metabolismo de quinonas.



Cat.: catalase; SOD: Superóxido dismutase e Cito P450 redutase: Citocromo P450 redutase.

Fonte: Autora (adaptado de PAIVA *et al.*, 2015).

2.2 Doenças tropicais negligenciadas

O termo doenças tropicais negligenciadas (DTNs) faz parte de uma classificação baseada no desenvolvimento econômico, sociocultural e político dos países (MOREL, 2006) e estão associadas ao baixo poder aquisitivo das populações acometidas, às opções inadequadas de tratamento e às condições precárias de vida (MORAN *et al.*, 2009). Englobam um conjunto de doenças que se proliferam principalmente, mas não exclusivamente, em condições climáticas tropicais (CAMARGO, 2008), em virtude da biologia dos vetores (REY, 2008) sendo causada por diferentes agentes etiológicos: helmintos (ascaridíase, dracunculíase, ancilostomíase, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose, tricuriase, cisticercose/ teníase, equinococose treponematoses endêmicas); vírus (Chikungunya/ dengue e raiva); protozoários (doença de Chagas, doença do sono e leishmaniose) e bactérias (úlcer de Buruli, hanseníase, tracoma) (HOFSTRAAT *et al.*, 2016).

As pessoas afetadas por alguma DTN estão sujeitas a discriminação e estigmatização social em virtude de desfigurações ou deficiências físicas associadas (HOFSTRAAT *et al.*,

2016), promovendo redução da qualidade de vida, exclusão social, empobrecimento da saúde mental, redução de oportunidade de empregos e acesso à educação dentre outros (LITT *et al.*, 2012).

Embora um conjunto complexo e diverso de doenças necessite de diferentes estratégias de controle e erradicação (MOLYNEUX, 2013), as opções terapêuticas disponíveis ainda são limitadas, apresentam baixa eficácia e elevada toxicidade. Soma-se a esta problemática, os baixos investimentos em programas de pesquisa e desenvolvimento especialmente para o desenvolvimento de fármacos (DIAS *et al.*, 2013).

O Brasil é o sexto país que mais investe em pesquisas envolvendo DTNs e um dos produtos de tal esforço é o avanço relacionado a primeira vacina contra esquistossomose que vem sendo desenvolvida em plataforma brasileira liderada pela Fundação Oswaldo Cruz (TENDLER *et al.*, 2015) e os dados de ensaios clínicos conferiram resultados promissores para os ensaios de fase 2 (SANTINI-OLIVEIRA *et al.*, 2016).

2.2.1 Doença de Chagas

É uma antroponose endêmica causada pelo protozoário flagelado intracelular obrigatório *Trypanosoma cruzi* (*Trypanosomatidae*) (**Figura 03A**) (NEVES *et al.*, 2011), cujas estimativas apontam 2-3 milhões de pessoas infectadas no Brasil com cerca de 6000 mortes anualmente (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

O protozoário apresenta um complexo ciclo de vida cujo sucesso de instalação da parasitemia está relacionado à transmissão e colonização de ambientes extremamente diferentes (TYLER *et al.*, 2001). Diversos mamíferos podem atuar como hospedeiros vertebrados e os hospedeiros invertebrados são os triatomíneos hematófagos, pertencente à família *Reduviidae* (NEVES *et al.*, 2011).

As principais formas de infecção da doença se dá por transmissão vetorial, em que há a participação do hematófago *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como barbeiro, procotó, chupão, dentre outros (**Figura 03B**), ingestão de alimentos contaminados com as formas infectantes do parasito, transmissão congênita, transfusão sanguínea, acidentes laboratoriais e transplante em que os doadores eram portadores dessa parasitemia (RASSI JÚNIOR *et al.*, 2009).

Figura 03 (A) *Trypanosoma cruzi* e (B) barbeiro, vetor da doença de Chagas.

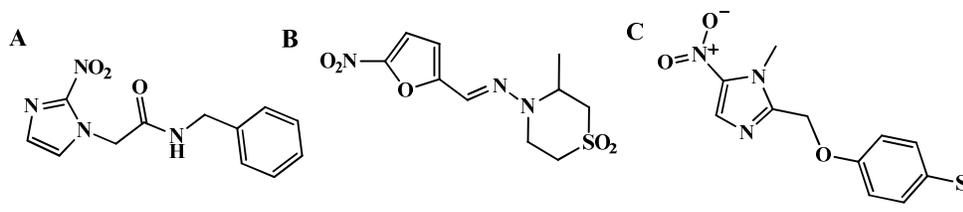


Fonte: Extraído de: (A) KENNEDY, 2004 e (B) http://www.fiocruz.br/ioc/media/Atlas_triatominiio_jurberg.pdf.

Os primeiros compostos utilizados como agentes quimioterápicos para a doença de Chagas foram atoxyl, corante fucsina, cloreto de mercúrio e tártaro emético (COURA *et al.*, 2002), que correspondem a primeira fase da quimioterapia desta doença. A segunda fase (entre 1936 a 1960) foi marcada pela utilização de diversas substâncias químicas como derivados de quinoleína, iodeto de sódio, violeta de genciana, anti-histamínicos, sulfonamidas, sais de ouro, bismuto, cobre e estanho, diversos antibióticos dentre outros compostos (DIAS *et al.*, 2009) e somente partir da década de 1970 surgiram os fármacos Nifurtimox e Benzonidazol para tratamento da doença (**Figura 04**). O primeiro é um nitrofurano desenvolvido pela Bayer em 1967 e comercializado como Lampit®, sendo produzido pela Bayer HealthCare, em El Salvador. O Benzonidazol é um nitroimidazol desenvolvido pela Roche em 1972 e comercializado com o nome de Rochagan® ou Radanil® e produzido no Brasil pela LAFEPE. Ambos os fármacos compartilham algumas características em comum: certa tolerância em crianças, maior efetividade durante a fase aguda da doença, alta toxicidade em adultos e susceptibilidade diferenciada das DTUs (nomenclatura utilizada para agrupar os diferentes subgrupos relevantes da população de *T. cruzi*) (BERMUDEZ *et al.*, 2016).

Um candidato promissor redescoberto é o fexinidazol, um nitroimidazol que vem sendo testado em estudos clínicos de fase II como monoterapia para pacientes portadores não apenas de doença de Chagas (BAHIA *et al.*, 2104; DNDi, 2016; PACAU *et al.*, 2014) mas também doença do sono e a leishmaniose visceral (DNDi, 2016).

Figura 04 Estruturas do Benzonidazol (A), fármaco de primeira linha para o tratamento da doença de Chagas; Nifurtimox (B) e fexinidazol (C).



Fonte: Autora (adaptado de BERMUDEZ *et al.*, 2016; PACAU *et al.*, 2016).

2.2.1.1 Quinonas anti-chagásicas

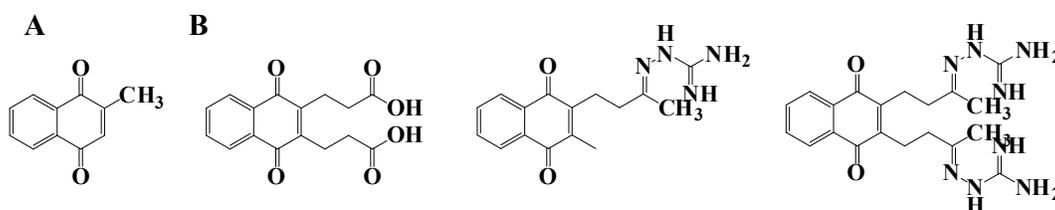
As quinonas são consideradas estruturas privilegiadas em Química Medicinal em virtude das suas propriedades estruturais e atividades biofarmacológicas de grande relevância e interesse (PINTO *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2016), sendo amplamente estudada em virtude da sua plasticidade de atividades biológicas: antibacteriana, antineoplásica, anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica, laxante, mutagênica, antimalária, antileishmania, moluscicida, antiviral e tripanocida (HILLARD *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2009; DE ABREU *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2012; FERREIRA, 2013; JARDIM *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2015).

Segundo Docampo (1984), os estudos precusores na identificação enzimática da formação de EROs em eucariotos unicelulares foi com a quinona β -lapachona em formas epimastigotas de *T. cruzi*, em que a quinona promoveu peroxidação lipídica da membrana, severas alterações celulares ultraestruturais (principalmente danos ao núcleo, mitocôndria, formação de bolhas na membrana, condensação da cromatina) e metabólicas além de lise celular quando o parasito foi exposto por tempo prolongado. Ainda segundo o autor, a menadiona também foi ativa frente ao parasito segundo estudos realizados por Lopetegui e colaboradores (1961) (**Figura 05**). Em 1988, Henderson e colaboradores testaram uma série de compostos dentre eles três naftoquinonas (**Figura 05**). Apesar de os resultados com as séries de compostos elencadas serem insuficientes para propor um esqueleto base para futuras estratégias sintéticas, os mesmos sugerem que o mecanismo de ação dos compostos é baseado na redução pela tripanotona redutase do parasito.

Fournet e colaboradores (1992) estudaram três quinonas, frente a cinco cepas de *T. cruzi*. Em todas as cepas, a plumbagina foi mais ativa ($IC_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$) que as a 3,3'-biplumbagina ($IC_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$) e 8,8-biplumbagina ($IC_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$) e De Arias e

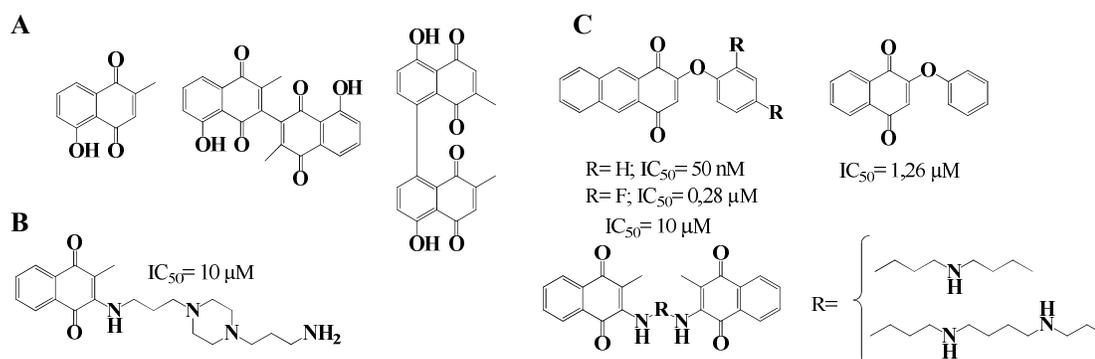
colaboradores (1994) observaram que a plumbagina promove lise nas células do parasita. Em 2000, Salmon-Chemin e colaboradores fizeram uma triagem de 1360 compostos, dentre eles quinonas, propondo uma biblioteca subdividida em séries de substâncias inibidoras da tripanotona redutase. No mesmo ano, de acordo com outra publicação do grupo foi possível propor quinonas mais ativas derivadas da menadiona e plumbagina, consideradas quinonas líderes, e que atuam como substrato para a mesma enzima. Bolognesi e colaboradores (2008) também propuseram uma biblioteca de derivados da 2-fenoxi-1,4-naftoquinona e 2-fenoxi-1,4-antraquinona (**Figura 06**).

Figura 05 Menadiona (A) e outras naftoquinonas estudadas por Henderson e colaboradores em que apenas o terceiro composto (esquerda para direita) mostrou-se mais ativo que os demais e identificado como “substratos subversivos” (como nomeia o autor) da TR (Tripanotona redutase) (B).



Fonte: Autora (adaptado de HENDERSON *et al.*, 1988).

Figura 06 Naftoquinonas (plumbagina, 3,3'-biplumbagina e 8,8-biplumbagina) estudadas por Fournet e colaboradores (1992), frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* (A). Estruturas das quinonas mais ativas propostas por Salmon- Chemin e colaboradores (2000) (B) e Bolognesi e colaboradores (2008) (C).



Fonte: Autora (adaptado de FOURNET *et al.*, 1992; SALMON- CHEMIN *et al.*, 2001 e BOLOGNESI *et al.*, 2008).

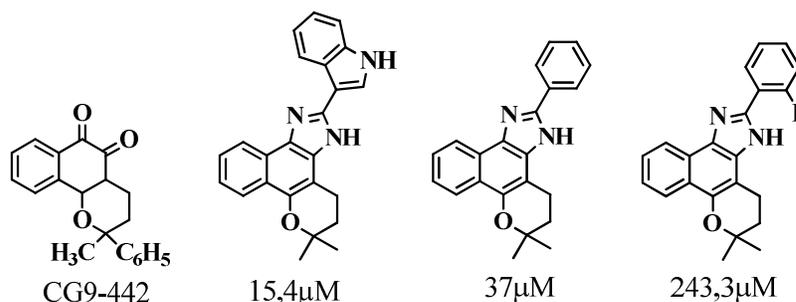
O efeito do lapachol, β -lapachona e seus derivados em *T. cruzi* foi posteriormente investigado pelos grupos dos pesquisadores Stoppani, Cruz e Docampo. A adição de β -lapachona às formas epimastigotas de *T. cruzi*, mitocôndrias e frações microssomais, com NADH ou NADPH como substratos, conduziu à liberação de ânion radical superóxido e H_2O_2 (PINTO *et al.*, 2009). Tais espécies reativas, segundo os autores, levam a formação de radical hidroxila e oxigênio singlete, espécies que desencadeiam reação em cadeia conduzindo a inativação enzimática e peroxidação lipídica severa (CRUZ *et al.*, 1978). Análise ultra-estrutural de amastigotas e tripomastigotas submetidos a ensaios com β -lapachona revelou inchaço mitocondrial, alterações do núcleo, cromatina e membrana plasmática,. Além do DNA, o RNA e, em menor grau, a síntese de proteínas (BOVERIS *et al.*, 1978; CRUZ *et al.*, 1978; PINTO *et al.*, 2009). O análogo sintético alil- β -lapachona estudado por Pinto e colaboradores (1987) manteve-se eficiente na supressão tripomastigota, e é considerado um potencial agente quimioprolifático para uso em bancos de sangue (PINTO *et al.*, 2009). Apesar de não ser possível correlacionar estrutura e atividade biológica, o estudo desses autores inferiram que 1,4-naftoquinonas são menos ativas que 1,2-naftoquinonas (PINTO *et al.*, 1987). Estudos posteriores com este derivado *in vitro* demonstraram inibição da proliferação das formas epimastigotas, aumento da taxa respiratória e produção de H_2O_2 , alterações severas no sistema de membranas da célula, peroxidação lipídica, alterações mitocondriais e na estrutura da cromatina (GONÇALVES *et al.*, 1980; PINTO *et al.*, 2009).

Em uma série de *orto*-naftoquinonas investigada por Stoppani e colaboradores, o composto CG9-442 provou ser o mais ativo na indução de danos oxidativos em tripanossomatídeos. Tais compostos inibiram as enzimas NADPH dependentes, promoveram a formação de ânion radical superóxido e estimularam a oxidação de NADPH microssomal (DUBIN *et al.*, 1990; PINTO *et al.*, 2009) (**Figura 07**).

Em virtude do acesso facilitado às espécies nativas ricas em quinonas e o conhecimento de rotas sintéticas de algumas *orto*-naftoquinonas desenvolvidas pelo grupo do Dr. Gilbert na década de 1970, tais quinonas passaram a ser mais exploradas nos estudos relacionados a *T. cruzi* (DE MOURA *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2009). Outro pesquisador que merece destaque no estudo desse grupo de compostos é o Dr. Pinto (NPPN-UFRJ). Em um dos seus estudos, o mesmo observou uma tendência de aumento da atividade tripanocida (formas tripomastigotas) quando um grupo imidazólico ou oxazólico é associado a um esqueleto naftopirânico. É possível que características estruturais relacionadas ao aumento no caráter lipofílico (presença de um grupo metoxila, uma cadeia lateral alifática ou uma porção

furano) permitam uma melhor penetração do composto através da membrana plasmática do parasita. Alguns desses compostos também foram ativos frente as formas epimastigotas e amastigotas com baixa toxicidade às células do hospedeiro (PINTO *et al.*, 2009; SALAS *et al.*, 2011) (**Figura 07**). Em tripomastigotas, os compostos causaram uma série de eventos como fragmentação do DNA, alteração no cinetoplasto e mitocôndria além de formação de bolhas na membrana e, nas formas epimastigotas, houve danos a organelas (mitocôndria, complexo de Golgi e reservossomos), inibição da enzima succinato citocromo c redutase e bloqueio do ciclo celular. É importante notar que vários agentes tripanocidas, tais como benzonidazol, contêm porções imidazólicas em sua estrutura, consistente com a idéia de que a atividade tripanocida é associada com o esqueleto imidazólico (MENNA-BARRETO *et al.*, 2005; DE MOURA *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2009; SALAS *et al.*, 2011).

Figura 07 *Orto*-naftoquinona CG9-442 estudada por Stoppani e colaboradores e naftoimidazóis derivados da β -lapachona, com seus respectivos valores de ED₅₀ (μ M), sintetizados por Pinto e colaboradores.

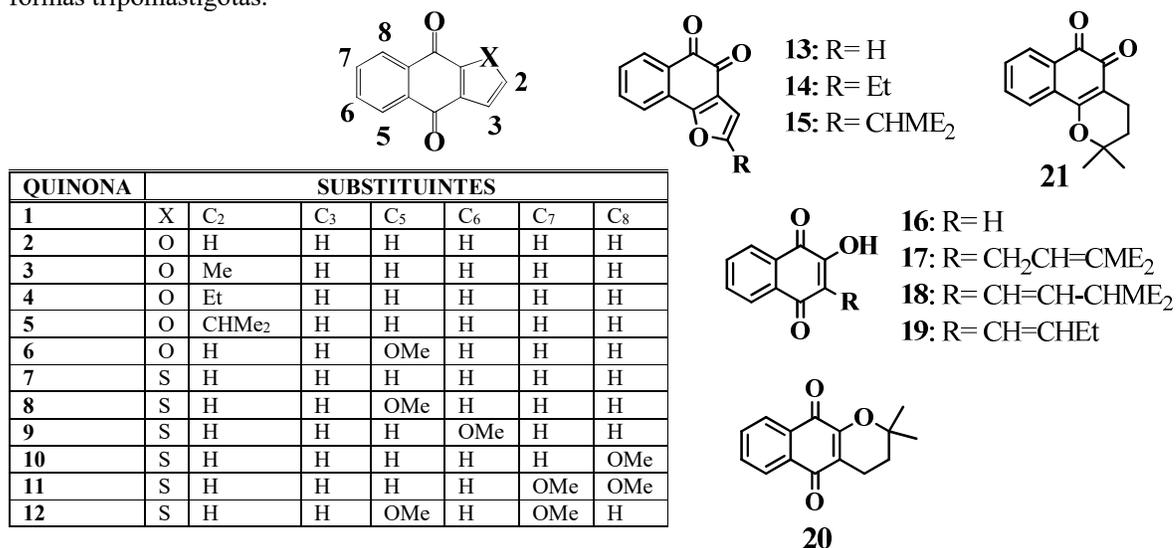


Fonte: Autora (adaptado de DUBIN *et al.*, 1990; DE MOUTA *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2009; SALAS *et al.*, 2011).

O grupo de Goulart destaca-se a vários anos pelos estudos eletroquímicos e suas correlações com atividade biológica de quinonas dentre outros compostos (DA SILVA *et al.*, 2003). Em 1997, Goulart e colaboradores correlacionaram a atividade frente a *T. cruzi* e o potencial de redução de 21 naftoquinonas (**Figura 08**), utilizando DMF/TBAP, sistema de três eletrodos sendo o de mercúrio (eletrodo de trabalho), eletrodo de referência Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1 M) e eletrodo auxiliar de platina, destacando-se a maior atividade das *orto*-quinonas em relação aos isômeros *para*. Todas as quinonas com valores de potencial de primeira onda de redução acima de -0,72 V vs. (compostos 12-19 e 21 **Figura 08**) foram ativas no presente estudo. Porém três quinonas (**4, 5 e 21, figura 08**) apesar da maior dificuldade de redução (Epc1 < -0,72 V)

apresentaram significante atividade tripanocida. Essas exceções podem estar relacionadas a outros fatores que devem ser considerados na atividade biológica, como difusão, solubilidade, metabolismo e permeabilidade de membrana (GOULART *et al.*, 1997). O grupo continua seus estudos enfatizando os métodos eletroquímicos no planejamento, pesquisa e compreensão dos mecanismos de ação biofarmacológica especialmente relacionadas às quinonas e derivados análogos (DE ABREU *et al.*, 2002; HILLARD *et al.*, 2008; DE ABREU *et al.*, 2011).

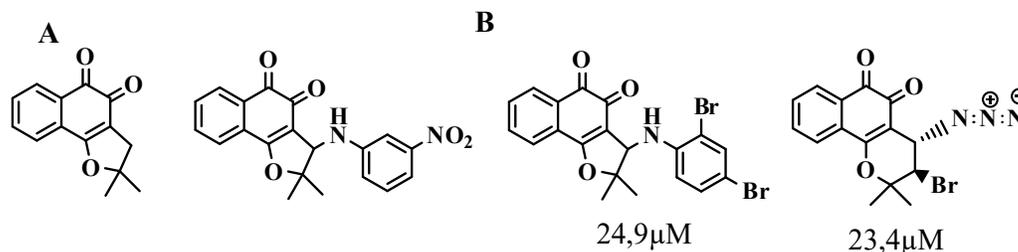
Figura 08 Quinonas estudadas por Goulart e colaboradores (1997) com atividade frente a *T. cruzi*, formas tripomastigotas.



Fonte: Autora (adaptado de GOULART *et al.*, 1997).

Em 2010, em parceria com os grupos de síntese de Dr. Antônio Pinto e Dr. Vitor Ferreira e de eletroquímica de Dr. Juan Squella, Goulart e colaboradores publicaram comportamento eletroquímico da nor-β-lapachona e um derivado (com atividade superior- frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*- e m relação ao fármaco de referência) utilizando eletrodo gotejante de mercúrio (**Figura 09A**). Ainda no mesmo ano, séries de quinonas promissoras sintetizadas (antraquinonas imidazólicas, derivados da nor-β-lapachona e derivados 1,2,3-triazólicos da β-lapachona) e testadas frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo os compostos abaixo importantes protótipos no desenvolvimento de novas drogas candidatas com eficácia contra este parasito (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010).

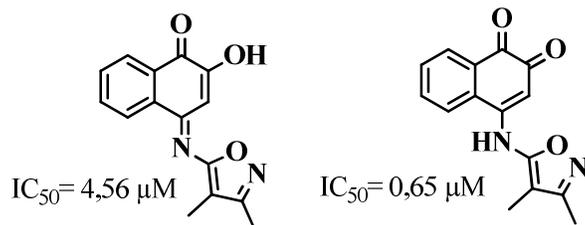
Figura 09 (A) Nor- β -lapachona e seu derivado com valor de $IC_{50}/24\text{ h}$ (μM) 86.3 ± 4.6 frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi* ($IC_{50}/24\text{ h}$ (μM) 103.6 ± 0.6 . para benzinidazol). **(B)** Quinonas mais ativas sintetizadas por da Silva Júnior e colaboradores (2010).



Fonte: Autora (adaptado DE SOUZA *et al.*, 2010 e DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010).

Uma série de isoxazolilnaftoquinonas sintéticas foi ativa em ensaios *in vitro* e *in vivo*. O composto mais ativo reduziu a parasitemia em camundongos, e em epimastigotas, inibiu a replicação de DNA e promoveu danos a membrana e mitocôndria do parasita, indicando o envolvimento de EROs em sua atividade. Mais recentemente, o efeito *in vitro* do tripanocida 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-ilamino) naftaleno-1,2-diona (**Figura 10**) foi relatado, mas o composto também foi tóxico para as células de murino L-6 (SPERANDEO *et al.*, 2003; SPERANDEO *et al.*, 2004).

Figura 10 Isoxazolilnaftoquinonas sintéticas, sendo (E)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-ilimino)-2-hidroxi-naftaleno-1-(4H)-ona, a mais ativa (à esquerda) e 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-ilamino) naftaleno-1,2-diona, bioativa, porém tóxica (à direita).

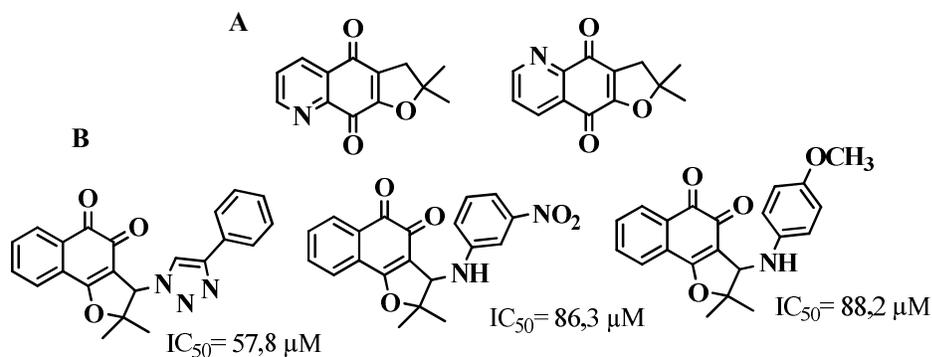


Fonte: Autora (adaptado de TARLOVSKY *et al.*, 1990; SPERANDEO *et al.*, 2003; SPERANDEO *et al.*, 2004).

Uma série de derivados de 2,3-di-hidrobenzo [b] furano-4,7-diona foi preparada e testada frente a formas epimastigotes. Duas furoquinolinadionas foram eficientes inibidores da proliferação do parasita, indicando que a presença de uma piridina em vez de um anel benzeno aumenta a atividade tripanocida (**Figura 11A**). A análise das propriedades estereoeletrônicas usando o método DFT mostrou que tal atividade está relacionada à densidade eletrônica em

torno desse sistema (GOULART *et al.*, 2003). Da Silva Júnior e colaboradores prepararam vários derivados a partir do nor-lapachol. A quinona mais ativa apresentou um grupo fenila ligado ao anel triazólico, o qual, devido ao seu carácter lipofílico mais elevado quando comparado com outros triazóis, permite uma melhor penetração através da membrana plasmática do parasita. Da reação do nor-lapachol com arilaminas, 10 *orto*-naftofuranoquinonas substituídas e uma para-naftofuranoquinona não substituída foram sintetizadas e testadas. Deste grupo, dois compostos se mostraram promissores com atividade tripanocida mais elevada do que o benzonidazol, o medicamento padrão. Tais moléculas híbridas, obtidas a partir de quinonas e triazóis foi um dos pontos de partida para outros trabalhos de da Silva Júnior e colaboradores (**Figura 11B**) (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2008a/b). As três novas quinonas (**Figura 11B**) se mostraram ativas frente as formas tripomastigota, amastigotas e epimastigotas intracelulares, e apresentaram baixa toxicidade para células de mamíferos. A análise ultra-estrutural de epimastigotas e tripomastigotas tratados com tais compostos indicaram um potente efeito sobre a mitocôndria, as quais sofreram significativo inchado e exibiram problemas na matriz. Estes compostos também diminuíram especificamente as atividades dos complexos mitocondriais I e III em epimastigotas e tripomastigotas, promoveram a formação de peróxido de hidrogênio e a redução no consumo de oxigênio. Estes resultados indicam que a ação tripanocida das furanonaftoquinonas está associada ao aumento da produção de EROs, à disfunção mitocondrial e morte do parasita (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009).

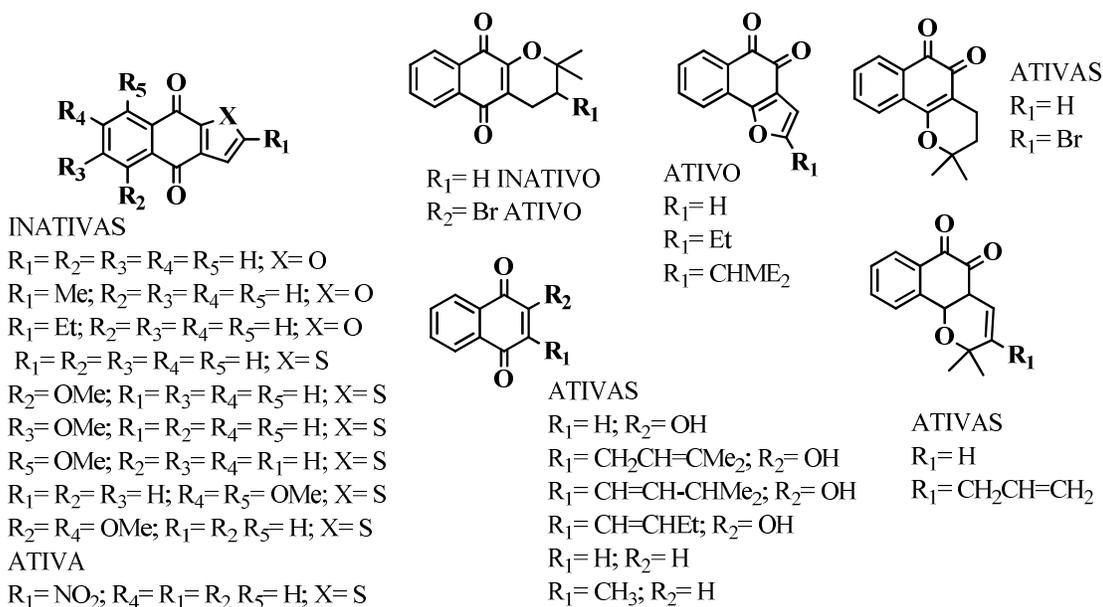
Figura 11 Derivados de 2,3-di-hidrobenzo [b] furano- 4,7- diona mais ativos (A) e derivados mais ativos obtidos por da Silva Júnior e colaboradores (2008) (B).



Fonte: Autora (adaptado de DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2008).

Em 2009, a partir de um estudo de docking e dinâmica molecular proposto por De Molfetta e colaboradores sobre 25 quinonas testadas frente ao parasito, permitiu sugerir que as propriedades eletrônicas e estruturais são fatores importantes na interação entre as quinonas que apresentam atividade tripanocida e o receptor biológico, onde as propriedades eletrônicas estão relacionadas à intensidade de associação molecular por interações eletrostáticas e as propriedades estruturais estão relacionadas ao posicionamento da molécula durante a interação com o receptor biológico. Além disso, todas as quinonas estudadas se localizaram numa região hidrofóbica chamada de sítio Z da tripanotona redutase (**Figura 12**).

Figura 12 Conjunto das diferentes quinonas utilizadas nos estudos computacionais de de Mofeta e colaboradores (2009).

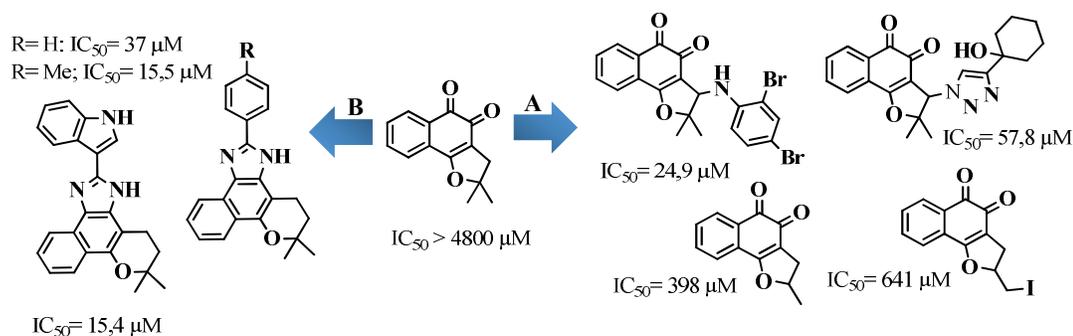


Fonte: Autora (adaptado de DE MOFETA *et al.*, 2009).

O lapachol é uma importante naftoquinona natural com atividade reconhecida frente a *T. cruzi* e o grupo de pesquisa dos Prof.s Antônio Ventura Pinto, Vítor Ferreira e mais recentemente, Eufrânio Nunes Júnior concentrou esforços na síntese e avaliação da atividade tripanocida de lapachonas substituídas com anel 1,2,3- triazólico na estrutura. Na literatura, o espectro de atividades dos triazóis e seus derivados elevou tais compostos à categoria de estruturas privilegiadas em termos farmacológicos. As estratégias sintéticas envolvem os anéis A e C e modificações no centro redox de lapachonas. Por exemplo, naftoimidazóis foram preparados através de estratégias que visam modificações no centro redox da nor-β-lapachona.

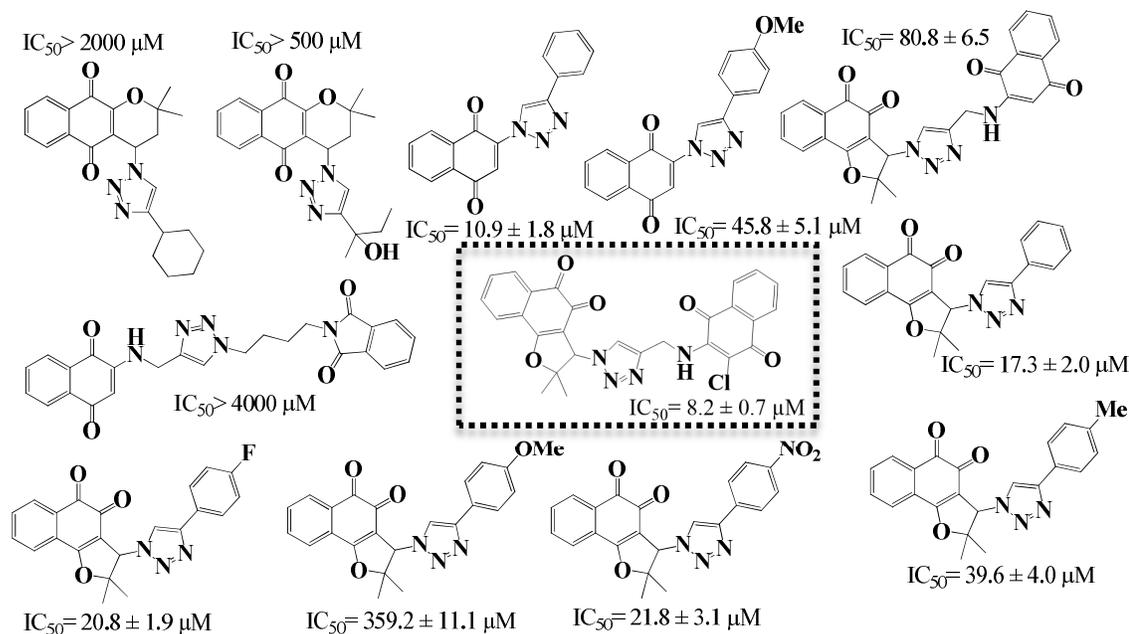
Entre os derivados testados, dois compostos foram ativos contra formas tripomastigotas. 3- arilamino nor- β -lapachonas representam um importante exemplo de lapachonas com estratégia de modificação no anel C. Os compostos foram eficazes contra forma tripomastigota, com a nor- β -lapachona arilamina dibromo-substituída, sendo cerca de quatro vezes mais ativa que benzonidazol (BZN), a droga padrão. Nor- β -lapachona com o anel triazólico (duas vezes mais ativa do que BNZ) também foi eficaz contra as formas em proliferação do parasito (**Figura 13**). Algumas das quinonas avaliadas no processo de doutorado com atividade tripanocida em colaboração com o Prof. Eufrânio contribuíram para mais uma publicação com o grupo em 2013 (DIOGO *et al.*, 2013). Desse conjunto, 12 foram avaliadas eletroquimicamente (**Figura 14**) com destaque para a quinona mista ($IC_{50} = 8,2 \pm 0,7 \mu M$), estudada no presente trabalho, por ser cerca de 15 vezes mais ativa que o benzonidazol, podendo sua atividade estar relacionada aos dois centros quinonoídicos (*orto* e *para*) capazes de gerar uma concentração maior de espécies reativas de oxigênio.

Figura 13 Principais quinonas e derivados quinônicos bioativos obtidos pelo grupo do Prof. Eufrânio Nunes Jr. a partir da nor- β -lapachona, seja por modificações no anel C (**A**) seja por modificações no centro redox (**B**).



Fonte: Autora (adaptado de DA SILVA JUNIOR *et al.*, 2009).

Figura 14 Quinonas avaliadas por Diogo e colaboradores (2013). Embora todas tenham sido avaliadas eletroquimicamente, apenas algumas serão abordados no item resultados e discussão do presente trabalho.

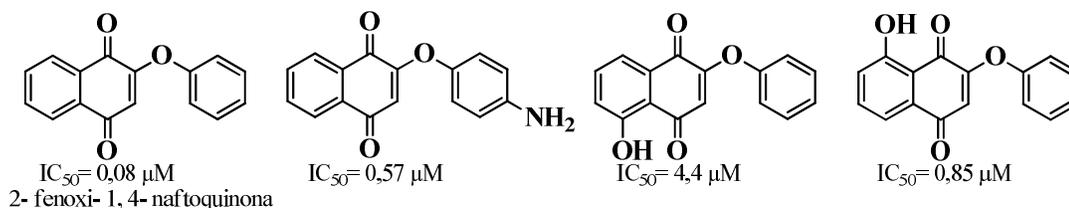


Fonte: Autora (adaptado de DIOGO *et al.*, 2013).

Apesar de *T. cruzi* exibir um conjunto de alvos moleculares importantes, muitos dos artigos envolvendo quinonas focam na tripanotona redutase ou analisam a atividade das quinonas sintetizadas ou extraídas de plantas sem investigar um alvo em particular. Porém alguns trabalhos mais recentes, em virtude das propriedades biológicas das naftoquinonas, agregam a informação de que é possível que esta classe de compostos com perfil tripanocida atue segundo um mecanismo de múltiplos alvos, não sendo surpreendente uma vez que as quinonas conferem às plantas e a vários animais, defesas químicas com mecanismos de ação multifuncionais (WAR *et al.*, 2012). Além da dificuldade de digestibilidade, evitando a herbivoria, o mecanismo de ação das quinonas em plantas está relacionada também a citotoxicidade frente aos agentes agressores. Pieretti e colaboradores (2013) sintetizaram um grupo de naftoquinonas, promissores frente a múltiplos alvos (**Figura 15**). Esse grupo identificou dois alvos importantes: glicerol quinase (TbGK), enzima envolvida na primeira etapa (conversão do glicerol em glicerol-3-fosfato) na via do metabolismo do glicerol e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TbGAPDH), enzima chave envolvida no processo de

glicólise em *T. brucei*, alvo para drogas com atividade tripanocida (GUALDRON- LOPEZ *et al.*, 2013).

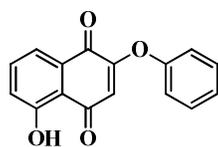
Figura 15 Quinonas com atividade tripanocida frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense*, sendo o TbGAPDH e TbGK alvos potenciais do primeiro composto (IC_{50} = 0,08 μ M) capaz de inibir ambas as enzimas.



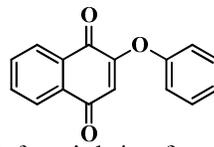
Fonte: Autora (adaptado de PIERETTI *et al.*, 2013).

A estratégia de desenvolvimento de fármacos multialvos se torna uma alternativa interessante e promissora especialmente frente às terapias de administração de múltiplos fármacos (CAVALLI *et al.*, 2009a/b; NJOGU *et al.*, 2013; PRATI *et al.*, 2014). Os benefícios desses fármacos têm sido progressivamente reconhecidos e apreciados, principalmente no que se refere ao tratamento de doenças negligenciadas e essa estratégia tem sido apontada como alternativa aos poucos investimentos farmacêuticos delegados a tais doenças. Utilizando-se dessa estratégia e relacionando algumas similaridades entre parasitismo e câncer, Prati e colaboradores (2015) sintetizaram um conjunto de compostos derivados da 2-fenoxi-1,4-naftoquinona, as quais foram testadas frente a células cancerosas HT-29 e IGROV-1 e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, sendo que algumas dessas quinonas apresentaram um mecanismo de ação dupla, inibindo tanto o metabolismo da glicólise, pela inibição da enzima TbGAPDH quanto a respiração mitocondrial, pela inibição do complexo I (**Figura 16**). A estratégia de fármacos de múltiplo alvos, em contraposição à perspectiva mendeliana (um fármaco- um alvo- uma doença), é relativamente recente e novos avanços na biologia de sistemas (representando novas perspectivas para o entendimento de mecanismos e vias do metabolismo ainda não muito bem compreendidas) é crucial para o desenvolvimento racional desses fármacos (PROKOP *et al.*, 2012).

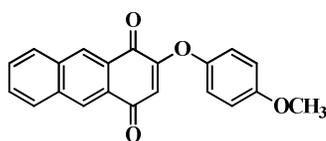
Figura 16 Compostos derivados da 2-fenoxi-1,4-naftoquinona com atividade biológica frente a células cancerosas (linhagens HT-29 e IGROV-1) e *Trypanosoma brucei rhodesiense*.



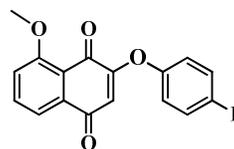
IC₅₀ = 4,43 μM (*T. brucei*)
 IC₅₀ = 2,52 ± 0,7 μM (IGROV-1)
 IC₅₀ = 2,42 ± 1,3 μM (HT-29)
 IC₅₀ = 0,26 μM (L6)



2- fenoxi- 1, 4- naftoquinona
 IC₅₀ = 0,08 μM (*T. brucei*)
 IC₅₀ = 3,43 ± 0,7 μM (IGROV-1)
 IC₅₀ = 4,4 ± 1,7 μM (HT-29)
 IC₅₀ = 5,91 μM (L6)



IC₅₀ = 0,38 μM (*T. brucei*)
 IC₅₀ = 2,31 ± 0,7 μM (IGROV-1)
 IC₅₀ = 3,83 ± 2,5 μM (HT-29)
 IC₅₀ = 0,24 μM (L6)



IC₅₀ = 4,76 μM (*T. brucei*)
 IC₅₀ = 1,73 ± 0,7 μM (IGROV-1)
 IC₅₀ = 2,70 ± 1,2 μM (HT-29)
 IC₅₀ = 0,77 μM (L6)

Fonte: Autora (adaptado de PRATI *et al.*, 2015).

2.3 Câncer

É um conjunto de doenças que apresentam em comum o crescimento celular descontrolado em virtude do desvio dos mecanismos de controle que coordenam a proliferação, a diferenciação e morte das células (INCA, 2016). As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, porém, todos os tipos de câncer são proliferações clonais que surgem devido a mutações as quais conferem vantagens seletivas de crescimento e de colonização de outros tecidos em relação às células sadias em mitose (LUN *et al.*, 2015), sendo muitas vezes definida como um potencial de crescimento celular não controlado.

Segundo Brasileiro Filho e colaboradores (2012), uma proliferação celular autônoma anormal e descontrolada em que as células possuem alta capacidade de reprodução ou perda da capacidade de diferenciação, define neoplasia, podendo ser classificada como benigna ou maligna. Esta apresenta células com alta invasividade dos tecidos adjacentes promovendo perturbações homeostáticas, já a forma benigna apresenta células agregadas que crescem de maneira localizada (ALBERTS *et al.*, 2009; INCA, 2016).

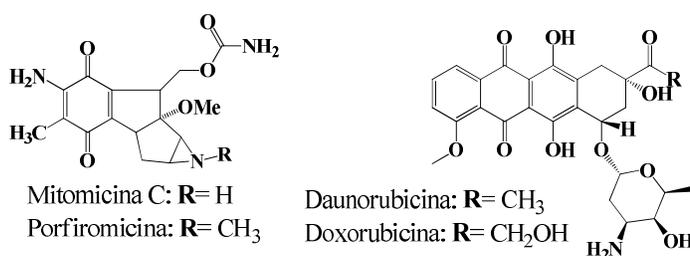
O câncer é um processo microevolutivo necessitando de uma única célula maligna como princípio para seu desenvolvimento sendo esta capaz de reprogramar seu metabolismo e de se comunicar com a microbiota local a fim de escapar da resposta imune do organismo, criando um habitat propício ao seu estabelecimento e multiplicação (HICKEY *et al.*, 2007; SPANOA *et al.*, 2012).

Um organismo multicelular funciona como um ecossistema em que as unidades morfofuncionais se coordenam em regime de cooperação para manutenção da homeostasia do mesmo (ALBERTS *et al.*, 2009). Células normais são reguladas por sinais a fim de manter a dinâmica de crescimento e multiplicação adequada de suas populações. Quando alterações desequilibram a homeostasia, tal população de células e sua descendência tornam-se autoindependentes, reproduzem-se sem limites e colonizam outros tecidos originando um processo neoplásico (ALBERTS *et al.*, 2009; RODRIGUEZ- BRENES *et al.*, 2013).

2.3.1 Quinonas com atividade anti-câncer

Dentre as quinonas com atividade farmacológica reconhecida frente a células cancerígenas, pode-se citar a mitomicina C e as antraciclinas. Estas são antibióticos provenientes de culturas de *Streptomyces*, sendo a daunorubicina e a adriamicina, isoladas respectivamente de *S. peuceaticuse* e *S. coeruleorubidus*, os representantes mais conhecidos. A daunorubicina é um agente antitumoral de primeira linha, utilizado no tratamento de leucemia mielóide, dentre outros tipos de câncer, mas a cardiotoxicidade caracterizada pela morte dos cardiomicetos e injúrias irreversíveis limitam seu uso (SILVA *et al.*, 2003; GROARKE *et al.*, 2015). Estudos sobre seu modo de atuação indicam que daunorubicina e a doxorubicina promovem inibição da síntese de DNA pela formação de um complexo com as bases purínicas e pirimidínicas além de induzirem apoptose via EROs em função da porção quinônica em sua estrutura (SILVA *et al.*, 2003; MINOTTI *et al.*, 2004) (**Figura 17**).

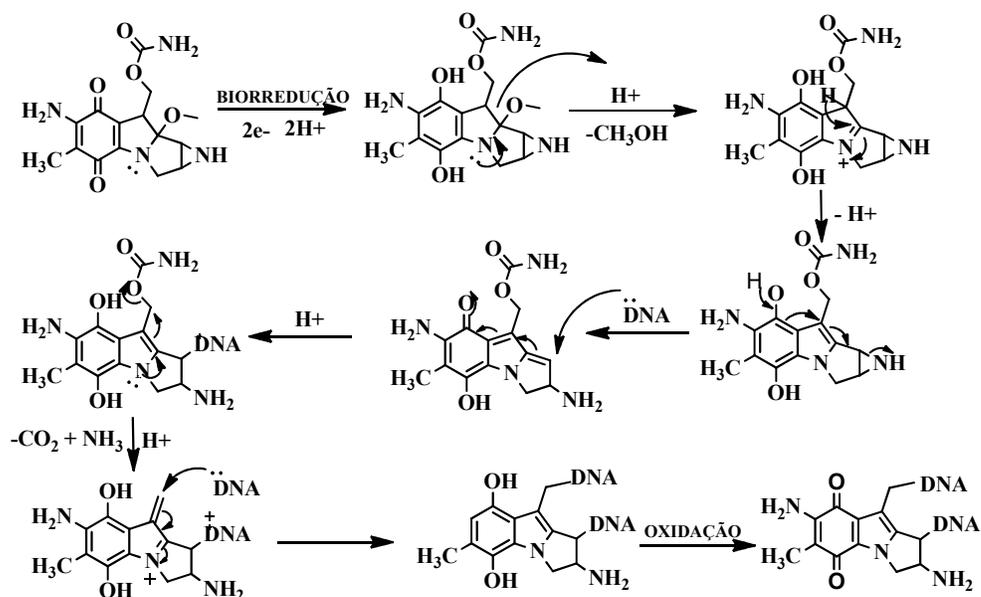
Figura 17 Estrutura da mitomicina, porfiromicina, doxorubicina e daunorubicina (quinonas com atividade antitumoral).



Fonte: Autora (adaptado de SILVA *et al.*, 2003; GROARKE *et al.*, 2015).

Na literatura, é possível encontrar a ativação redutiva da mitomicina C ressaltando a formação de intermediários reativos que interagem com o DNA formando adutos (OLIVEIRA *et al.*, 2002; TOTEVA *et al.*, 2011). A mitomicina C é o protótipo do fármaco biorredutor pois sua estrutura é inerte a nucleófilos e um bis-eletrófilo muito reativo após processo de ativação em ambiente biológico (PAZ *et al.*, 2012). Seu mecanismo de ação biofarmacológica se caracteriza pela formação de um ânion radical quinônico após redução monoelétrica ou a hidroquinona correspondente após redução via dois elétrons (OLIVEIRA *et al.*, 2002). No mecanismo de biorredução da mitomicina C (**Figura 18**), vale destacar o nitrogênio heterocíclico com caráter de nitrogênio de amida em função da conjugação do par de elétrons não-ligante (nitrogênio com a carbonila quinonoídica), o qual, após redução em sistemas biológicos, passa a ter caráter de amina, com maior nucleofilicidade, facilitando, a saída do grupamento metoxila com consequente abertura do anel arizidínico, formação de ligação dupla conjugada à carbonila e saída da porção carbamato (OLIVEIRA *et al.*, 2002) (**Figura 18**). A biorredução origina um intermediário reativo com dois centros eletrofílicos sendo capaz de alquilar endobióticos como DNA, formando monoadutos e produtos de cross-link, glutationa e RNA ribossômico (PAZ *et al.*, 2012).

Figura 18 Ativação Biorredutiva da Mitomicina C e formação de adutos com DNA.



Fonte: Autora (adaptado de RAJSKI *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2002)

A nor- β -lapachona é um agente anticâncer que induz seletivamente a morte celular em várias linhagens de câncer humano, juntamente com outras quinonas como a β -lapachona (SILVA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2016). O grupo de enzimas responsáveis pelo metabolismo redutivo de quinonas bioativas frente a células cancerígenas são flavoenzimas as quais podem ser alvos-chave para a citotoxicidade desses compostos ou promover a bioatividade antitumoral (SALMON- CHEMIN *et al.*, 2001; CAVALCANTI, 2010). Além disso, algumas quinonas atuam biofarmacologicamente de modo semelhante às mitomicinas e antraciclina pois, as carbonilas quinonoídicas, quando reduzidas, promovem a saída de grupos abandonadores na estrutura da molécula, gerando intermediários alquilantes (SILVA *et al.*, 2003; CAVALCANTI, 2010).

A redução via flavoenzimas como a DT diaforase (NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1) da mitomicina C é essencial para o desenvolvimento da atividade antineoplásica (ASCHE, 2005; CAVALCANTI, 2010). Esta enzima catalisa uma reação usando NADH ou NADPH como doadores de elétrons, reduzindo as quinonas a semiquinona ou hidroquinonas. O primeiro pode sofrer oxidação pelo oxigênio molecular restaurando a quinona original sob condições aeróbicas, gerando ânion radical superóxido durante a ciclagem redox. As hidroquinonas são

mais estáveis podendo ser excretadas do sistema biológico após reação de conjugação com sulfato ou ácido glucurônico (ASCHE, 2005).

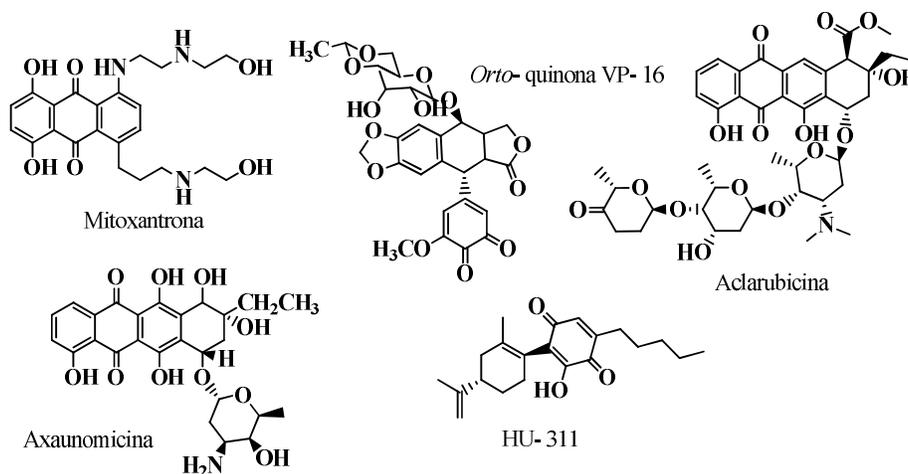
A redução da nor- β -lapachona pela DT diaforase aumenta sua ação citotóxica, auxiliando na apoptose e inibição do crescimento tumoral. Sua atividade redutora está associada à sua superexpressão em certos tipos tumorais quando comparado aos tecidos normais (NEMEIKAITÉ-CENIENE *et al.*, 2003; PHILLIPS *et al.*, 2004; CAVALCANTI, 2010) sendo fundamental para a citotoxicidade de algumas quinonas frente a várias linhagens celulares tumorais que apresentam altos níveis de expressão da mesma (BEY *et al.*, 2007; CAVALCANTI, 2010). Muitas quinonas também induzem citotoxicidade em certas linhagens tumorais como exemplo HL-60 (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010; CAVALCANTI, 2010), deficiente na expressão dessa enzima (BELLO *et al.*, 2005; CAVALCANTI, 2010) porém, detentora de altos níveis de algumas enzimas da família CYP450 (KAWAI *et al.*, 2003; CAVALCANTI, 2010) e enzimas selênio-dependentes como tiorredoxina redutase (CENAS *et al.*, 2004), sugerindo que é possível a metabolização e bioativação de compostos quinonoídicos por outras enzimas (SAVAGE *et al.*, 2008; CAVALCANTI, 2010).

Outro mecanismo ao qual é possível atribuir atividade biológica das quinonas com destaque para a β -lapachona e lapachol, se dá via inibição das topoisomerases I e II, cruciais para a replicação do DNA (SILVA *et al.*, 2003). As topoisomerases são enzimas nucleares envolvidas na regulação da topologia do DNA atuando na mitose e replicação celular. Seu processo de inibição se dá pela interação simultânea com duas macromoléculas formando um complexo ternário (DNA-topoisomerase-ligante). Como estão presentes em maior quantidade em células de rápida proliferação, constitui um alvo farmacológico estratégico dos agentes antineoplásicos (FORTUNE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012; GIBSON *et al.*, 2016).

A α -topoisomerase II é encontrada praticamente nos tecidos de proliferação rápida, um indicativo de que a mesma está relacionada a eventos associados a mitose e crescimento celular (GIBSON *et al.*, 2016). Fármacos que atuam como alvos para essa enzima interferem em, pelo menos, uma etapa do ciclo catalítico da mesma, podem ser divididos em duas classes segundo mecanismo de ação: venenos da topoisomerase II atuam estabilizando os complexos de clivagem no interior celular (doxorubicina, daunorrubicina, oxaunorrubicina e mitoxantrona) (**Figura 19**) ou são inibidores da topoisomerase II atuando por inibição da enzima. A formação do complexo ternário DNA-topoisomerase II-fármaco pode ocorrer segundo três vias: a quinona pode preferencialmente interagir primeiro com o DNA, com a enzima ou atuar em

associação com o complexo DNA-enzima (KRISHNAN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2012). Já as quinonas aclarubicina, VP-16 e Hu- 331 (**Figura 19**) pertencem a classe dos inibidores da topoisomerase II os quais atuam interferindo na ligação enzima-DNA, inibindo a ligação enzima-ATP ou ainda estabilizando complexos binários enzima-DNA (CHEN *et al.*, 2012).

Figura 29 Estrutura de algumas quinonas que atuam via inibição das topoisomerase II.



Fonte: Autora (adaptado de CHEN *et al.*, 2012).

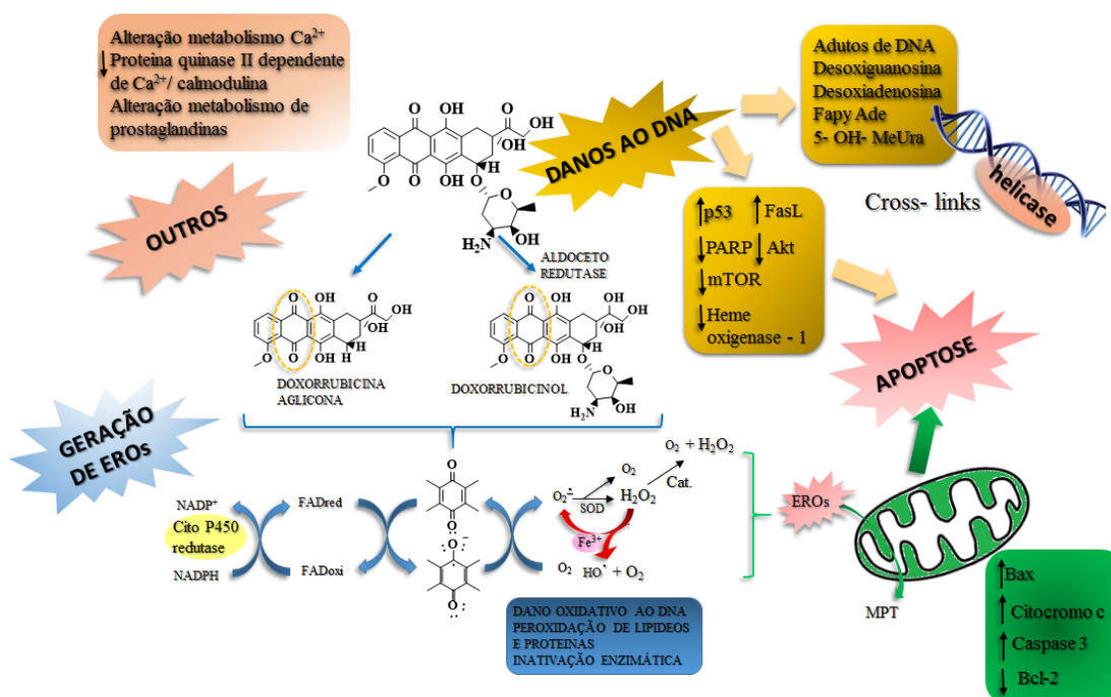
No mecanismo de ação molecular da doxorrubicina (veneno da topoisomerase), antes que a mesma atinja o núcleo celular, esta quinona forma um complexo com a subunidade proteossomal 20S, se transloca para o núcleo onde se dissocia ficando livre para interagir com DNA. Dois conjuntos de eventos caracterizam a ação mecânica dessa droga tão utilizada nos tratamentos de diversos tipos tumorais bem como as demais quinonas pertencentes ao grupo das antraciclina: (1) formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) advindo da biorredução do grupo quinona cujo mecanismo já foi abordado anteriormente (**Figura 02**) e (2) um conjunto de processos relacionados a alterações no metabolismo de cálcio intracelular e prostaglandinas, nomeados aqui como outros mecanismos (**Figura 20**):

(1) Formação de espécies reativas através de quatro diferentes vias:

- Formação do ânion radical semiquinona: a redução da quinona inicial por redutases NADP(H)-dependentes do sistema CYP450 gera a semiquinona que pode interagir com oxigênio molecular restaurando a quinona inicial e formando o ânion radical superóxido, como mencionado anteriormente, o qual sofre dismutação gerando peróxido de hidrogênio ou ainda o mesmo, via reações de Fenton ou Harber-Weiss, gera radical hidroxila (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010);

- Ativação das enzimas NADP(H) oxidases: a ativação de tal conjunto enzimático leva a formação de espécies reativas como ONOO⁻ que interage com metaloproteínas envolvidas nos mecanismos de cardiotoxicidade (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010);
 - Mecanismos não-enzimáticos: a semiquinona e EROs formados podem promover a liberação do íon ferro da ferritina e da aconitase aumentando o ferro intracelular colaborando para estresse oxidativo via reação de fenton (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010);
 - Produtos advindos da biotransformação: o metabolismo dessa quinona pode gerar a formação de doxorubicinol por enzimas hepáticas como aldocetoreduases. Este produto e a quinona de partida podem ainda sofrer hidrólise glicosídica eliminando o açúcar daunosamina formando aglicona, colaborando para a formação de EROs
- (2) Outros mecanismos: alterações no metabolismo do cálcio (Ca²⁺), com consequente aumento do mesmo no interior celular, acúmulo no miocárdio ventricular e mitocôndrias gerando perturbações no equilíbrio de resposta contração/relaxamento do músculo esquelético (VAN NORREN *et al.*, 2009). Além disso, antraciclinas afetam o metabolismo de prostaglandinas, importantes na manutenção do tumor, pois inibem a apoptose e auxiliam na metástase (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010).

Figura 20 Mecanismo molecular da toxicidade da quinona doxorubicina: os principais eventos são os danos oxidativos ao DNA, a formação de EROs e processos relacionados a alterações no metabolismo de cálcio intracelular e prostaglandinas, nomeados aqui como outros.



Fonte: Autora (adaptado de GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010).

FasL: receptor de morte FAS; Akt: proteína quina serina-treonina; PARP: poli (ADP-ribose) polimerase; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; 5-OH-MeUra: 5-hidroximetiluracila.

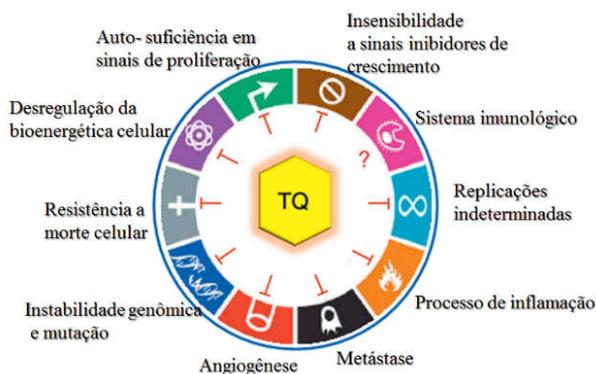
Outra quinona que vem se destacando nos estudos frente ao câncer é a timoquinona (TQ). Naturalmente encontrada nas sementes de *Nigella sativa* L., a mesma foi isolada de outras partes de angiospermas de diferentes famílias. O que torna esta quinona alvo de interesse em estudos biológicos é sua fácil extração e sua não toxicidade aos tecidos normais (DARAKHSHAN *et al.*, 2015).

O mecanismo de ação dessa quinona se dá pela modulação dos processos bioquímicos envolvendo a formação de EROs como os demais membros dessa classe de compostos atuando como antioxidante ou um pró-oxidante dependendo do estado redox da célula. Em células tumorais, esta quinona atua promovendo a formação de EROs como mencionado já em células saudáveis a TQ inibe especialmente a peroxidação lipídica e aumenta a atividade de enzimas do sistema de detoxificação celular como SOD, Cat, GSH, exercendo papel de um antioxidante forte (BANERJEE *et al.*, 2010; WOO *et al.*, 2012). É um dos poucos compostos que é proteína-multi alvo, atuando na interação proteína-proteína como por exemplo, se liga às enzimas GSH,

NADH e NADPH formando dois antioxidantes fortes, glutationilo-diidrotimoquinone e diidrotimoquinone, e forma um complexo com a quinase polo-like (Plk1), fundamental na regulação do ciclo celular e mitose, inibindo a ação desta (SCHNEIDER-STOCK *et al.*, 2014).

Algumas características compõem as capacidades biológicas, como mencionado por Hanahan e colaboradores (2011), governadas por estratégias, que colaboram para a complexidade de transformação de uma célula sadia em cancerígena: resistência a morte celular, angiogênese, invasividade, metástase, sinalização proliferativa sustentável, capacidade de gerar microambiente tumoral, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento. Compostos que interfiram em pelo menos um destes eventos são considerados promissores em terapias anticancer e a A TQ abrange o espectro de vários desses eventos (**Figura 21**).

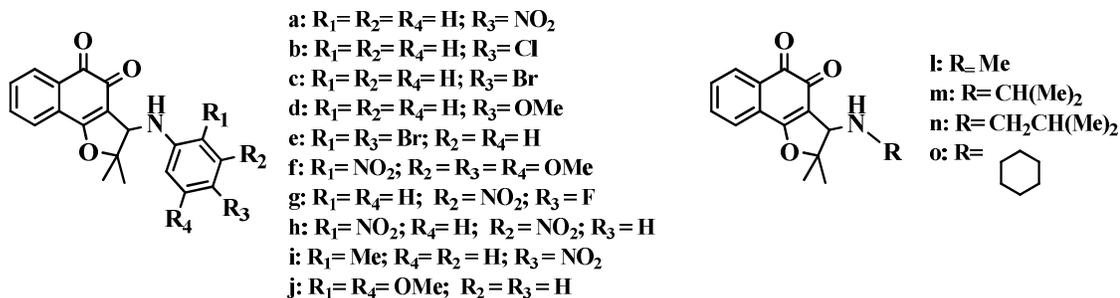
Figura 21 Os principais eventos que conduzem à malignidade modulados por TQ. Esta quinona atua em nove dos processos relacionados. Os eventos relacionados ao sistema imunológico permanecem ainda pouco esclarecido.



Fonte: Autora (adaptado de SCHNEIDER-STOCK *et al.*, 2014).

Da Silva Júnior e colaboradores (2009) publicaram um trabalho sobre derivados da nor- β -lapachona. Os compostos foram avaliados quanto à sua atividade anti-cancerígena frente as linhagens de câncer relacionadas ao sistema nervoso central (SF295), cólon (HCT8), melanoma (MDA-MB435) e leucemia (HL60). A maioria dos derivados exibiram bons resultados de atividade contra todas as linhas celulares. Alguns compostos mostraram ser ainda mais ativos que a β -lapachona, com valores de IC_{50} abaixo de 2 μ M. Dois compostos (**a** e **j** **Figura 22**) foram mais ativos que a doxorubicina, frente a linhagem MDA-MB435, já as quinonas **a**, **b**, **e-h**, **j** e **o** exibiram ótimos resultados frente à linhagem HL-60 quando comparado à β -lapachona (IC_{50} = 1,65 μ m) e a nor- β -lapachona (IC_{50} = 1,75 μ m)

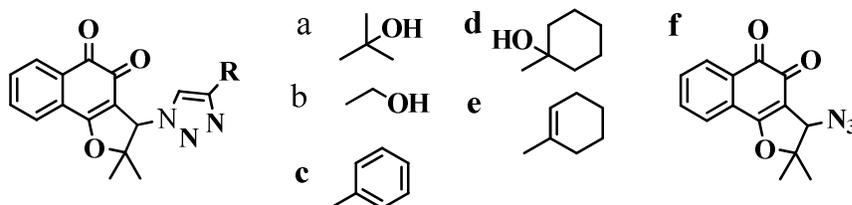
Figura 22 Derivados da nor- β -lapachona estudados por da Silva Júnior e colaboradores (2009) com atividade frente a diversas linhagens tumorais.



Fonte: Autora (adaptado de DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2009).

Ainda no mesmo ano, os autores sintetizaram e estudaram derivados da nor- β -lapachona ostentando o heterociclo 1, 2, 3-triazólico em sua estrutura. Segundo os autores as quinonas apresentaram valores de IC_{50} variando entre 0,43 a 9,48 μ M. O composto **d** (Figura 23) apresentou melhor resultado de IC_{50} de 0,43- 1,8 μ M para as linhagens estudadas. Houve uma correlação entre citotoxicidade e o log P calculado em que o aumento de lipofilicidade conduz a compostos com maiores valores de citotoxicidade. Os autores sugerem que os compostos **c**, **d** e **e** podem ser explorados para a preparação de análogos para a desenvolvimento de novos fármacos anti-tumorais.

Figura 23 Derivados da nor- β -lapachona ostentando um anel 1, 2, 3 triazólico estudados por da Silva Júnior e colaboradores (2009) com atividade frente a diversas linhagens tumorais.

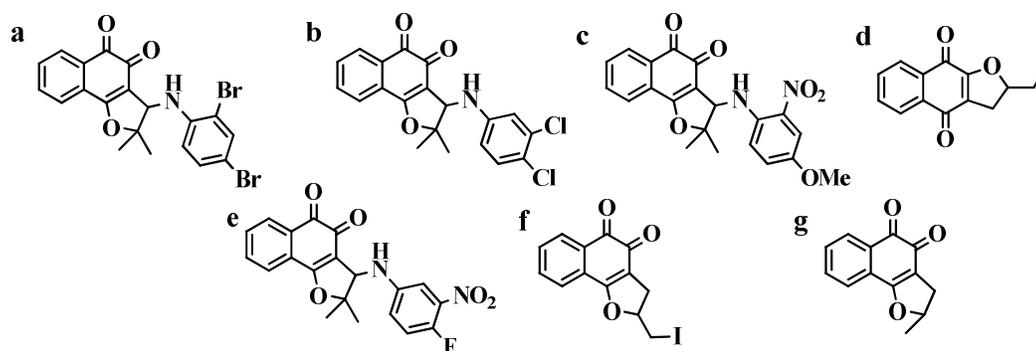


Fonte: Autora (adaptado de DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2009).

Cavalcanti e colaboradores (2013) sintetizaram uma série de sete novas quinonas, a maioria conservando o núcleo da nor- β -lapachona em sua estrutura bioativa frente a linhagens cancerígenas (HL-60, K562, Molt-4 e Jurkat). O teste do cometa foi usado para determinar se estes compostos interagem com o DNA promovendo danos. Os compostos induzem danos

oxidativos ao DNA pela geração de EROs e problemas no processo de reparo levando a célula a apoptose. O mecanismo de ação destes compostos não envolve a inibição de topoisomerase. As naftoquinonas **a**, **b**, **c** e **e** (IC_{50} = 0,33- 2,30 μ M) foram as mais ativas (**Figura 24**).

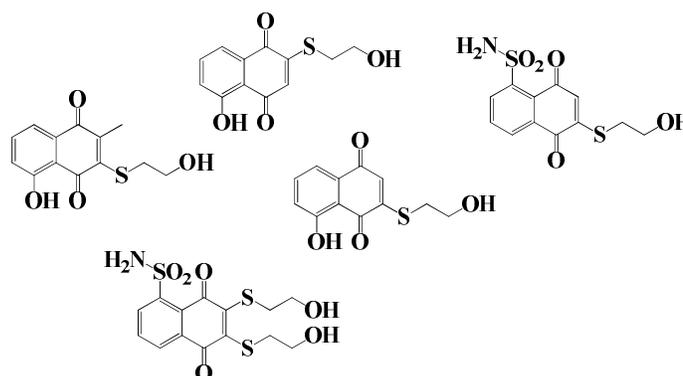
Figura 24 Derivados da nor- β -lapachona e nor- α -lapachona estudados por Cavalcanti e colaboradores (2013) com atividade frente a diversas linhagens tumorais.



Fonte: Autora (adaptado de CAVALCANTI *et al.*, 2013).

Ainda em 2013, Bhasin e colaboradores exploraram o potencial anti-câncer frente as linhagens DU-145, MDA-MB-231, HT-29, de quinonas tioladas sendo que as mesmas apresentaram IC_{50} = 1,6- 9,7 μ M, valores melhores que as quinonas precursoras (pumblagina e julglona). Além disso, as mesmas mostraram ser inibidoras da STAT 3, uma proteína pertencente a família das STATs (signal transducers and activators of transcription), que são fatores de transcrição ativados por tirosinas quinases. A STAT3 controla processos celulares como a proliferação e a sobrevivência e são fundamentais para a progressão do tumor (**Figura 25**).

Figura 25 Quinonas estudadas por Bhasin e colaboradores (2013) com potencial anti-câncer.

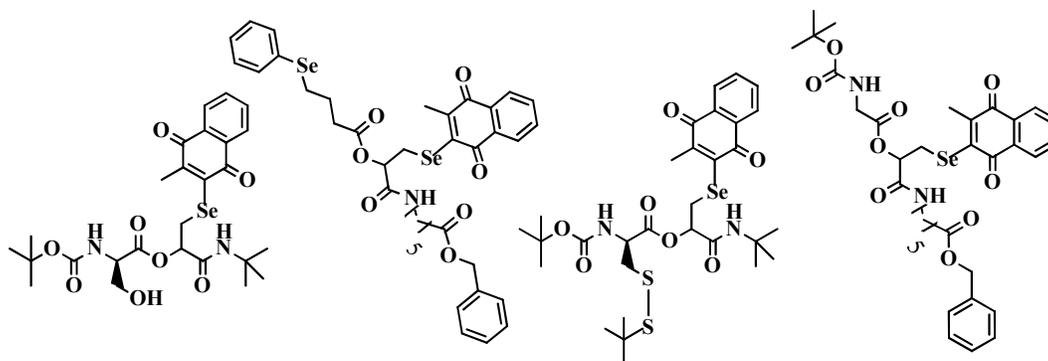


Fonte: Autora (adaptado de BHASIN *et al.*, 2013).

Os mesmos autores sintetizaram e testaram outros compostos com múltiplos centros redox especialmente direcionados para os tipos de câncer cujo ambiente exibe naturalmente um estado de estresse oxidativo como é o caso dos cânceres de próstata e mama. Os níveis de EROs destas células, quando comparado para as células saudáveis, está muito próximo ao limiar crítico redox que induz apoptose. Os múltiplos centros redox são uma estratégia para esses tipos tumorais mais agressivos ou resistentes. Os compostos foram testado frente a 58 linhagens de células cancerígenas Todos os compostos avaliados exibiram uma citotoxicidade notável contra essas linhagens exibindo valores de IG_{50} em faixa micromolar.

A via apoptótica mediada pelo estresse oxidativo relacionado ao retículo endoplasmático (RE) ou às mitocôndrias ou ambas as vias podem ser ativadas quando um certo nível de EROs está presente. Estas vias apoptóticas dependem da ativação de caspases, em particular, caspases 3 e 7, para desencadear o processo. Verificou-se que compostos mais relevantes biologicamente ativaram essas caspases em células A-431 após 24 h de exposição. Disfunções mitocondriais e indução de apoptose estão relacionadas à redução dos níveis de glutathiona e redução da quimiorresistência. Os compostos da **figura 26**, numa concentração de 5 μ M, causaram uma redução dos nível de GSH intracelular em câncer de mama (MCF-7) em 46%, 59%, 62%, e 76%, respectivamente .

Figura 26 Algumas das quinonas estudadas por Bhasin e colaboradores (2013) com potencial anti-câncer possuindo mais de um centro redox em sua estrutura.



Fonte: Autora (adaptado de BHASIN *et al.*, 2013).

Outro trabalho em colaboração com o grupo do Prof. Eufrânio em 2014, envolvendo um conjunto de 39 quinonas, foi publicado. Destacam-se dois compostos em que uma substituição bioisostérica foi realizada para avaliar a influência do átomo de enxofre sobre a atividade. O composto com o núcleo de nitrogênio apresentou boa atividade frente às linhagens HL-60 (IC_{50}

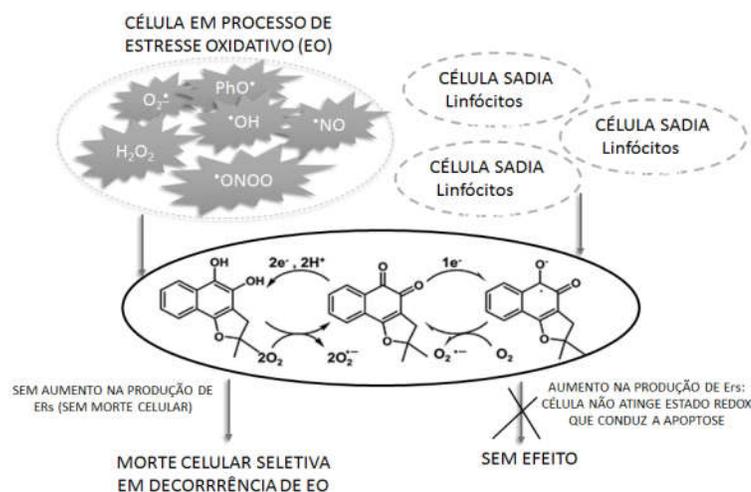
= 2,91 μM) e foi muito seletivo ao passo que a quinona com núcleo de enxofre apresentou bons valores de atividade frente às linhagens HL-60 e HCT-8. Outro detalhe importante sobre esse trabalho é que existem poucos artigos na literatura com avaliação eletroquímica de compostos com núcleo de calcogênio em sua estrutura.

2.4 Correlação entre parâmetros eletroquímicos e doenças como câncer e doença de Chagas

Como já mostrado, várias doenças estão associadas a um estado redox intracelular em desequilíbrio e ao estresse oxidativo, o qual gera EROs. Essa perturbação na dinâmica da homeostase fisiológica pode ser observada em células cancerígenas e em doenças parasitárias como doença de Chagas. No primeiro caso, os níveis mais elevados de EROs são estabelecidos, em virtude do metabolismo celular e, no segundo caso, como consequência da destruição local do tecido causada por secreções do parasita, reações citotóxicas mediadas pela resposta imunológica e danos secundários às mitocôndrias. Essas diferenças no estado redox celular geram diferenças bioquímicas significativas que são exploradas no desenvolvimento de fármacos mais seletivos. Muitos fármacos quimioterápicos em uso são moléculas pequenas hidrofóbicas e mudanças nos parâmetros eletroquímicos das membranas celulares em células tumorais refletem-se no processo de difusão transmembrana e retenção celular, sendo capazes de modular respostas imunológicas e afetar mecanismos de transdução que levam a apoptose (PAIVA *et al.*, 2015).

Moduladores redox utilizam a condição redox pré-existente em células e tecidos afetados como vantagem terapêutica frente às células cancerígenas ou parasitárias, catalisando a oxidação de proteínas específicas e enzimas e/ou aumentando significativamente os níveis de EROs intracelular a fim de disparar as cascatas de sinalização que conduzem à apoptose. As quinonas são uma classe de compostos que atuam por esse mecanismo, tendo a nor- β -lapachona (**Figura 27**) como substância protótipo com atividade anticâncer (0,3-1,75 μM) frente a diversas linhagens celulares.

Figura 27 Mecanismo proposto em que a nor- β -lapachona, representante da classe das naftoquinonas, promove morte celular seletiva. Estimuladores do estresse oxidativo (EO) favorecem a morte celular através do processo apoptótico.



Fonte: Autora (adaptado de PAIVA *et al.*, 2015).

Embora os parâmetros eletroquímicos não forneçam uma correlação perfeita com a atividade biológica em função da complexidade dos ambientes celular e intersticial e levando em consideração que, em organismos vivos, vários outros aspectos estão envolvidos na dinâmica e manutenção da vida, ainda assim tais parâmetros são, não apenas úteis, mas também norteadores no entendimento do funcionamento desses sistemas e nas possíveis alterações decorrentes da quebra da homeostase advindo de doenças. Diversos fatores devem ser considerados importantes não apenas em relação aos aspectos mecanísticos *in vivo* mas também na atividade de compostos biologicamente ativos como: permeabilidade, difusão, solubilidade, metabolismo, biodisponibilidade, coeficiente de partição, estereoquímica, interações enzimáticas etc (DE ABREU *et al.*, 2011). Devido as similaridades entre as reações eletroquímicas e biológicas no que se refere ao processo de transferência eletrônica como a natureza heterogênea (interface eletrodo-enzima-solução), orientação específica, ocorrência reacional em ambientes aquosos (citoplasma) e não aquosos (membranas) é importante que os estudos eletroquímicos mimetizem essas condições e biodinamicidades biológicas da melhor forma possível de modo que experimentos utilizando solventes orgânicos se aproximam do ambiente hidrofóbico celular e experimentos utilizando sistemas aquosos, ambientes citoplasmáticos (HILLARD *et al.*, 2008; DE ABREU *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2011). A formação de microambientes celulares e seu conteúdo de oxigênio é outro aspecto a ser

considerado: após a redução, deve-se considerar a possibilidade de reações envolvendo O_2 e consequente geração de $O_2^{\cdot-}$ (no caso de quinonas) sendo os potenciais de redução dessa classe dependente do conteúdo de O_2 (HILLARD *et al.*, 2008; DE ABREU *et al.*, 2011). Como tais compostos estão envolvidos na geração de estresse oxidativo, os potenciais de redução afetam o equilíbrio desse sistema. Segundo de Abreu e colaboradores (2011), o potencial de redução mínimo necessário para a ativação de flavoproteínas e o potencial máximo de proteção contra redução de O_2 (o potencial de redução para terapias redox) estaria entre - 0,23 V e - 0,7 V vs. ECS, em meio prótico.

Os estudos em ambiente com solventes orgânicos são importantes não somente pelo fato de ocorrer processos envolvendo o próprio sistema de membranas e seus componentes ancorados como pelo fato de as membranas celulares estarem em contato com o ambiente hidrofílico (citoplasma) celular. Assim, potenciais de redução em sistemas apróticos são em geral mais negativos quando comparados aos sistemas próticos sendo a faixa útil entre os valores - 0,7 V e + 1,1 V vs. ECS (HILLARD *et al.*, 2008; DE ABREU *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigação de quinonas, utilizando técnicas eletroquímicas, fluorimétricas, espectrofotométricas, computacionais, juntamente com alguns ensaios biológicos na perspectiva de encontrar correlações úteis no planejamento de novos conjuntos de quinonas sintéticas mais seletivas e biologicamente mais ativas.

3.2 Objetivos específicos

Eletroquímica:

- ✓ Realizar o estudo eletroquímico de algumas quinonas em meio aprótico;
- ✓ Verificar a reatividade de algumas quinonas com o oxigênio molecular a fim de investigar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) como provável mecanismo de ação biológica.

Ensaio biológicos:

- ✓ Determinar a eficácia antibacteriana/ antifúngica de certas quinonas frente a bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e o fungo *Candida albicans* e avaliar a formação de biofilme para a quinona mais ativa obtendo informações sobre o perfil de ação da mesma;
- ✓ Realizar a triagem rápida para o estudo de moléculas bioativas por meio de análise colorimétrica por MTT que detecta a viabilidade celular além de obter medidas da produção de espécies reativas por NBT.

Espectroscopia:

- ✓ Avaliar a interação entre as quinonas das subclasses 1.3, 3.2, 4.1, 5.1, 7.1 e 8.1 com ctDNA (Calf thymus), utilizando técnicas espectroscópicas que permitiram avaliar o modo de ligação dos complexos formados com ctDNA.
- ✓ Obter os dados de constante de ligação K_b e parâmetros termodinâmicos (ΔS , ΔH e ΔG);
- ✓ Avaliar o efeito protetor de algumas quinonas contra a peroxidação lipídica iniciada pelo radical peroxila.

Estudos computacionais:

- ✓ Prever possíveis sítios de captura de elétrons através da análise de cálculos estruturais eletrônicos;
- ✓ QSAR: Obter modelos da relação quantitativa entre estrutura e atividade tripanocida de 15 quinonas já publicadas as quais foram otimizadas na presença e ausência do solvente DMF
- ✓ Gerar descritores eletrônicos e moleculares;
- ✓ Selecionar as variáveis relevantes para a construção dos modelos;
- ✓ Gerar modelos QSAR através do método PLS e analisá-los

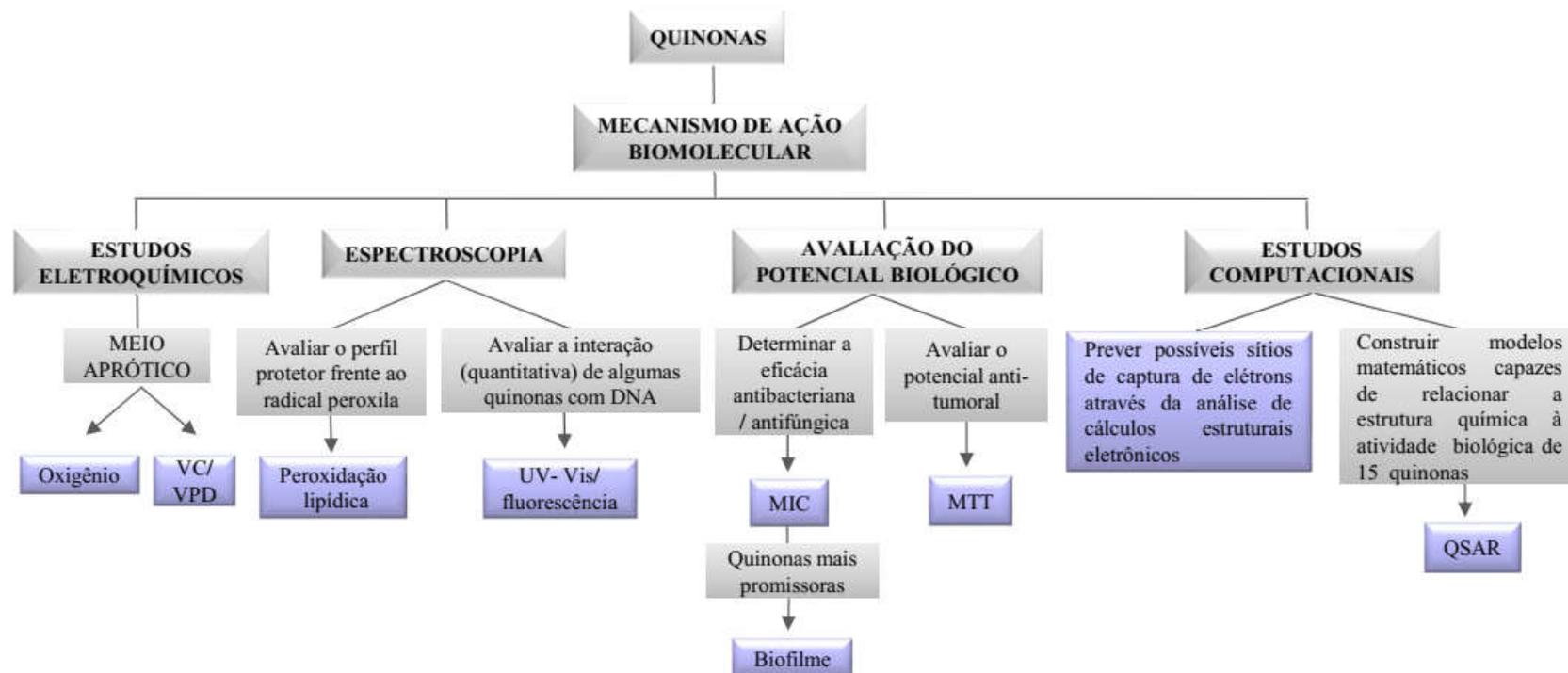
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Solventes

Todas as quinonas foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelos grupos dos professores Dr. Eufrânio da Silva Júnior (UFMG), Dr. Sílvio do Desterro Cunha (UFBA) e Dr. Vítor Francisco Ferreira (UFRJ). A elucidação estrutural das mesmas foi realizada com base em métodos espectroscópicos FTIR, RMN- H^1 e RMN- C^{13} sendo algumas, já disponíveis na literatura (DIOGO *et al.*, 2013; DA CRUZ *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2015). Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18 M Ω cm) utilizando reagentes químicos de grau analítico listados na **tabela 02** a seguir.

A **Figura 28** mostra a rota experimental simplificada utilizada no presente trabalho para melhor compreensão.

Figura 28 Fluxograma dos experimentos conduzidos neste trabalho.



Fonte: Autora.

Tabela 02 Lista de reagentes utilizados.

	Reagentes e Solventes	Marca
Estudos Eletroquímicos	DMF (N,N-dimetilformamida 99.8%)	Acrós Organics
	TBAPF ₆ (Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio 98%)	Sigma Aldrich
	TBABr (Brometo de tetrabutilamônio ≥99.0%)	
	HClO ₄ (Ácido Perclórico) 70% P.A. ACS	Vetec
	H ₂ SO ₄ (Ácido Sulfúrico) P.A	
	NaOH (Hidróxido de Sódio) Micropérolas 99% P.A. ACS	
	Acetato de Etila (CH ₃ COOC ₂ H ₅) P.A. ACS	
Espectroscopia (Peroxidação Lipídica)	NaH ₂ PO ₄ (Fosfato de sódio monobásico), Na ₂ HPO ₄ .7 H ₂ O (Fosfato de sódio dibásico heptaidratado)	Acrós Organics
	EDTA(Ácido Etilenodiaminotetraacético)	
	Trolox [®] (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)	
	AAPH [2,2'-azobis (2-metilpropionamidina)]	Molecular Probes (Canadá)
	Sonda Bodipy C ^{11581/591} (ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno-3-undecanóico)	
Espectroscopia (UV- Vis e Fluorescência)	Trizma HCl	Sigma Aldrich
	DNA (Sodium salt from calf thymus, Type I fibers)	
	Brometo de Etídio (BioReagent, for molecular biology, powder) [(3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenanthridinium bromide)]	
	DMSO (Dimetilsulfóxido) Reagent plus [®] 99.5%	
	NaCl (Cloreto de Sódio)	Vetec
	Álcool etílico P.A.	Dinâmica
Avaliação do Potencial Biológico (MIC/ Biofilme estático)	BHI (Brain Heart Infusion) HiMedia [™]	Sigma, Steinheim, Alemanha)
	Resazurina 0,01%	
	Clorexidina	
	DMSO	
	kit de fluorescência (LIVE/DEAD [®] BacLight [™] Bacterial Viability Kit L13152;	Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Estados Unidos).
	SYTO 9 e Iodeto de propídio	

	microplaca preta para fluorescência (FLUOTRAC™)	Greiner Bio-One, Ray Lab, New Zealand
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	American Type Culture Collection
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 15656	
	<i>Candida albicans</i> ATCC 26645	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	

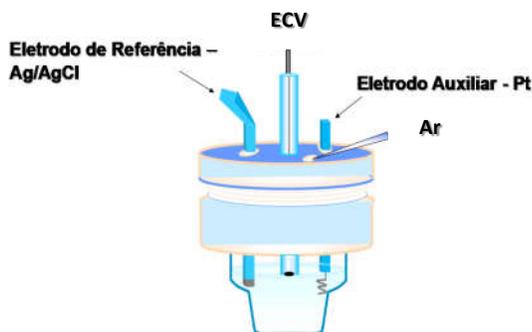
Fonte: Autora.

4.2 Estudo eletroquímico

4.2.1 Instrumentos, eletrodos e celas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), em meio aprótico e o sistema eletroquímico, desaerado utilizando gás argônio. Todos os experimentos foram conduzidos em equipamento potenciostato/galvanostato, PGSTAT (AUT73222) da Autolab® em um sistema de três eletrodos (**Figura 29**): eletrodo de carbono vítreo (ECV) (Microquímica, diâmetro 3 mm) como eletrodo de trabalho; fio de platina, como eletrodo auxiliar e $\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), como eletrodo de referência. Os gráficos foram tratados utilizando o programa Microlab OriginPro 8.0.

Figura 29 (A) Sistema com três eletrodos para análises eletroquímicas; sendo eletrodo de referência ($\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{Cl}^-$), eletrodo de trabalho (ECV) e eletrodo auxiliar (fio de platina).



Fonte: Autora (Adaptado de LOPES, 2014)

4.2.2 Limpeza padrão do eletrodo de carbono vítreo (ECV)

O eletrodo de trabalho foi previamente polido com alumina em feltro apropriado até exibir uma superfície de aparência espelhada. A manutenção das condições de limpeza durante o processo de polimento é fundamental a fim de expor uma nova superfície ativa através de um polimento uniforme com movimentos em forma do número oito em três diferentes suspensões de alumina ($1,0$; $0,5$ e $0,3 \mu\text{m}$). Após tal procedimento, o ECV foi lavado com água ultrapura e sonificado em ultrassom com álcool etílico, por cerca de 20 s, garantindo a remoção das partículas de alumina da superfície do mesmo.

Alguns compostos adsorvem fortemente na superfície do ECV, como ocorreu com algumas das quinonas estudadas. Neste caso, seguiu-se as recomendações propostas por

Fugivara e colaboradores (2012) em que o ECV foi polido sobre uma folha de papel sulfite. Quando ainda assim houve manutenção dos compostos adsorvidos na superfície, utilizou-se uma lixa fina de carvão de silício P4000 da Buehler, seguindo as mesmas instruções de polimento uniforme. Em certos casos, isso ainda não foi suficiente, fazendo-se necessário a imersão do eletrodo em solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹, em ultrassom por cerca de 20 s. Em seguida, lavou-se a superfície do eletrodo com água deionizada em abundância. Pode-se recorrer a uma etapa extra de mais 10 s no ultrassom, em banho de etanol. Quando os recursos citados não se fizeram suficientes, recorreu-se a varreduras cíclicas em faixa de potencial de -0,5 V a +1,5 V [vs. Ag|AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹)] a 200 mV s⁻¹ em solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, durante 20 ou mais ciclos (FUGIVARA *et al.*, 2012).

Foram realizados testes em solução de (K₃[Fe(CN)₆]/ (K₄[Fe(CN)₆].3H₂O) 1 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, para a verificação da área eletroativa do eletrodo, utilizando voltametria cíclica, na faixa de potencial de 0,3 V à -0,6 V vs. Ag/AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) (eletrodo de referência), com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

4.2.3 Meio Aprótico

Os estudos nesse ambiente eletroquímico foram realizados com o solvente orgânico *N,N*-dimetilformamida (DMF), em virtude de sua ampla faixa de potencial de trabalho, e dos eletrólitos TBAP e TBAPF₆. Tal solvente é susceptível à reação de hidrólise, com geração de dimetilamina e ácido fórmico, sendo necessária a destilação sob pressão reduzida, após tratamento com CuSO₄ anidro (para remoção de aminas), antes do seu uso. Recomenda-se fortemente atenção a esta etapa, uma vez que a presença de *N*-metilformamida, a ser evitada, pode interferir no processo reacional ou mesmo atuar como doador de prótons (LUND, 2001; SOUZA, 2011). Todas as análises iniciais, realizadas com DMF da empresa Vetec, foram conduzidas com DMF advindo deste processo. As demais análises foram realizadas com DMF da empresa Acros Organics o qual é extra-seco, não necessitando de destilação prévia.

Para o processo de síntese de TBAP, seguiu-se atenciosamente a metodologia proposta por Souza (2011) a qual consistiu em dissolver lentamente 103,7 g de brometo de tetrabutilamônio (TBABr) em 200 mL de água destilada, seguido da adição de uma alíquota de 30 mL de ácido perclórico, resultando em suspensão. A filtração a vácuo do produto formado originou cristais brancos. Em seguida, os cristais foram dissolvidos em acetato de etila (a

quente) e a mistura colocada num funil de separação para remoção de água residual. Colocou-se a fase com solvente orgânico em banho de gelo para a recristalização. Após filtração, os cristais formados foram secos sob pressão reduzida (SOUZA, 2011).

Para a purificação de TBABF₆, procedeu-se da seguinte forma: 25 g de TBABF₆ foram solubilizadas em 50 mL de etanol absoluto, a quente (68°C) e, em seguida a solução foi filtrada rapidamente, resfriada e filtrada a vácuo. Para eliminar possíveis impureza, foi realizada outra cristalização em etanol, tendo sido o TBABF₆ recristalizado, seco sob pressão reduzida, a aproximadamente 40°C.

A fim de verificar a qualidade do solvente (DMF) advindo do processo de destilação a pressão reduzida bem como dos eletrólitos de suporte, realizaram-se voltametrias cíclicas em ampla faixa de potencial, observando-se também o domínio eletroquímico neste solvente. Para tal, a massa equivalente a 0,1 mol L⁻¹ do eletrólito suporte (TBAP ou TBAPF₆) foi solubilizada em DMF e desaerada com argônio (Ar) por 10 minutos. Após a retirada de oxigênio do sistema eletroquímico, realizou-se o registro do branco por voltametria cíclica a 100 mV s⁻¹. Todas as quinonas foram estudadas em cela eletroquímica isoladas da luz na concentração de 1 mmol L⁻¹.

4.2.4 Estudos em Meio Aprótico em Presença de Oxigênio

Para os estudos em meio aprótico frente a oxigênio das quinonas pertencentes a classe 6 e subclasses 2.2, 7.2 e 8.2, fez-se necessário o borbulhamento deste gás na cela eletroquímica contendo a quinona em estudo. É importante a análise do deslocamento anódico de potencial para a primeira onda de redução e o aumento da corrente de pico catódico. Inicialmente, a solução deve ser desaerada com argônio para a medida de concentração zero de oxigênio seguindo-se então às adições sucessivas deste por borbulhamento e monitoramento de sua concentração com oxímetro (Digimed DM- 4). A concentração de oxigênio é um dos parâmetros para calcular a constante de associação aparente (K_{ap}) para a reação com oxigênio, que pode ser determinada a partir da equação descrita por Bard & Faulkner (1990), (FERREIRA *et al.*, 2013):

$$I_{pc} = \frac{I_{p0}}{K_{ap}} = \frac{KRT[O_2]}{nvF}$$

sendo:

I_{pc} = corrente catalítica

I_{pc}/I_{p0} = corrente normalizada

K_{ap} = constante catalítica aparente (s^{-1})

v = velocidade de varredura ($V s^{-1}$)

n = número de elétrons

F = Constante de Faraday ($96485 C mol^{-1}$)

T = temperatura (298 K)

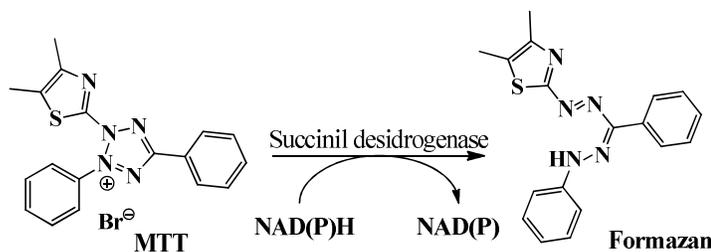
$R = 8,314 J mol^{-1}K^{-1}$

4.3 Ensaio de viabilidade celular

Sendo um método barato, rápido e sensível, a análise de citotoxicidade por ensaios de MTT avalia a viabilidade e o estado metabólico das células (BERRIDGE *et al.*, 1996). Muito utilizado, o sucesso desse método está relacionado a carga positiva que se forma na molécula do corante facilitando a absorção do mesmo pela membrana plasmática das células (BERRIDGE *et al.*, 2005).

Consiste numa análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (cor amarela) em azul de formazan (cor púrpura), pelo rompimento do anel tetrazólico, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (**Figura 30**). O estudo citotóxico pelo método do MTT permite avaliar a citotoxicidade, uma vez que a produção de formazan está associada ao estado funcional da cadeia respiratória (BERRIDGE *et al.*, 1996).

Figura 30 Conversão do composto 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em formazan pela enzima succinil desidrogenase.



Fonte: Autora.

Três conjuntos de quinonas foram submetidas a esse ensaio sendo: as moléculas da classe 02 avaliadas segundo as linhagens tumorais, PC3 (câncer de próstata) HCT-116 (côlon - humano), SF-295 (Glioblastoma) K562 (Leucemia mielóide crônica) e linhagem não tumoral PBMC (células mononucleadas de sangue periférico); cinco moléculas da classe 02 (tiofenol, 3-metil tiol, 4-metil tiol, 4-cloro tiol e 4-metoxil tiol) avaliadas utilizando células do epitélio alveolar de adenocarcinoma humano (A549) e, por fim, um terceiro ensaio com as quinonas da série RSL (classe 8) foi realizado com as linhagens SW620 (côlon), A549 (adenocarcinoma de pulmão), HL60 (leucemia promielocítica), MDA-MB435 (melanoma), SF295 (glioblastoma) e L929 (fibroblasto murino), sendo esta última, linhagem não tumoral. As linhagens foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) a exceção da linhagem não cancerígena L929, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil).

As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As quinonas foram submetidas ao teste com tais linhagens sendo as amostras diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 10 µg/mL. As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/ mL para as linhagens PC3 e SF295, 0,3 x 10⁶ cél/ mL para K562 e 0,7 x 10⁵ cél/ mL para a linhagem HCT116. As placas foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste período, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3 h. A absorvância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Estatisticamente, os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular, usando o programa GraphPad Prism.

Para as quinonas da subclasse 2.5, as células das linhagens escolhidas (1 x 10⁴ células/poço) foram cultivadas em placas com 96 poços, em meio de cultura RPMI (suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina) por 16 horas em estufa de CO₂ (5%, 37 °C). Posteriormente, as células foram tratadas com as substâncias testes nas concentrações 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 µM e incubadas por 24 h. Após a incubação, o meio RPMI foi removido, e a cada poço adicionado novo meio RPMI contendo MTT (5 mg/mL), incubando a 37°C, em estufa de CO₂, por mais 4 h. Após este período, o sobrenadante foi desprezado e 150 µL da solução reveladora de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço da placa, deixando a placa à temperatura ambiente, por 15 minutos. A

leitura da solução a partir de cristais de formazan foi realizada em espectrofotômetro (540 nm), sendo os resultados expressos em percentual de células viáveis, em relação ao grupo exposto ao meio de cultura.

No terceiro grupo de quinonas avaliadas, as células cancerígenas foram mantidas em meio RPMI 1640 e a linhagem não tumoral foi cultivada sob condições padrão em Meio Essencial Mínimo (MEM) enriquecido com sais de Earle. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de glutatona, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e mantidos a 37° sob atmosfera de 5% de CO₂. As células foram crescidas com 24 h de antecedência ao tratamento e após esse período, o meio foi substituído por um novo meio contendo os compostos teste e o grupo controle contendo apenas meio com DMSO, sendo a concentração final deste solvente 0,1 % (v/ v) mantida constante. O crescimento celular foi quantificado pela redução do sal de MTT em células vivas como já mencionado. Para tal 0,3 x 10⁶ células cancerígenas/poço e 0,5 x 10⁵ fibroblastos/poço foram cultivadas em placas com 96 poços e as quinonas (0,04 à 25 µg/mL) diluídas previamente em DMSO (0,1%) foram, em seguida adicionadas, e o conjunto incubado por 72 h. As etapas posteriores são as mesmas executadas para o primeiro teste de MTT. Em todos os casos os experimentos foram executados em triplicata.

4.4 Medida da produção de espécies reativas por NBT

A técnica do NBT (azul de nitro tetrazólio ou nitro blue tetrazolium) foi adaptada a partir da técnica descrita por Cruz e colaboradores (2008), envolvendo a produção de ânion superóxido (O₂⁻), capaz de reduzir o composto NBT para uma forma insolúvel, formazan, que é identificada por meio de espectrofotometria em comprimento de onda específico.

As células de adenocarcinoma de pulmão A549, cultivadas sob a forma de monocamadas em meio RPMI (suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina) em estufa de CO₂ (5%, 37°C), foram cultivadas em placa de 96 poços por 18h numa densidade de 1 x 10⁴ células por poço. Em seguida, após substituição do meio de cultivo, as mesmas foram tratadas com veículo ou amostras nas concentrações de 0,1 µM ou 1 µM por 4h. Posteriormente, o meio de cultivo foi substituído por meio contendo o estímulo (TNF-α, 30 ng/mL) e as respectivas quinonas nas concentrações 0,1 à 1,0 µM, sendo as células mantidas por mais 24h. Após este período, o sobrenadante foi desprezado e as células

foram incubadas (200 µL/poço) com solução NBT e mantidas em estufa por 1h. Após essa etapa, desprezou-se o sobrenadante e um volume de 200 µL de solução reveladora (110 µL de DMSO + 90 µL de KOH 1 M) foi adicionado, sendo a absorbância mensurada em leitor de placas (thermoplate TP- reader) em comprimento de 630 nm. Células mantidas apenas com meio de cultivo durante o experimento e incubadas com NBT sem estímulo foram utilizadas como controle negativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de redução do NBT, seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Redução NBT (\%)} = \frac{D.O. amostra - D.O. controle negativo}{\text{Grupo contr} D.O. controle negativo} \times 100$$

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e ao fungo *Candida albicans*

Para este experimento foram utilizadas as cepas de *P. Pseudomonas aeruginosa* (ATCC®27853™), *Staphylococcus aureus* (ATCC®15656™), *Escherichia coli* (ATCC®25922™) e *Candida albicans* (ATCC®26645™) obtidas junto à Fiocruz e padronizadas originalmente pela *American Type Culture Collection*.

Alíquotas das cepas mencionadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo BHI e incubadas por 24h a 37°C para a obtenção do inóculo bacteriano. O mesmo procedeu para *C. albicans* porém em meio Sabouraud. Em seguida os inóculos foram centrifugados, suspensos em solução salina 0,9% e padronizados por espectrofotometria UV-Vis usando escala de McFarland. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)/ Concentração Fungicida Mínina (CFM) dos compostos foi realizada através da técnica de microdiluição, descrito pela Manual Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI acrescido de algumas modificações (ANDREWS, 2001).

Para tal foi necessário o uso de pacas estéreis de microdiluição de 96 poços sendo que, cada poço preenchido, ao fim do processo, apresentou volume total de 100 µL (suspensão bactéria/fungo, meio BHI/ Sabouraud e as quinonas testadas em diferentes concentrações que variaram de 400 µg/mL a 15 µg/mL). Em seguida as microplacas foram cobertas e incubadas a 37°C por 24 horas. Os seguintes controles de esterilidade foram realizados: soluções estoques puras, Sabouraud/ BHI sem adição do inóculo e da solução salina 0,9%, além do controle de viabilidade do inóculo microbiano e de eficiência do meio de cultura (Sabouraud/ BHI com

adição de inóculo) e do controle negativo. Também foi realizado o controle positivo com a gluconato de clorexidina, gentamicina ou miconazol, a depender do organismo utilizado, em diferentes concentrações.

Ao final desta etapa, procedeu-se ao teste colorimétrico utilizando resazurina, em cada poço recebeu este corante a 0,01% (PALOMINO *et al.*, 2002; SARKER *et al.*, 2007) e submetidas novamente a incubação por mais 1h ao fim da qual a CIM. foi determinada visualmente. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) é um corante azul, fracamente fluorescente, considerado o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA *et al.*, 2002). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (azul) em resofurina (rosa) (**Figura 31**). Como a redução da resazurina pelo sistema de transporte de elétrons bacteriano ocorre por intermédio da desidrogenase mitocondrial, ela pode ser usada para medir as atividades metabólicas da respiração e crescimento de uma cultura bacteriana pura, na presença de determinado composto teste. Caso este atue sobre a cultura de células promovendo morte celular, não há células viáveis, a reação da resazurina com a enzima não ocorre e, portanto, a amostra permanece com a coloração azul. Se o composto testado não tem efeito sobre as bactérias, então a resazurina é reduzida para resofurina (cor rosa) (THOMSON *et al.*, 1986; BROUWER, 1991). De acordo com Holetz e colaboradores (2002), considera-se indicativo de atividade antibacteriana/fúngica significativa valores abaixo de 100 µg/mL.

Figura 31 Conversão do composto 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido (resazurina) em resofurina pela enzima NADPH desidrogenase.



Fonte: Autora (Adaptado de BROUWER, 1991).

4.6 Biofilme estático e quantificação de células viáveis por fluorescência

Para este estudo foi utilizado corpos de prova de aço inoxidável, lavados e esterilizados em luz UV por 20 minutos, uma vez que as bactérias apresentarem rápida formação de biofilme nesse material (MITTELMAN, 1985). O aço inoxidável é uma liga composta por ferro e cromo,

sendo este último susceptível a passivação com a formação de uma camada de óxido de cromo, responsável pela hidrofobicidade e resistência a corrosão desse material. Durante o processo de adesão inicial para a formação do biofilme, quanto mais hidrofóbica a célula (em virtude dos fatores de virulência, eletronegatividade em função de grupos funcionais polares e membrana externa) mais facilmente a mesma irá se ligar a superfície (BOARI *et al.*, 2009).

Após esterilização, os corpos de prova foram colocados em placas para cultura de células de 24 poços, imersos em BHI + inóculo bacteriano padronizado para 0,5 da Escala de Mcfarland. Neste experimento foi testado o composto tioacetato tiol, quinona mais bioativa da classe 2 frente a *S. aureus*. Grupos com três discos de aço inoxidável foram tratados previamente com as soluções contendo a quinona antes de serem submetidos ao meio com inóculo padronizado para formação de biofilme. Em outros grupos também contendo três corpos de prova cada, já com o biofilme formado foram coletados das placas de cultura de célula e expostos a quinona em diferentes concentrações.

Os corpos de prova foram então submetidos à imersão suave em solução salina por 0,9%, transferidos para tubos de polipropileno contendo mesma solução e, em seguida, sonicados para remoção do biofilme aderido à superfícies do aço inox. A solução contendo o biofilme foi homogeneizada e quantificada por fluorescência, usando reagentes específicos para determinação de viabilidade celular (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L13152).

As análises do biofilme decorreram em função de uma curva de calibração com 5 pontos a partir de um inóculo previamente preparado (em BHI e incubando por 48 horas a 37°C). Encerrado o período de crescimento, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as massas bacterianas foram resuspensas em solução salina 0,9%. Dois tubos de polipropileno advindos desse processo foram reservados e um deles recebeu solução salina a 0,9% enquanto ao outro foi adicionado álcool isopropílico a 70% para promoção de morte celular.

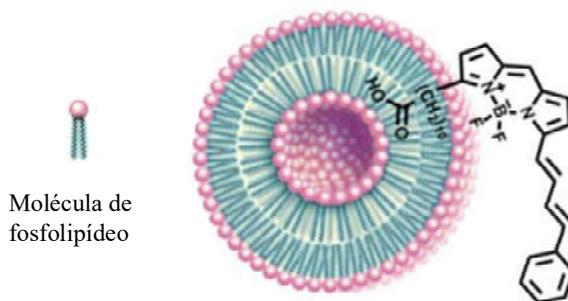
As amostras foram incubadas por 1 h em estufa, centrifugadas novamente nas mesmas condições, descartado o sobrenadante e a massa bacteriana resuspensa em de solução salina a 0,9%. O inóculo foi padronizado para 0,5 na Escala de McFarland para a realização da curva de calibração, fazendo-se uma combinação entre bactérias vivas e mortas, em diferentes volumes (concentrações de 0%, 20%, 50%, 80% e 100% de bactérias vivas). A leitura foi realizada em microplaca preta apropriada para fluorescência (FLUOTRAC™) sendo adicionado, para cada poço de leitura, uma mistura de SYTO® 9 e iodeto de propídeo na

proporção de 1:1 (Kit para Viabilidade Bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™), preparado segundo as instruções do fabricante. A placa foi coberta com alumínio para evitar exposição à luz por cerca de 10 minutos antes de se fazer a leitura (FILOCHE *et al.*, 2010).

4.7 Peroxidação lipídica

O método da peroxidação lipídica fundamenta-se no decaimento da fluorescência emitida por uma sonda ancorada a um lipossomo (**Figura 32**) (KAROLIN *et al.*, 1994) quando a mesma é submetida ao ataque de uma espécie reativa (MACDONALD *et al.*, 2007; FERREIRA, 2013). Segundo Drummen e colaboradores (2002), lipossomas de fosfatidilcolina de soja (6- 8 % de insaturações) são preparados, com o intuito de simular uma membrana celular. Nesta preparação, é adicionada uma sonda fluorescente e, através de seu monitoramento, obtêm-se informações sobre a integridade da membrana. O azo composto AAPH foi utilizado como gerador de radical peroxila. Através deste estudo, é possível verificar a capacidade de uma amostra inibir a peroxidação lipídica frente ao radical peroxila. Gerador de radicais livres, o AAPH sofre termólise gerando radicais alquila e nitrogênio molecular os quais podem reagir com oxigênio molecular formando radicais peroxila (ZULUETA *et al.*, 2009; FERREIRA, 2013). As quinonas estudadas neste caso pertencem a classe 8.

Figura 32 Sonda fluorescente C11- Bodipy^{581/591} ancorada a um lipossoma.



Fonte: Autora (adaptado de Enciclopédia Britannica, 2007; FERREIRA, 2013).

4.7.1 Preparo do tampão fosfato pH 7,4 (50 mmol L⁻¹)

Pesou-se 0,163 g de fosfato de sódio monobásico (mono-hidratado), 1,357 g de fosfato de sódio dibásico (hepta-hidratado) e 7,31mg de EDTA. Em seguida, solubilizou-se em água

destilada completando o volume para 250mL. A correção do pH foi realizada com fosfato de sódio monobásico quando o valor de pH excedeu 7,4 ou fosfato de sódio bibásico quando ocorreu situação inversa.

4.7.2 Preparo da solução diluída da sonda C11- Bodipy^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico ácido- Molecular Probes)

Adicionou-se 10 µL de DMSO à sonda em pó e, após completa solubilização da mesma, adicionou-se 999 µL de DMSO a uma alíquota de 1 µL, sendo esta segunda solução estocada em geladeira, para posterior uso.

4.7.3 Preparo dos lipossomas multilamelares com L- α -fosfatidicolina (Lecitina de soja- PC)-R1A-039

Para o preparo dos lipossomas foi necessário pesar 9,4 mg de lecitina de soja e solubilizar essa massa em 10 mL de tampão fosfato. Em seguida, o lipídeo solubilizado foi submetido a 30 min de banho de ultrassom em aproximadamente 50 °C de temperatura sendo agitado em vórtex a cada intervalo de 10 min. Ao fim deste processo lipossomas multilamelares são obtidas, os quais devem ser submetidos à etapa de extrusão para formar lipossomas unilamelares.

4.7.4 Extrusão de lipossomas multilamelares

Após limpeza das seringas e das peças da extrusora (Avanti Polar Lipids®), esta deve ser montada e só então uma das seringas deve ser preenchida com lipossoma (1 mL) e, em seguida, esse volume deve ser pressionado a fim de passar por uma membrana de poros com 100 nm de diâmetro, segundo descrito por MacDonald e colaboradores (1991) em um processo que deve ser repetido 15 vezes, tendo-se, ao final do mesmo, lipossomas unilamelares com 120 nm de diâmetro. Em seguida, deve-se adicionar 5 µL da sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} diluída para cada 1 mL de lipossoma previamente preparado, agitando-se esta suspensão em vórtex para que a sonda (10^{-7} mol L⁻¹) possa ser incorporada ao lipossoma (DRUMMEN *et al.*, 2002). Essa suspensão foi armazenada em refrigerador ao abrigo de luz e utilizada por no máximo dois dias.

4.7.5 Preparo do AAPH/ABAP (2, 2'-azobis (2- metilpropionamida) di-hidrocloro): gerador de radical peroxila

O preparo de AAPH/ABAP consistiu em pesar 27 mg de AAPH e adicionar 1 mL de tampão pH 7,4 (50 mmol L⁻¹) previamente preparado. Esta solução deve ser mantida ao abrigo de luz e sob baixa temperatura para evitar sua decomposição.

4.7.6 Preparo do Trolox para a curva padrão

Para tal, pesa-se em eppendorff, 0,25 mg de Trolox e adiciona-se 1,0 mL de tampão fosfato pH 7,4 (50 mmol L⁻¹). Em seguida, retira-se desta solução inicial uma alíquota de 100 µL, e adicionam-se 900 µL de tampão, perfazendo 1000 µL (100 µmol L⁻¹).

4.7.7 Monitoramento da peroxidação lipídica

Foram preparadas soluções em DMSO das amostras pertencentes à classe 8 (10 µM), do trolox (controle positivo) (1 µmol L⁻¹) e do AAPH em tampão fosfato (100 mmol L⁻¹) e mantidas protegidas da luz, sob refrigeração. Em seguida, foram adicionados, em uma cubeta, 800 µL dos lipossomas com a sonda, 50 µL de tampão fosfato pH 7,4 e 50 µL da amostra ou trolox. As medidas de fluorescência foram realizadas a 37 °C usando um espectrofotômetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão). Para o início da reação, 100 µL do AAPH foram adicionados, completando o volume para 1 mL. A medida do decaimento ($\lambda_{excitação} = 580 \text{ nm}$, $\lambda_{emissão} = 600 \text{ nm}$) da fluorescência foi feita em uma cinética de 30 minutos. Foi utilizada como branco uma solução de 800 µL do lipossoma com a sonda, 100 µL do tampão e 100 µL do AAPH.

4.8 Investigação da Interação com DNA por Espectroscopia de Absorção (titulação no UV-Vis)

Inicialmente, a fim de avaliar a interação entre as quinonas das subclasses 1.3, 3.2, 4.1, 5.1, 7.1 e 8.1 e a molécula de DNA, foram realizados ensaios de espectroscopia de absorção UV-Vis, utilizando DNA de timo de bezerro (Calf Thymus).

4.8.1 Preparo do tampão Tris- HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4)

Pesou-se 1,576 g de Trizma e em seguida, solubilizou-se em água destilada completando o volume para 100 mL. A correção do pH foi realizada com NaOH para que o mesmo atingisse o valor 7,4.

4.8.2 Preparo do gel de ctDNA

O gel de ctDNA foi preparado segundo a metodologia já descrita por Janjua e colaboradores (2011), Saito e colaboradores (2012) e Agarwal e colaboradores (2013), realizando-se a dissolução de 12 mg em 1 mL de ctDNA em tampão acetato 1,0 mol L⁻¹ (pH 4,5). O ctDNA em tampão foi mantido sob refrigeração a 8 °C durante 24 h, agitando-se em intervalos determinados, para garantir a homogeneidade do gel.

4.8.3 Titulação espectroscópica

A literatura recomenda a análise prévia do ctDNA utilizado nos experimentos a fim de garantir que o mesmo está puro e isento de contaminantes como sais e compostos orgânicos. Para tal, avalia-se a razão das absorvâncias nos comprimentos 260nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e a razão das absorvâncias 260nm e 230 nm (A_{260}/A_{230}) com resultados esperados, respectivamente, 1,8-1,9 e valor inferior a 2 (REICHMANN *et al.*, 1954; HEGDE *et al.*, 2012). O DNA utilizado estava dentro das características consideradas apropriadas para tais estudos.

A concentração da solução estoque de ctDNA foi determinada com base no coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), no máximo de absorção em 260 nm (MAHLER *et al.*, 1964; KANAKIS *et al.*, 2009; SAVARIZ *et al.*, 2014) empregando-se a lei de Lambert-Beer,

$$A_0 = \epsilon \cdot l \cdot D_t$$

sendo:

A_0 = absorvância;

ϵ = coeficiente de extinção molar ($\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l = percurso ótico (cm)

D_t = concentração da amostra (mol L^{-1})

A constante de ligação K_b do complexo quinona-DNA foi calculada espectrofotometricamente, aplicando a equação de Benesi-Hildebrand (ARSHAD *et al.*, 2013):

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_L}{\varepsilon_{L-DNA} - \varepsilon_L} + \frac{\varepsilon_L}{\varepsilon_{L-DNA} - \varepsilon_L} \cdot \frac{1}{K_b [DNA]}$$

em que A_0 e A é a absorvância do ligante livre e ligado, ε_L é o coeficiente de absorvância molar do ligante livre, ε_{L-DNA} é o coeficiente de absorvância molar do complexo, K_b a constante de ligação e $[DNA]$ a concentração de DNA em $\mu\text{mol L}^{-1}$. O gráfico gerado pela relação de $A_0/A - A_0$ vs. $1/[DNA]$ é linear e a constante de ligação pode ser estimada a partir do coeficientes angular e linear da reta.

Para este experimento, previamente foram feitas soluções estoque das quinonas a 1 mmol^{-1} em DMSO sendo todas as amostras submetidas a teste de estabilidade antes da titulação com DNA.

A constante de ligação também pode ser avaliada por outros modelos matemáticos, além do supracitado como o método de Wolfe-Shimmer, Benesi-Hildebrand modificada, Scott e Scatchard (VIJAN *et al.*, 2008). A equação de Benesi-Hildebrand foi eleita no trabalho dada a vasta citação na literatura e fácil aplicação no tratamento dos dados.

4.9 Investigação da Interação ctDNA- ligante por fluorescência

O potencial de interação de um determinado composto com o DNA pode ser avaliado quantitativamente através da titulação fluorimétrica. Quando o composto é fluorescente, a interação com DNA se dá pela simples adição deste em solução e monitorização da intensidade de fluorescência emitida pelo complexo em solução. Entretanto, compostos não fluorescentes necessitam de sondas fluorescentes. Neste trabalho o brometo de etídio (BE), intercalador clássico é utilizado como sonda. A fluorescência do BE aumenta cerca de 30 vezes na presença de DNA, como consequência da forte intercalação que ocorre, o presente estudo avalia o potencial das quinonas em deslocar o BE de seu sítio de interação com o DNA (LEPECQ *et al.*, 1967; SILVA *et al.*, 2013; BARRA *et al.*, 2015).

Os experimentos de fluorescência foram realizados em espectrofotômetro RF- 5301PC (Shimadzu, Japão). A concentração da solução estoque de ctDNA foi inicialmente determinada no UV-Vis e uma solução de BE foi preparada, ambos em tampão Triz-HCl (pH 7,4), de modo

que, tanto o ct-DNA como o BE estivessem à 1 mmol L⁻¹ na cubeta. As amostras foram previamente solubilizadas em DMSO e a concentração das mesmas na solução contendo ctDNA e BE variou de 5 a 50 µmol L⁻¹, um tempo de interação de 15 minutos foi respeitado antes de cada leitura (SILVA *et al.*, 2013). A concentração de DMSO em todas as análises não ultrapassou 4% e as medidas foram realizadas em cinco diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35 e 40 °C). Os espectros foram gerados a partir de adições crescentes das quinonas.

4.10 Estudos computacionais

4.10.1 Cálculos estruturais eletrônicos e análise de sítios de captura de elétrons

Esse estudo foi direcionado apenas para as nitroquinonas ESNJ104 e ESNJ110 (classe 5). Inicialmente, esses compostos tiveram suas estruturas desenhadas utilizando o programa GaussView 5.0 (DENNINGTON *et al.*, 2009) e, em seguida, foram submetidos a uma pré-otimização de geometria utilizando o funcional M06-2X e o conjunto de base 6-31G utilizando o programa Gaussian 09 com o propósito de obter uma estrutura de mínimo conformacional de menor energia, a qual foi utilizada para as etapas posteriores de otimização e frequência. Em seguida, realizou-se a escolha do funcional ML11 L para as etapas de otimização e frequência e o grupo de funções de base 6-31+G (d, p). O efeito do solvente (DMF) foi considerado de forma implícita através do modelo contínuo PCM (TOMASI *et al.*, 2005).

4.10.2 QSAR

O conjunto de dados selecionados para essa etapa contou com 15 quinonas, que apresentam atividades biológicas *in vitro* frente a *Trypanosoma cruzi*. Os valores de atividade biológica das quinonas estudadas nesse trabalho e já publicadas pelos grupos dos Profs. Dr. Eufrânio Nunes (DIOGO *et al.*, 2013) e Dr. Vítor Ferreira foram medidos sob as mesmas condições experimentais e estão distribuídos entre os valores de 9,2 µM e 359,2 µM, requisitos importantes para que sejam dados apropriados para estudos de QSAR. Foram propostos dois modelos relacionados à atividade biológica sendo as estruturas otimizadas na ausência e presença de solvente DMF. As quinonas com o conjunto de dados referentes a valores das atividades biológicas estão apresentados a seguir (**Tabela 03**).

Tabela 03 Quinonas com atividade biológica in vitro frente a Trypanosoma cruzi pertencentes ao estudo de QSAR (valores de atividade biológica já publicados) (DIOGO *et al.*, 2013 e CARDOSO *et al.*, 2015).

Entrada	QUINONA	pIC ₅₀	Entrada	QUINONA	pIC ₅₀
1	PW49	4,962	9	4- Flúor tiol	4,490
2	PW65	4,346	10	Tiofenol	5,036
3	ESNJ101	4,092	11	4- Cloro tiol	3,800
4	ESNJ85	4,661	12	Metóxi tiol	4,225
5	ESNJ87	4,402	13	4- Metil tiol	4,077
6	ESNJ59	4,761	14	3- Metil tiol	3,783
7	ESNJ13	4,681	15	Pentafluor tiol	3,738
8	ESNJ58	3,444			

Fonte: Autora.

Inicialmente esses compostos tiveram suas estruturas desenhadas, utilizando o programa Gauss View 5.0 (DENNINGTON *et al.*, 2009), submetidos a uma pré-otimização de geometria em nível AM1 e, em seguida, em nível de DFT (utilizando o funcional M06- 2X e conjunto de bases 6-311+g(d,p), com auxílio do programa Gaussian 09 (FRISCH *et al.*, 2009). Os autovalores de frequências vibracionais foram cuidadosamente observados para que não houvesse frequências imaginárias, para garantir, assim, a obtenção de um mínimo de energia.

Em sequência, foram calculados diversos descritores eletrônicos e estruturais, tais como energias dos orbitais de fronteira, momento dipolar, polarizabilidade dentre outros que pudessem ser relacionados às atividades biológicas apresentados pelos compostos em estudo. O cálculo dos descritores topológicos 2D e 3D foram feitos na plataforma online E-Dragon (TETKO *et al.*, 2005).

A próxima etapa foi a seleção dos descritores utilizando o método OPS (*Ordered Predictor Selection*), a fim de selecionar os descritores mais significativos para a construção do modelo. O método quimiométrico de regressão PLS (*Partial Least Squares*) foi empregado na construção de modelos que descrevam quantitativamente a relação entre os descritores e as atividades biológicas. Essa etapa foi realizada utilizando os programas QSAR-modeling (MARTINS *et al.*, 2009) e Pirouette 3.11 (INFORMETRIX, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Meio Aprótico

5.1.1 Estudo eletroquímicos em meio aprótico: Aspectos gerais

A influência dos grupos substituintes na distribuição da densidade eletrônica nos compostos químicos aos quais estão ligados interfere no potencial de redução dos mesmos, bem como na estabilidade das espécies eletrogeradas. O efeito de grupos substituintes e sua posição em uma série de substâncias derivadas de um mesmo núcleo podem ser relacionados aos parâmetros eletroquímicos (GOULART *et al.*, 1997), pois qualitativamente, a presença de grupos eletrodoadores dificulta o processo de redução, pois aumentam a energia do LUMO ao passo que grupos eletrorretiradores facilitam este processo (PAULA *et al.*, 2006), por diminuir a energia deste orbital. O substituinte em posição *orto* deve ser avaliado com mais cautela em função da possibilidade de outros efeitos além das interações usuais como, por exemplo, interações estéricas, efeitos de campo e ligações de hidrogênio (CAREY *et al.*, 2007; THOMAS, 2007).

A equação de Hammet é muito útil em eletroquímica para avaliar o efeito das interações eletrônicas que os substituintes exercem, alterando as energias relativas entre reagentes e produtos eletrogerados e conseqüentemente influenciando a termodinâmica do processo. A constante de Hammett (σ) representa os diferentes efeitos que os substituintes podem exercer no caráter eletrônico de um sistema aromático, caracterizando os substituintes como eletrodoadores ou eletrorretiradores, os quais facilitarão ou dificultarão o processo, a depender da reação em questão (CAREY *et al.*, 2007).

Como já mencionado, a redução das quinonas bem como a formação e estabilização dos intermediários eletrogerados são processos fortemente dependentes do ambiente molecular. Esse fato pode estar relacionado ao somatório dos efeitos estruturais e ao solvente na estabilização desse grupo eletroativo quando do processo de redução. Sturm e colaboradores (2001) e Núñez- Vergara e colaboradores (2001) observaram, em meio aprótico, a influência eletrônica do substituinte nitro, considerando apenas os efeitos intrínsecos, em diferentes posições no anel benzênico de uma série de isômeros 1,4-di-hidropiridinas, em relação ao potencial de redução. Os mesmos perceberam a ocorrência de potenciais de redução mais negativos para o isômero *orto* em relação aos derivados *meta* e *para* correspondentes. Neste caso, as distorções de coplanariedade do grupo nitro, quando em posição *orto*, em virtude do substituinte 1,4-DHP, diminui a interação por ressonância e, portanto, o isômero *orto* apresenta

potencial de redução mais negativo quando comparado aos demais da série. Fato semelhante foi observado por Paiva e colaboradores (2012) para uma série de isômeros *orto*, *meta* e *para*-nitroaromáticos. É possível considerar, em análises qualitativas realizadas em solventes apolares ou pouco polares, apenas os fatores intrínsecos (estruturais) (CAREY *et al.*, 2007) na formação e estabilização dos intermediários eletrogerados. Sabe-se que os efeitos eletrônicos são mais sentidos nesses intermediários do que nos compostos de partida, sendo possível compreender a facilidade de redução em decorrência da maior estabilidade dos intermediários formados eletroquimicamente.

As quinonas, do presente trabalho, foram divididas em classes de acordo com suas características estruturais (**Tabela 01**) sendo que, em alguns casos, escolheu-se a análise em meio aprótico de apenas um dos compostos da classe em função da similaridade comportamental entre a quinona escolhida e os demais membros da classe em que a mesma está inserida:

- ✓ Classe 1: derivadas da nor- β -lapachona, ostentando heterociclos triazólicos diferentemente substituídos;

- ✓ Classe 2: derivadas da nor- β -lapachona portadoras de um núcleo de enxofre diretamente ligado ao anel diidrofurânico;

- ✓ Classe 3: 1,4-naftoquinonas ostentando heterociclos triazólicos diferentemente substituídos;

- ✓ Classe 4: derivados da nor- α -lapachona (1,4-naftoquinonadiidrofurano), ostentando heterociclos triazólicos diferentemente substituídos;

- ✓ Classe 5: derivados de α -lapachona (1,4-naftoquinonadiidropirano) portadoras da função amina não conjugada ao núcleo quinônico;

- ✓ Classe 6: 1-azaantracenos-2,9,10-trionas ariladas;

- ✓ Classe 7: derivados de α -lapachona ostentando heterociclos triazólicos diferentemente substituídos.

- ✓ Classe 8: não foi avaliada neste trabalho do ponto de vista eletroquímico, devido ao número grande de quinonas diferentes pertencentes a mesma.

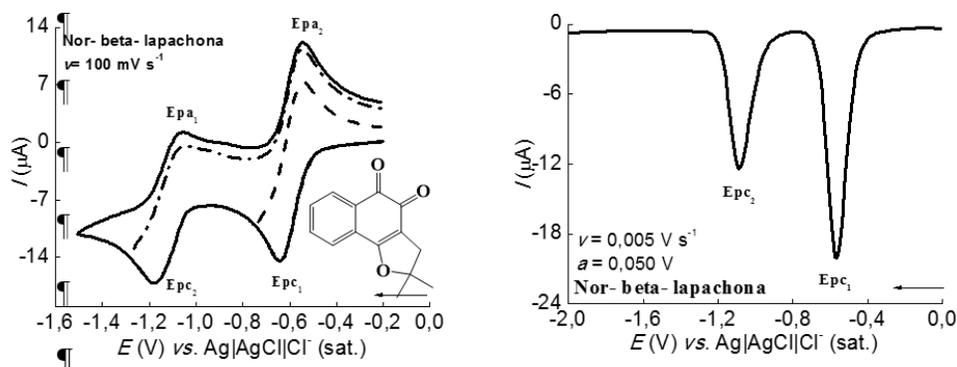
CLASSE 1

A nor- β -lapachona é a quinona-base cujas modificações estruturais geraram as demais *orto*-quinonas estudadas na classe 1, cuja estratégia consistiu na inserção de vários grupamentos

na posição 3 do anel diidrofuranonaftoquinônico dessa quinona base, juntamente com um anel triazólico.

A nor- β -lapachona apresenta o comportamento eletroquímico típico do grupo quinona em meio aprótico, com duas ondas de redução monoelétrônicas sequenciais, totalizando o consumo de dois elétrons ao fim do processo redutivo (DE ABREU *et al.*, 2005). A primeira etapa de redução ($E_{pc1} = -0,646$ V) apresenta características de reversibilidade, em que a entrada de um elétron ao grupo quinonóide gera o ânion radical quinônico ($Q^{\cdot-}$), também conhecido como semiquinona, o qual é oxidado em varredura reversa, para a quinona original. O segundo processo de redução, também monoelétrônico, resulta na formação do diânion quinônico (Q^{2-}), ($E_{pc2} = -1,180$ V), em processo quase-reversível (**Figura 33**).

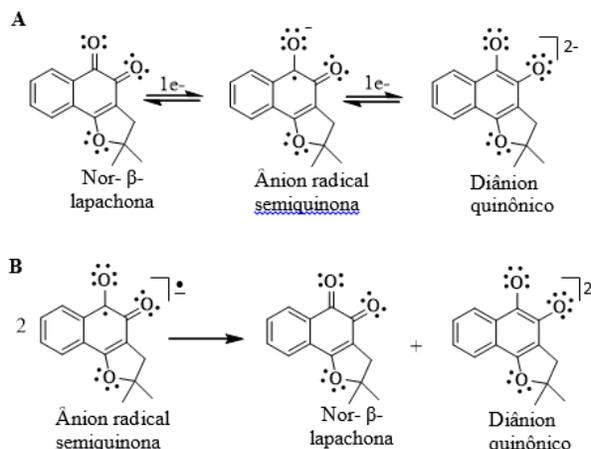
Figura 33 Voltamograma cíclico (VC) e de pulso diferencial (VPD) da nor- β -lapachona (1×10^{-3} mol L $^{-1}$) em meio aprótico (DMF/TBAP 0,1 mol L $^{-1}$), $\nu = 0,100$ V s $^{-1}$.



Fonte: Autora.

A menor reversibilidade do diânion, está relacionada a sua maior basicidade em relação a semiquinona que o originou, sendo esta mais suscetível a reações químicas acopladas, como por exemplo, desproporcionamento (CRAWFORD *et al.*, 1996; SOUZA, 2011). Em tal processo, o ânion radical semiquinona ($Q^{\cdot-}$) desproporciona, levando à formação da quinona de origem (Q) e do diânion quinônico (Q^{2-}) (**Figura 34B**). Tais observações também foram relatadas por Souza (2011). O voltamograma de pulso diferencial evidencia a formação dos mesmos produtos de redução já mencionados para a técnica de voltametria cíclica, com a presença de dois picos E_{pc1} e E_{pc2} , respectivamente $-0,57$ V e $-1,088$ V. A racionalização mecanística do processo de redução em duas etapas para esta quinona, em meio aprótico, segue abaixo (**Figura 34A**).

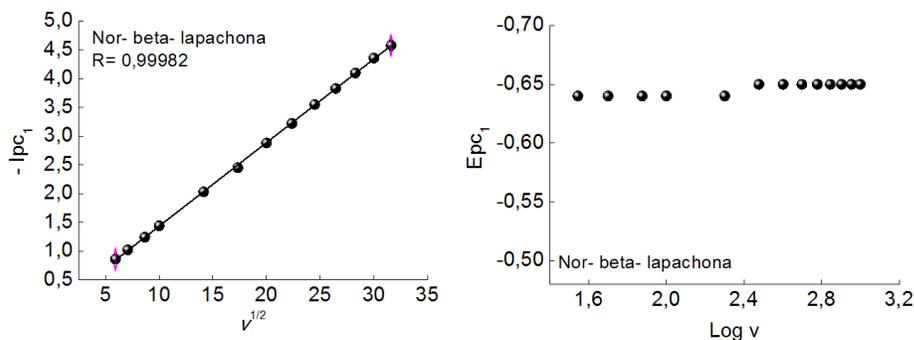
Figura 34 Racionalização mecânica do processo de redução em duas etapas para a nor- β -lapachona (A) e para o processo de desproporcionamento, referente ao seu ânion radical semiquinona (B).



Fonte: Autora.

Os gráficos diagnósticos de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura para E_{pc1} e análise do potencial de redução de primeira onda, em função do log da velocidade de varredura indicam respectivamente, um transporte de massa de natureza difusional e reversibilidade para a primeira redução (**Figura 35**).

Figura 35 Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $v^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹) para nor- β -lapachona.



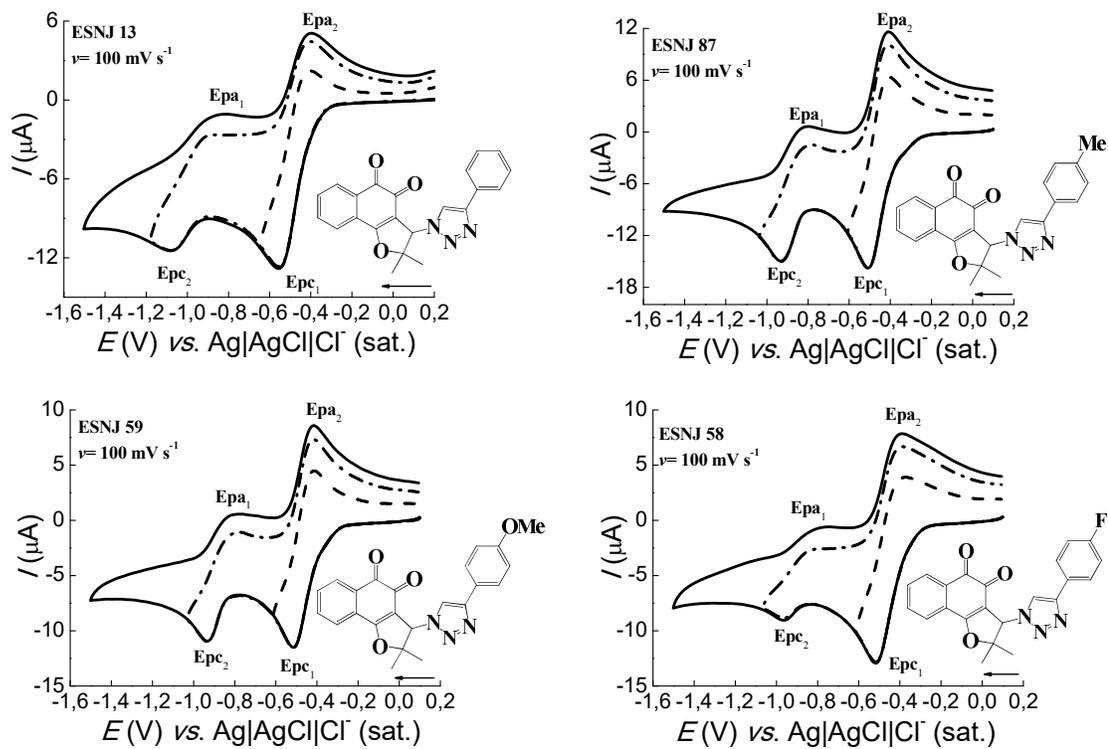
Fonte: Autora.

As quinonas desta classe (exceto as que possuem grupo nitro e átomo de selênio em sua estrutura) apresentaram comportamento eletroquímico típico em meio aprótico, já comentado acima para a nor- β -lapachona, com duas ondas de redução monoelétrônicas (**Figura 33**). Apesar da ausência de interação estrutural conjugativa entre o sistema quinônico e o anel

triazólico, a inserção deste (ESNJ113 e derivados) influenciou no comportamento voltamétrico através do deslocamento de potenciais de redução. O segundo processo redutivo relacionado à formação do diânion quinônico no caso do composto fluorado apresentou menor característica de reversibilidade comparado aos demais. Segundo Souza (2011), a menor intensidade de corrente da onda E_{pc2} , pouco mais da metade da corrente observada em E_{pc1} , é indicativo da presença de reações químicas subseqüentes à formação da semiquinona, que tem sua concentração reduzida na dupla camada elétrica da superfície eletródica. Um possível mecanismo seria o desproporcionamento (**Figura 34B**). Os gráficos diagnósticos indicam transporte de massa de natureza difusional e reversibilidade para a primeira etapa de redução.

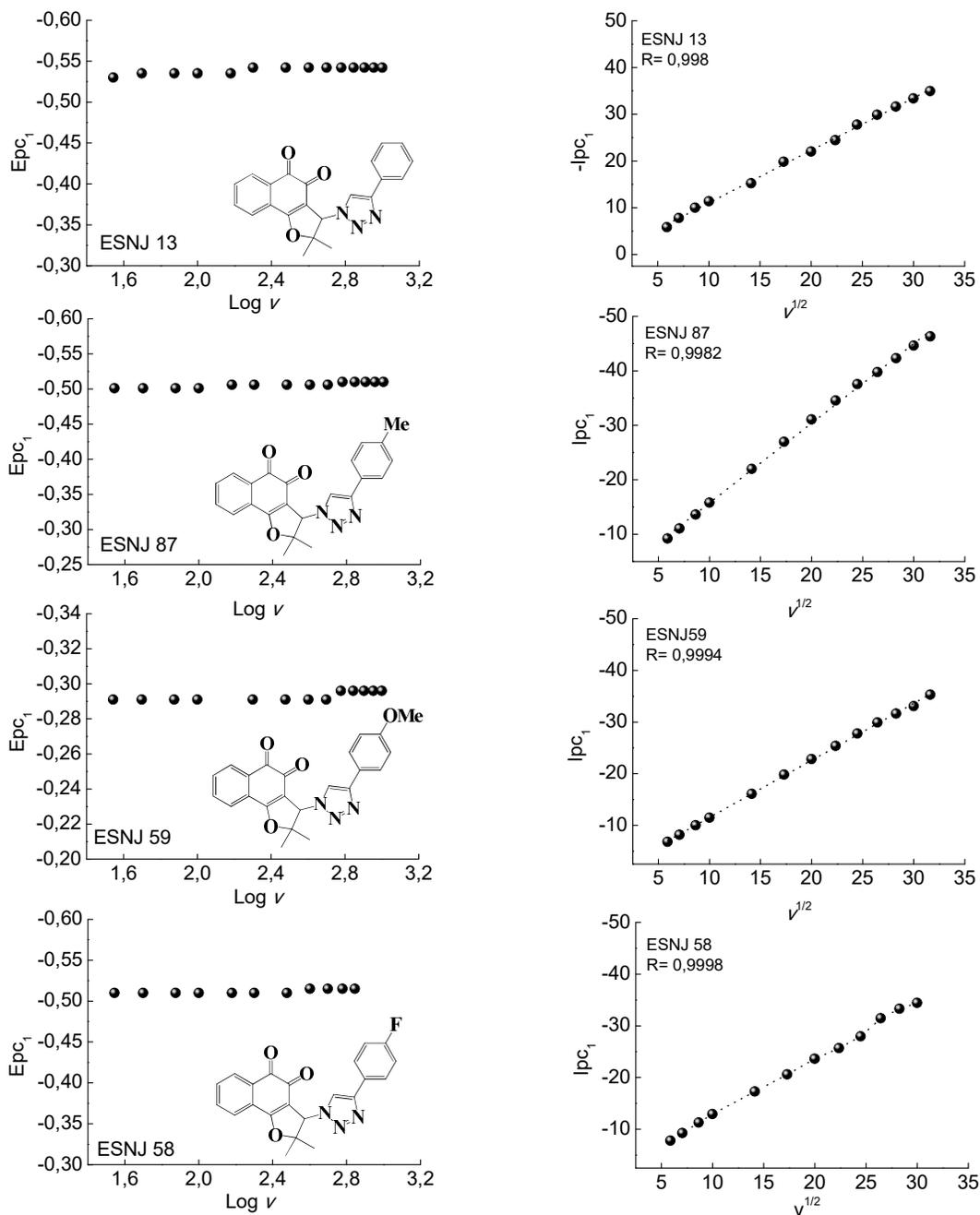
No caso da redução das quatro quinonas abaixo, a característica eletroatraente facilitará a redução, por reduzir a energia do LUMO. Os valores de σ permitem prever a ordem de redução (E_{pc1}) das mesmas de acordo com os substituintes, embora as diferenças sejam muito pequenas: valores de constante $\sigma_F = 0,06 > \sigma_H = 0 > \sigma_{Me} = -0,17 > \sigma_{OMe} = -0,28$, o que corrobora com os dados obtidos: ESNJ58 (F) ($E_{pc1} = -0,510$ V) > ESNJ 13 (H) ($E_{pc1} = -0,515$ V) > ESNJ59 (OMe) ($E_{pc1} = -0,520$ V) > ESNJ87 (Me) ($E_{pc1} = -0,556$ V). Em seguida os gráficos diagnósticos, os quais indicam semelhante comportamento já observado para a nor- β -lapachona (**Figura 36**).

Figura 36 Voltamogramas cíclicos dos derivados da nor- β -lapachona ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pertencentes a classe 1 em meio aprótico (DMF/ TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora.

Figura 37 Análise da corrente de pico (I_{pc_1}), para a primeira onda de redução dos derivados da nor- β -lapachona em função de $v^{1/2}$ e respectivos gráficos de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹).



Fonte: Autora.

Os compostos com grupamento nitro em sua estrutura apresentaram maior facilidade de redução em relação à nor- β -lapachona ($E_{pc_{1orto}} = -0,579$ V, $E_{pc_{1meta}} = -0,567$ V; $E_{pc_{1para}} = -0,552$ V), sendo o isômero *para*, o mais facilmente reduzido. Essa facilidade se dá em função

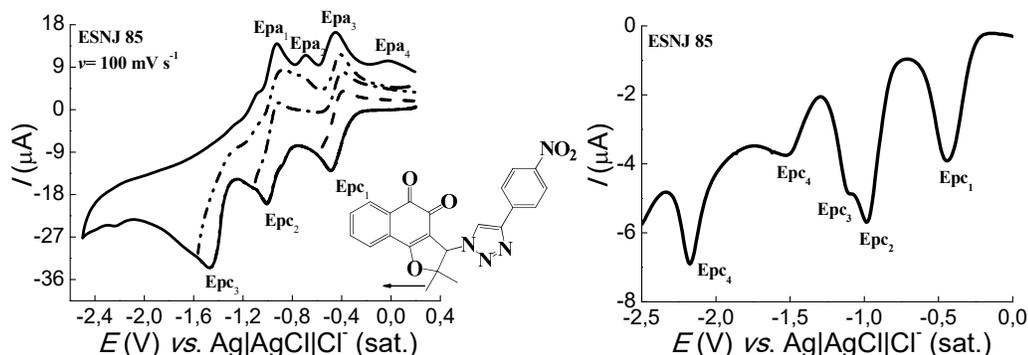
do efeito do grupo nitro eletroatraente, mesmo em ausência de efeito mesomérico, devido à ausência de conjugação. Quando o grupo nitro está em posição *para* gera uma estrutura canônica em que a carga positiva está no carbono α do anel aromático, estabilizando mais eficientemente o intermediário eletrogerado após a primeira redução do que estando este grupo em posição *meta*, facilitando a redução do composto *para* nitroquinona em relação ao seu isômero. No caso deste grupo *orto* posicionado, a proximidade entre o grupo quinona e o grupo nitro favorece uma perda de coplanaridade que se reflete na diminuição da interação por ressonância existente entre este e o anel aromático ao qual está ligado (BROUDE *et al.*, 1955). Interações estéricas que resultem em quebra de coplanaridade entre grupos farmacofóricos, em geral, resultam em não reconhecimento molecular por determinado receptor e conseqüentemente, o mecanismo de ação pode ser diferenciado para os compostos *orto*-substituídos em relação aos isômeros de posição, que não interferem na coplanaridade (ABRAHAM, 2009). Além disso, o grupo nitro *orto*-orientado pode permitir a formação de ligação de hidrogênio intramolecular a depender do grupo circunvizinho, o que pode conferir não somente particularidades que se refletem no incremento da atividade biológica como também pode configurar um certo grau de restrição conformacional no composto *orto*-substituído que influencia na interação com determinado ligante. Esse fato é especialmente marcante para o grupo nitro, que embora toxicofórico, confere importantes propriedades físico-químicas aos compostos com atividade biológica, fruto do seu efeito de ressonância potente (BARREIRO *et al.*, 2009; BARREIRO, 2016).

Os voltamogramas para a redução das nitroquinonas apresentaram três ou quatro ondas. Para o composto *para*-substituído, o voltamograma cíclico é caracterizado por três ondas de redução e um ombro intermediário, sugerindo superposição dos processos de redução dos dois grupos eletroativos, nitro e quinona. Souza (2011), em seu trabalho com os isômeros *orto*, *meta* e *para*-nitroquinonas observou que esta última apresentou quatro ondas de redução individualizadas. Em todos os casos, a primeira onda de redução apresenta característica de reversibilidade, como comentado anteriormente para o composto padrão analisado. Em meio aprótico, a primeira etapa de redução do grupo nitro é também monoelétrica e reversível, com a formação do ânion radical nitro. Os voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial seguem abaixo (**Figura 38**).

O transporte de massa até a superfície eletródica é controlado por processo difusional, conforme linearidade entre as correntes de pico catódico (I_{pc1}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Os potenciais de pico catódico, para o primeiro processo de

redução (Epc₁) não apresentaram variação em função do log ν indicando natureza reversível (Figura 39).

Figura 38 Voltamogramas cíclico e de pulso diferencial do composto ESNJ85 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico (DMF/ TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo (Metrohm 3 mm), eletrodo de referência: Ag|AgCl|Cl⁻ e eletrodo auxiliar: fio de platina.



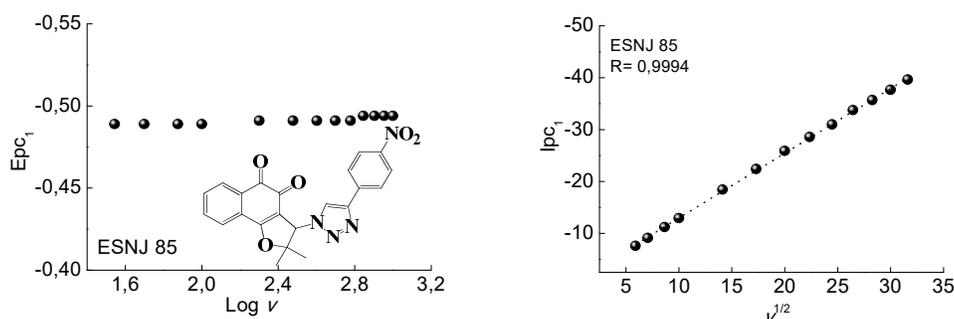
Fonte: Autora.

Nem sempre em compostos com mais de um grupo eletroativo é possível observar todos os processos de redução individualizados. Hernandez e colaboradores (2008) e Armendáriz-Vidales (2014) estudando nitroquinonas com estruturas semelhantes a estas apresentadas aqui, observaram semelhante dificuldade em individualizar os processos, recorrendo a estudos de espectroeletródica, com o emprego da ressonância de spin de elétron para maiores esclarecimentos.

No presente caso da quinona ESNJ85, com grupo *para*-nitroaromático, os processos eletrorredutivos correspondem, na primeira onda, à formação da semiquinona, seguida de uma outra onda catódica, com evidência de ombro (em VPD), relacionada à redução simultânea das funções semiquinona (levando ao diânion aromático) e nitro, formando o ânion radical nitro e, por fim, na última onda, com corrente de pico ligeiramente maior, ocorre a formação de produtos de redução continuada do ânion- radical nitro, processo bem estabelecido na literatura. Um pico anódico intermediário, Epa₄, se torna aparente, quando a varredura é revertida em potencial mais negativo. Este é relativo à oxidação da hidroxilamina, produto da redução do grupo nitroaromático, envolvendo ao todo, 4 elétrons e 4 prótons (no caso, a partir de água residual no solvente ou a partir de desprotonação do eletrólito de suporte). A proposta mecanística segue abaixo:

- (1) $[Q]-PhNO_2 + e^- \rightleftharpoons [Q^{\bullet}]-PhNO_2$
- (2) $[Q^{\bullet}]-PhNO_2 + 2e^- \rightleftharpoons [Q^{2-}]-PhNO_2^{\bullet}$
- (3) $[Q^{2-}]-PhNO_2^{\bullet} + 3e^-/4H^+ \rightarrow [Q^{2-}]-PhNHOH + H_2O$
- (4) $[Q]-PhNHOH - 2e^-/2H^+ \rightarrow [Q]-PhNO$

Figura 39 Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução dos nitroderivados da nor- β -lapachona pertencentes a classe 1 em função de $v^{1/2}$ e respectivos gráficos de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log v$ (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹).



Fonte: Autora.

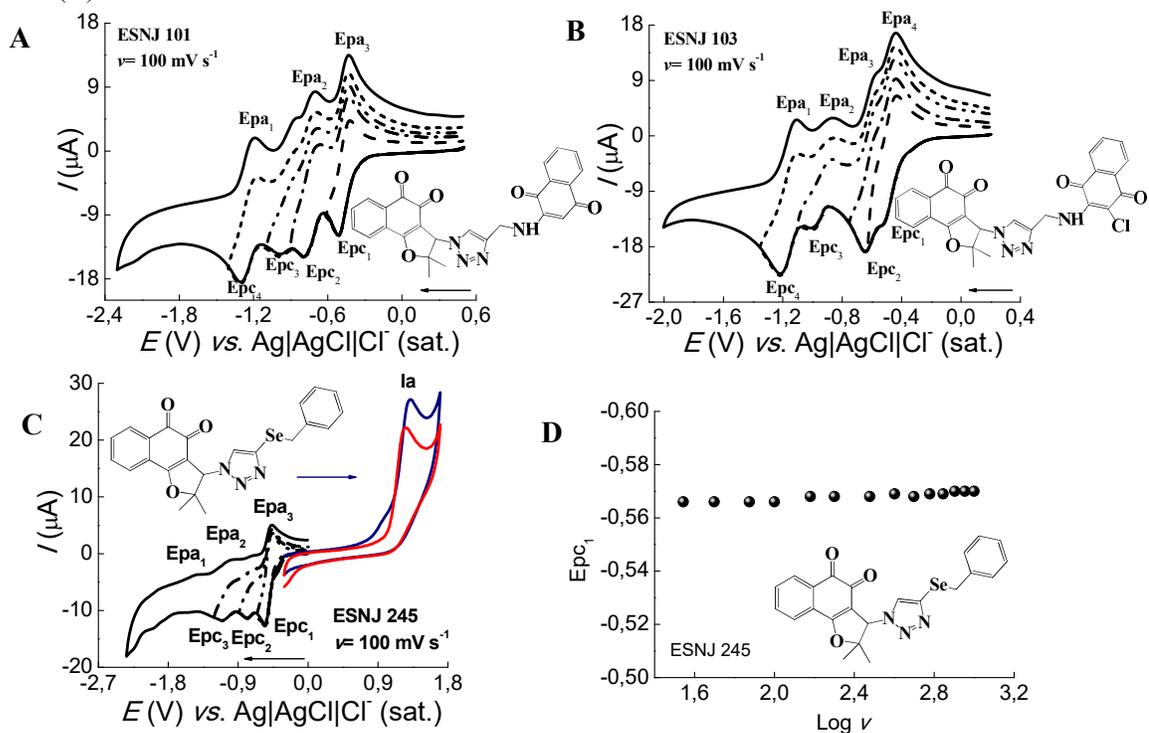
As demais quinonas que compõem esta classe apresentam seus voltamogramas representados abaixo. As duas primeiras (ESNJ101 e ESNJ103) apresentam além da estrutura base da nor- β -lapachona (anel diidrofuranonaftoquinônico), um segundo grupo quinônico (1,4-naftoquinona-3-amino) no extremo oposto da molécula e são distintas entre si apenas pela presença do átomo de cloro. A terceira quinona (ESNJ245) se destaca nesta classe por apresentar um átomo de selênio (**Figura 40**). Com relação às quinonas ESNJ101 e ESNJ103 portadoras de dois sistemas quinônicos, é importante salientar que neste caso irá ocorrer a redução da porção *orto*-naftoquinona mais facilmente em relação à porção *para*-naftoquinona como já bem observado por Tonholo e colaboradores (1998), dessa forma os picos E_{pc1} e E_{pc3} referem-se ao sistema diidrofuranonaftoquinônico e os picos E_{pc2} e E_{pc4} ao sistema 1,4-naftoquinônico. A assimetria eletrônica e a polaridade da ligação carbonílica são maiores em sistemas *orto*-naftoquinônicos em relação às carbonilas dispostas em posição 1,4. Isso se reflete em eletrodeficiência em torno da região carbonílica em sistemas *orto* e por consequência são mais susceptíveis à redução (**Figura 40A e B**).

O primeiro e terceiro picos catódicos para as quinonas ESNJ101 e ESNJ103 apresentam os mesmos valores de potencial ($E_{pc1} = -0,52$ V e $E_{pc3} = -1,00$ V), provavelmente e

respectivamente relacionados à formação do radical semiquinônico e diânion nos sistemas *orto*-quinônicos. Há uma diferença de respectivamente 360 mV e 195 mV entre os picos E_{pc2} [(-0,795 V) ESNJ 101 e (-0,648 V) ESNJ103] e E_{pc3} [(-0,990 V) ESNJ 101 e (-1,007 V) ESNJ 103] em ESNJ 103 e ESNJ 101. Esse fato deve estar relacionado ao átomo de cloro no sistema naftoquinônico que, por ser um grupo eletrorretirador, facilita a entrada do primeiro elétron, por diminuir a energia do LUMO na carbonila em ESNJ103, antecipando a formação desta espécie eletrogerada. O pico E_{pc1} em ESNJ 103 não é bem definido quando comparado a ESNJ101, por estar muito próximo à E_{pc2} .

As propriedades eletroquímicas de selenocompostos se assemelha qualitativamente às dos tiocompostos. Os potenciais redox para esses compostos são fortemente dependentes da estrutura da porção orgânica da molécula, do solvente e do eletrólito de suporte (VIERTLER *et al.*, 2001). O primeiro pico catódico ($E_{pc1} = -0,56$ V) está relacionado a formação do ânion radical semiquinona, sendo de natureza reversível (**Figura 40D**), já o segundo pico é mal definido e alargado talvez em função do desproporcionamento sofrido pela *orto*-semiquinona. Na região anódica, observa-se um pico de alta intensidade de corrente, com praticamente o triplo de intensidade e irreversível ($I_a = 1,32$ V), mesmo em varreduras sucessivas (**Figura 40C**). Segundo Dakova e colaboradores (1994) em meio aprótico em estudos com o composto seleneto de fenil benzila, o primeiro processo monoeletrônico levou a formação do cátion radical selênio passível de sofrer três processos a depender da natureza do calcogênio presente na molécula, do grupamento ligado ao mesmo e do meio: desprotonação, ataque nucleofílico ao calcogênio e clivagem da ligação carbono-calcogênio.

Figura 40 Voltamogramas cíclicos dos demais compostos da classe 1 dos derivados da nor- β -lapachona ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico (DMF/ TBAP ou DMF/ TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹), $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$ (A, B e C). Gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do log ν para composto ESNJ 245 (D).



Fonte: Autora

CLASSE 02

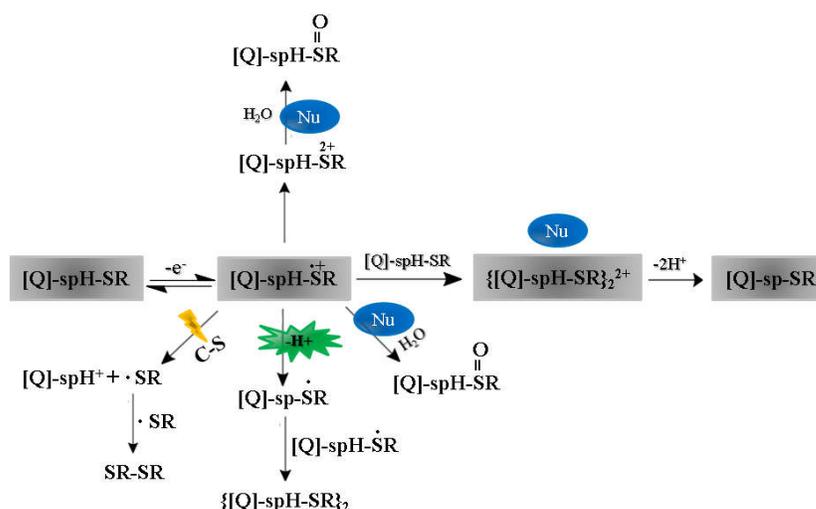
Em virtude da variedade de estados de oxidação, o enxofre mostra uma versatilidade surpreendente. Compostos sulfurados (S^{2-}) são bons nucleófilos em virtude dos pares de elétrons não ligantes (3 sp^3). Tióis reagem com haletos de alquila em presença de base forte originando, por ataque nucleofílico, sulfetos. A química do enxofre é muito importante do ponto de vista biológico, pois este elemento participa da estrutura de aminoácidos (metionina, cisteína e homocisteína), de enzimas (acetil-CoA), coenzimas (centro redox Fe-S da succinato desidrogenase), de vitaminas (B_1 e B_5) e de hormônios. São um dos antioxidantes biológicos não enzimáticos mais importantes, tendo como exemplo, a glutathiona (NELSON *et al.*, 2013).

A literatura não traz muitos exemplos de quinonas contendo núcleos de calcogênios em sua estrutura (GILES *et al.*, 2001; GILES *et al.*, 2003; FRY *et al.*, 2005; SHAABAN *et al.*, 2012; DOERING *et al.*, 2012; DA CRUZ *et al.*, 2014; JARDIM *et al.*, 2015) sendo dois os estudos eletroquímicos em ambiente aprótico (DA CRUZ *et al.*, 2014; JARDIM *et al.*, 2015). Compostos de selênio e enxofre apresentam propriedades comuns pois, a química do enxofre é

semelhante à do selênio. Em geral, compostos organosselenados tendem a ser menos estáveis e mais reativos que os respectivos sulfurados em virtude da ligação C-Se ser mais fraca do que C-S em função da energia do orbital σ_{C-Se} ser menor que σ_{C-S} (REICH *et al.*, 2016).

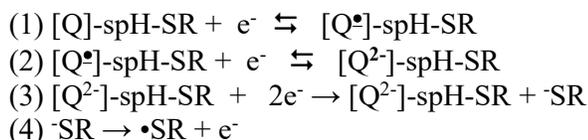
Os produtos da oxidação eletroquímica desses compostos são fortemente dependentes da estrutura do grupo aril-alkil, do meio reacional e do teor de água do solvente (BACIOCCHI *et al.*, 1991; FRANCE *et al.*, 2004) sendo o primeiro a formação do cátion radical o qual pode desprotonar, sofrer clivagem da ligação C-S, ataque nucleofílico no enxofre ou no anel aromático (DAKOVA *et al.*, 1994) (**Figura 41**).

Figura 41 Possíveis produtos de oxidação das calcogenoquinonas em meio aprótico advindos dos processos de desprotonação, clivagem da ligação C-S e ataque nucleofílico (Nu).



Fonte: Autora.

Todas as observações já feitas em relação à redução do grupo quinona são pertinentes a esta classe, composta por 12 representantes, sendo a redução eletroquímica representada por três ondas catódicas, as duas primeiras monoelétrônicas referentes à quinona e a terceira, à quebra da ligação C-S. A redução da ligação C-S ocorre em potenciais bem mais negativos ($E_{pc3} > -2,5$ V) em todos os compostos desta classe, sendo no tiofenol em torno de $-2,7$ V. A proposta mecanística segue abaixo:





Os gráficos diagnósticos de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura para E_{pc1} e análise do potencial de redução de primeira onda em função do log da velocidade de varredura, indicam, respectivamente, transporte de massa de natureza difusional e reversibilidade para a primeira redução.

A ordem de redução vai estar relacionada aos efeitos que os substituintes promovem na estrutura dos compostos dessa classe como já mencionado acima nos aspectos gerais. Esta classe é composta por grupos eletrorretiradores como cloro ($\sigma_{Cl} = 0,22$), flúor ($\sigma_F = 0,06$) e grupos eletrodoadores como *para*-metila ($\sigma_{CH_3} = -0,17$), *meta*- metila ($\sigma_{CH_3} = -0,06$) e metoxila ($\sigma_{OCH_3} = -0,28$), sendo dessa forma ordem de redução para estas quinonas a seguinte (dados da **tabela 04**): AABoc tiol (-0,364 V) < tioacetato (-0,562 V) < pentafluor tiol (-0,579 V) < 4-Flúor tiol (-0,588 V) < 4- Cloro tiol (-0,590 V) < tiofenol (-0,594 V) < 4- Metil tiol (-0,598 V) < 4- metil sulfanil tiol (-0,604 V) < 3 Metil tiol (-0,614 V) < 4 Metoxi tiol (-0,620 V) < Benzil tiol (-0,624 V) < ciclohexano tiol (-0,655 V).

A classe 2 está representada pelo tiofenol, padrão para comparação, por não possuir substituintes. Na região anódica há um pico irreversível ($E_{a1} = +1,30$ V), gerando um produto de oxidação que se reduz em E_{p1} (-0,20 V) e que, por sua vez, é oxidado ($E_{a2} = +0,43$ V) em ciclos sucessivos (**Figura 42**). Na oxidação, é conhecido que substituintes eletrodoadores facilitam o processo, por aumentar a energia do HOMO e favorecer a captura de elétrons.

A ordem de oxidação nesta classe é (do mais facilmente oxidado ao mais dificilmente oxidado): Cicloexano tiol (1,133 V) < 4- Metoxi tiol (1,138 V) < 3- Metil tiol (1,187 V) < 4- Metil tiol (1,204 V) < Benzil tiol (1,211 V) < 4- Cloro tiol (1,200 V) < tioacetato tiol (1,250 V) < 4- Metil sulfanil tiol (1,290 V) < tiofenol (1,300 V) < AA Boc tiol (1,321 V) < 4- Flúor tiol (1,340 V) < pentafluor tiol (1,350 V).

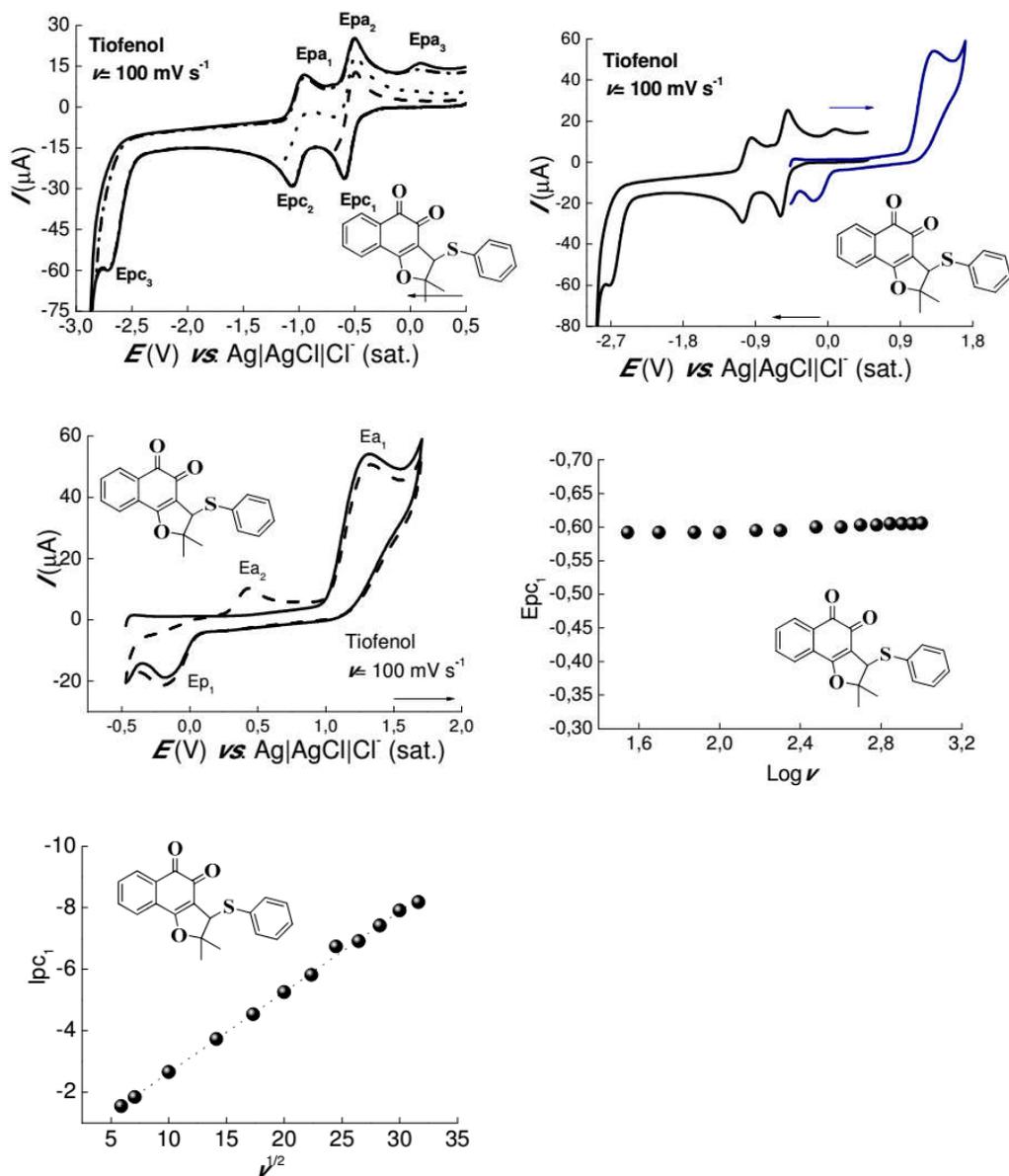
Tabela 04 Parâmetros eletroquímicos, a partir da técnica de voltametria cíclica dos compostos pertencentes a classe 2 em meio aprótico (DMF/ TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹), $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

QUINONAS	Epc ₁ (V)	Epc ₂ (V)	Epc ₃ (V)	Epa ₁ (V)	Epa ₂ (V)	Epa ₃ (V)	Ea ₁ (V)	Ep ₁ (V)	Ea ₂ (V)
AABoc tiol	- 0,364	- 0,558	- 2,184	- 0,815	- 0,410	- 0,144	+ 1,321	- 0,271	-
Tioacetato tiol	- 0,562	- 1,538	- 2,108	- 1,460	- 0,001	+ 0,356	+ 1,250	- 0,231	+ 0,474
Pentafluor tiol	- 0,556	- 1,029	- 2,63	- 0,860	- 0,474	+ 0,242	+ 1,350	- 0,170	+ 0,505
4-Flúor tiol	- 0,588	- 1,073	- 2,700	- 0,949	- 0,500	+ 0,120	+ 1,340	- 0,228	+ 0,492
4-Cloro tiol	- 0,590	- 1,148	- 2,571	- 1,040	- 0,510	- 0,069	+ 1,200	- 0,134	+ 0,441
Tiofenol	- 0,594	- 1,067	- 2,696	- 0,955	- 0,499	+ 0,094	+ 1,300	- 0,167	+ 0,430
4-Metil tiol	- 0,598	- 1,086	- 2,714	- 0,988	- 0,492	+ 0,036	+ 1,204	- 0,286	+ 0,502
4-Metil sulfanil tiol	- 0,604	- 1,166	- 2,618	- 1,069	- 0,517	- 0,061	+ 1,299	- 0,219	+ 0,506
3-Metil tiol	- 0,614	- 1,154	- 2,752	- 1,048	- 0,512	+ 0,010	+ 1,187	- 0,219	+ 0,486
4-Metoxi tiol	- 0,620	- 1,168	- 2,846	- 1,073	- 0,526	- 0,121	+ 1,138	- 0,235	+ 0,459
Benzil tiol	- 0,624	- 1,189	- 2,863	- 1,088	- 0,530	-	+ 1,211	- 0,207	+ 0,456
Cicloexano tiol	- 0,655	- 1,205	- 2,873	- 1,092	- 0,558	-	+ 1,133	- 0,145	+ 0,459

Fonte: Autora.

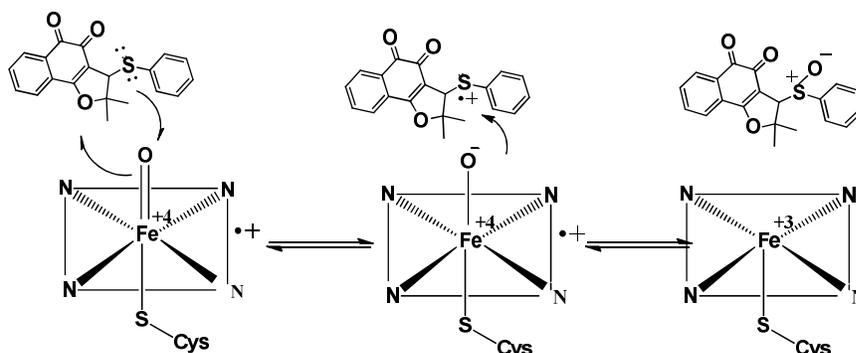
Em ambiente biológico, segundo Maeda e colaboradores (1999), uma das reações de oxidação mais comuns e possível de ocorrer em compostos contendo núcleo de enxofre é a perda de um elétron, formando um cátion radical, seguida da perda de um segundo elétron, formando um dicátion. Ataque de endonucleófilos são possíveis. Outra proposta, segundo Abraham (2009) e Barreiro e colaboradores (2009) e, provavelmente mais aceita, seria a oxidação do heteroátomo, uma transformação metabólica comum para compostos contendo núcleos de N ou S e pertencente a fase de biotransformação ou fase 1 do metabolismo de xenobióticos, em geral, promovida pelo citocromo P450. Na fase 2 do metabolismo, provavelmente a conjugação com a glutationa poderia ser uma proposta para detoxificação desse composto também em função do grupo quinona, um processo catalizado pela enzima glutationa S- transferase (**Figura 43**).

Figura 42 Voltamogramas cíclicos do tiofenol ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pertencente à classe 2 dos derivados da nor- β -lapachona em meio aprótico (DMF/ TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹), ν 0,100 V s⁻¹. Análise da corrente de pico (I_{pc_1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log \nu$ (DMF/ TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹).



Fonte: Autora.

Figura 43 Proposta do metabolismo de fase 1 de compostos da classe 2 de possível ocorrência em ambiente biológico e promovido pelo citocromo P450. Abaixo apenas a representação do grupo heme da enzima que apresenta 4 nitrogênios pirrólicos e o enxofre da cisteína (Cys).



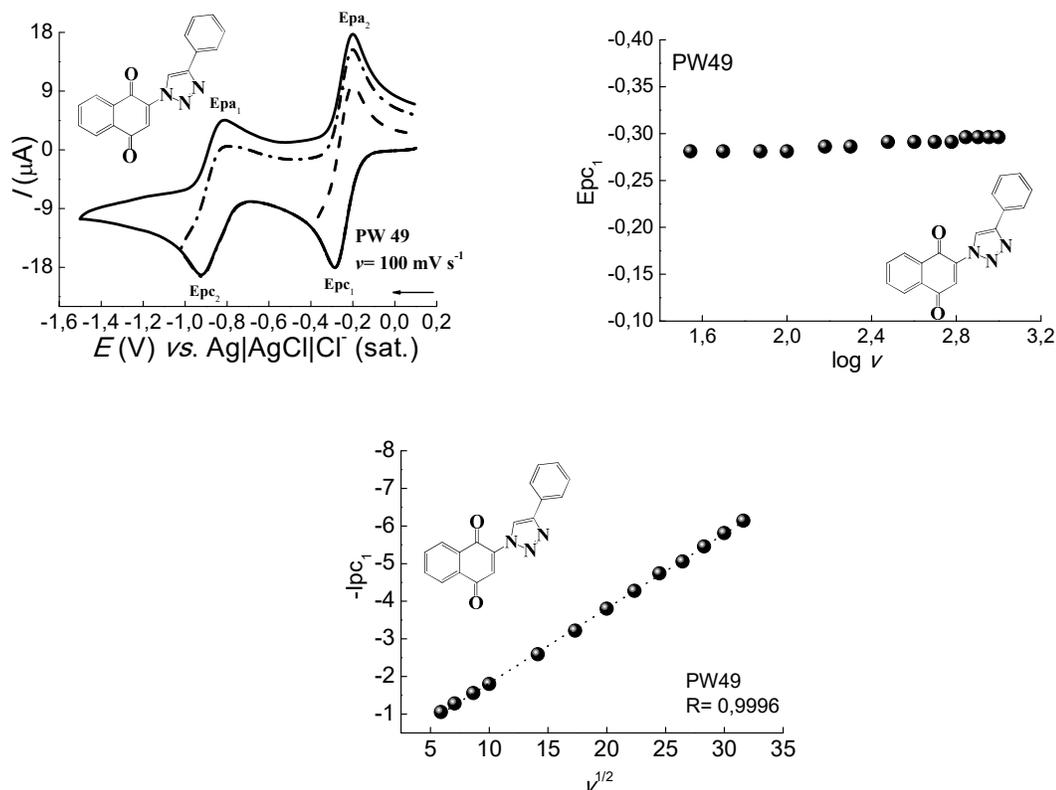
Fonte: Autora (adaptado de ABRAHAM, 2009, BARREIRO *et al.*, 2009).

CLASSE 03

A classe a seguir é composta por três *para*-naftoquinonas contendo em sua estrutura um núcleo triazólico. O processo de redução observado para os membros da classe 1 se repete neste caso com a ressalva já mencionada de que as *orto*-quinonas se reduzem mais facilmente que as *para*-quinonas (TONHOLO *et al.*, 1998) e que o composto ESNJ 242 contendo um átomo de selênio em sua estrutura acresce em seu processo redutivo um pico catódico em potencial muito negativo referente à quebra da ligação C-Se. O anel triazólico interfere fortemente nos valores de potencial em virtude da conjugação do mesmo com o sistema quinônico. Nesse caso a ordem de redução para os mesmos é: PW49 ($E_{pc1} = -0,28$ V) < PW65 ($E_{pc1} = -0,29$ V) < ESNJ 242 ($E_{pc1} = -0,31$ V).

A diferença pequena entre os valores concernente ao potencial de redução de primeira onda dos compostos PW65 e PW49 se dá em virtude do grupamento metoxila estar muito afastado das carbonilas quinônicas. Os gráficos diagnósticos indicam a mesma tendência já observada: transporte de massa de natureza difusional e reversibilidade para a primeira redução (**Figura 44**).

Figura 44 Voltamograma cíclico da quinona PW49 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pertencente a classe 3 em meio aprótico (DMF/TBAPF₆ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log \nu$ (DMF/TBAPF₆ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

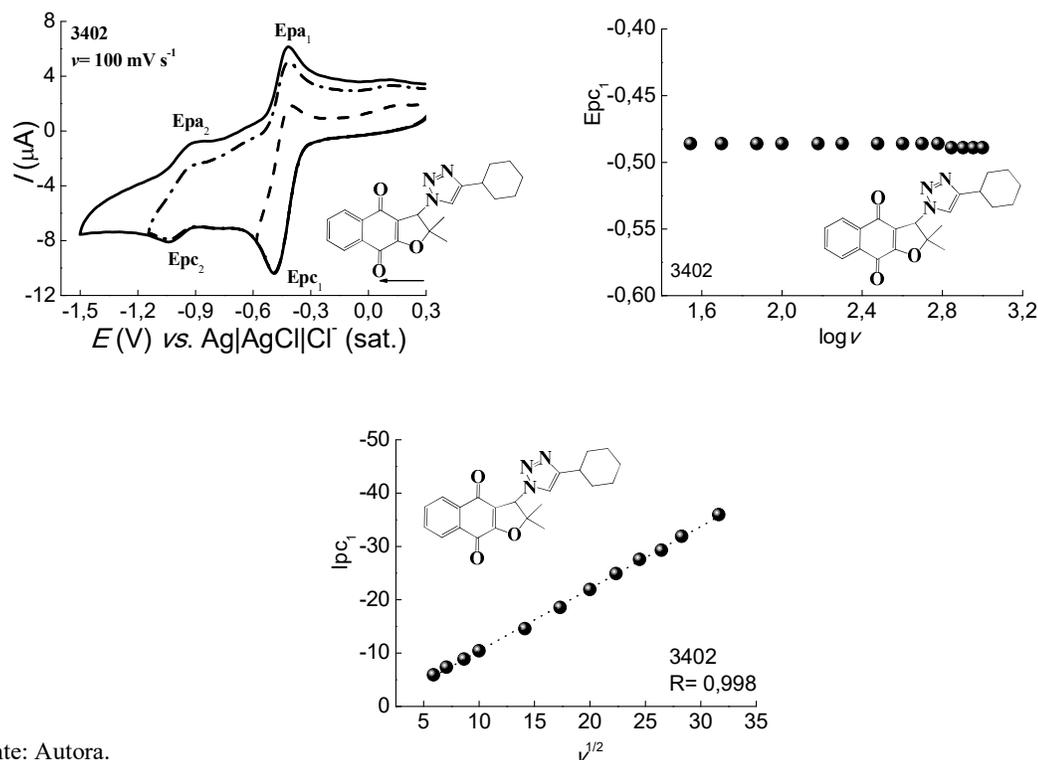


Fonte: Autora.

CLASSE 04

Nesta série derivada da nor- α -lapachona, dois pares de picos catódicos e anódicos, como esperado, característicos da redução do grupo eletroativo quinona podem ser observados. Os valores das diferenças entre os potenciais de pico anódico e catódico E_{pc_1} (- 0,489 V)/ E_{pa_1} (- 0,415 V) e E_{pc_2} (- 1,045 V)/ E_{pa_2} (- 0,929 V) para as quinonas (**Figura 45**) ultrapassam o valor teórico correspondente à transferência reversível de um elétron, sugerindo a possibilidade de desproporcionamento, reforçada pelo segundo par de picos que mostrou ser mal definido e muito menor. Tonholo e colaboradores (1998) e Ferreira e colaboradores (2013) observaram comportamento similar para um conjunto de quinonas também derivadas da nor- α -lapachona. As observações sobre o calcogênio no composto ESNJ243 pertencente a esta classe e sobre o anel triazólico feitas nas classes anteriores são pertinentes nesta.

Figura 45 Voltamograma cíclico da quinona 3402 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pertencente a classe 4 em meio aprótico (DMF/ TBAPF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log \nu$ (DMF/ TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Autora.

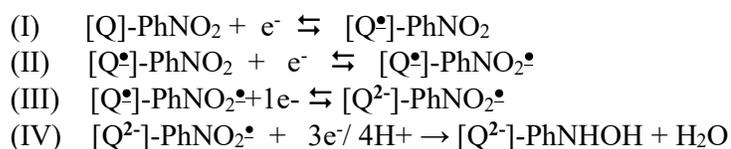
CLASSE 5

Esta classe, composta por dois isômeros, é um caso semelhante ao estudado por Souza (2011) e que remete às observações feitas para as nitroquinonas da classe 1. Os estudos eletroquímicos evidenciaram o comportamento característico das funções quinona e nitro em ambiente aprótico. A redução do grupo nitro nesse meio também ocorre em duas etapas individuais. A primeira é relacionada à formação do ânion radical nitro (RNO_2^-), processo reversível monoelétrônico seguido de um segundo processo redox irreversível, em que esta espécie gerada na primeira etapa é reduzida à hidroxilamina (RNHOH). As análises dos parâmetros eletroquímicos, corrente e potencial de pico catódico, indicam um transporte de massa controlado por processo difusional. Em relação aos potenciais de pico catódico, para o primeiro processo de redução (E_{pc1}), os mesmos apresentaram pouca variação em função do $\log \nu$. Além disso, segundo a diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico ($\Delta E = 85 \text{ mV}$) para o par E_{pc1}/E_{pa1} , pode-se caracterizar o processo como quasi-reversível (**Figura 46**).

Um dos aspectos mais importantes a ser destacado nesta classe já foi abordado nas nitroquinonas na classe 1: dificuldade de se individualizar os processos redutivos quando o composto ou grupo de compostos apresenta mais de um grupo eletroativo passível de redução em faixas próximas ou mesma faixa de potencial. Hernandez e colaboradores (2008) estudaram uma meta- nitroquinona derivada da nor- β -lapachona e Armendáriz-Vidales e colaboradores (2014) complementaram este estudo com os isômeros *orto* e *para*, ressaltando esta situação e recorrendo a estudos de espectroeletrólise para ajudar a elucidar o mecanismo, como já mencionado. Os isômeros *meta* e *para* apresentaram respectivamente três e quatro ondas individualizadas.

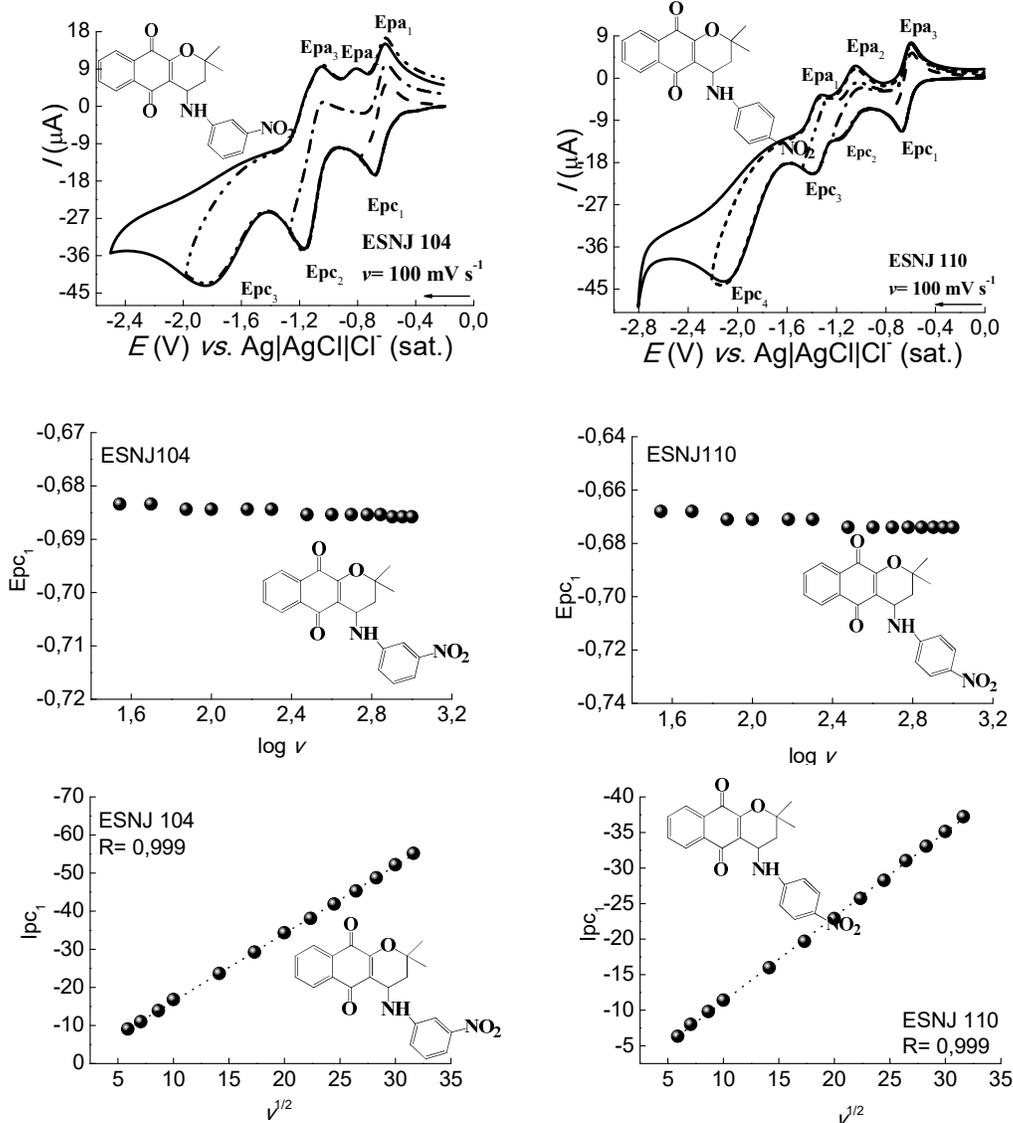
Questionamentos acerca do mecanismo de redução desses isômeros, especialmente após a primeira etapa de redução, persistem. O primeiro pico se refere à formação do ânion radical semiquinona, mas uma dúvida surge sobre o segundo processo de redução e se o mesmo estaria relacionado ao diânion advindo da redução monoelétrica da semiquinona ou se seria relativo ao radical resultante da redução do nitro, já observado em outros trabalhos. Com o intuito de esclarecer os questionamentos sobre o processo redutivo desses compostos foram realizados estudos computacionais (item 5.8) a fim de ajudar a elucidar o mecanismo relativo a tais quinonas. Vale ressaltar que as demais considerações feitas para as nitroquinonas pertencentes à classe 1 são concernentes nesta série.

Como será explicado adiante (item 5.8), os cálculos estruturais eletrônicos sugerem a seguinte ordem de redução, segundo os sítios de captura de elétrons: quinona, nitro e por fim quinona para o composto ESNJ110 cujo grupamento nitro se encontra em posição *para*. Dessa forma a proposta de mecanismo de redução seria a seguinte:



Quanto ao isômero ESNJ104, é consensual, na primeira redução, a geração do ânion radical semiquinona, assim como ocorreu para ESNJ110, mas os estudos computacionais não foram muito esclarecedores sobre qual grupo eletroativo se reduziria na segunda redução uma vez que as diferenças de cargas em torno dos grupos quinona e nitro geraram valores muito próximos, não sendo possível uma proposta mecanística conclusiva sobre qual processo ocorreu primeiro.

Figura 46 Voltamogramas cíclicos das nitroquinona ESNJ 110 e ESNJ 104 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pertencente a classe 5 em meio aprótico (DMF/ TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. Análise da corrente de pico (I_{pc_1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log \nu$ (DMF/ TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).



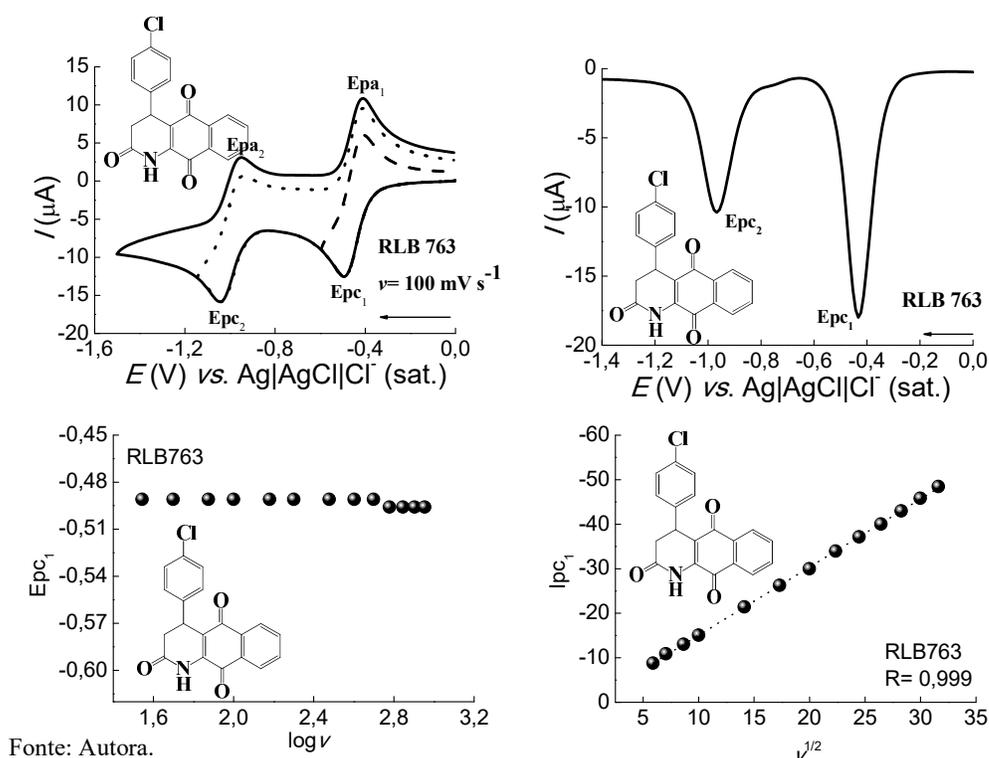
Fonte: Autora.

CLASSE 6

Para representar esta classe formada por cinco compostos foi escolhida a quinona RLB 763 (**Figura 47**). Há duas nitroquinonas (*orto* e *para*) compondo esta série, portanto, as

observações já feitas para as nitroquinonas anteriores são válidas neste caso, bem como as observações feitas para o grupo eletroativo quinona. O átomo de cloro não exerce muita influência sobre o processo redutivo da quinona uma vez que se encontra muito distante na estrutura e a diferença de potencial de primeira onda entre esta ($E_{pc1} = -0,520$ V) e o composto RLB800 ($E_{pc1} = -0,529$ V), portador da mesma estrutura com exceção do átomo de cloro é pequena (apenas 9 mV).

Figura 47 Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial da quinona RLB 763 (1×10^{-3} mol L⁻¹) pertencente a classe 5 em meio aprótico (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹), $\nu = 0,100$ V s⁻¹. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log \nu$ (DMF/ TBAP 0,1 mol L⁻¹).

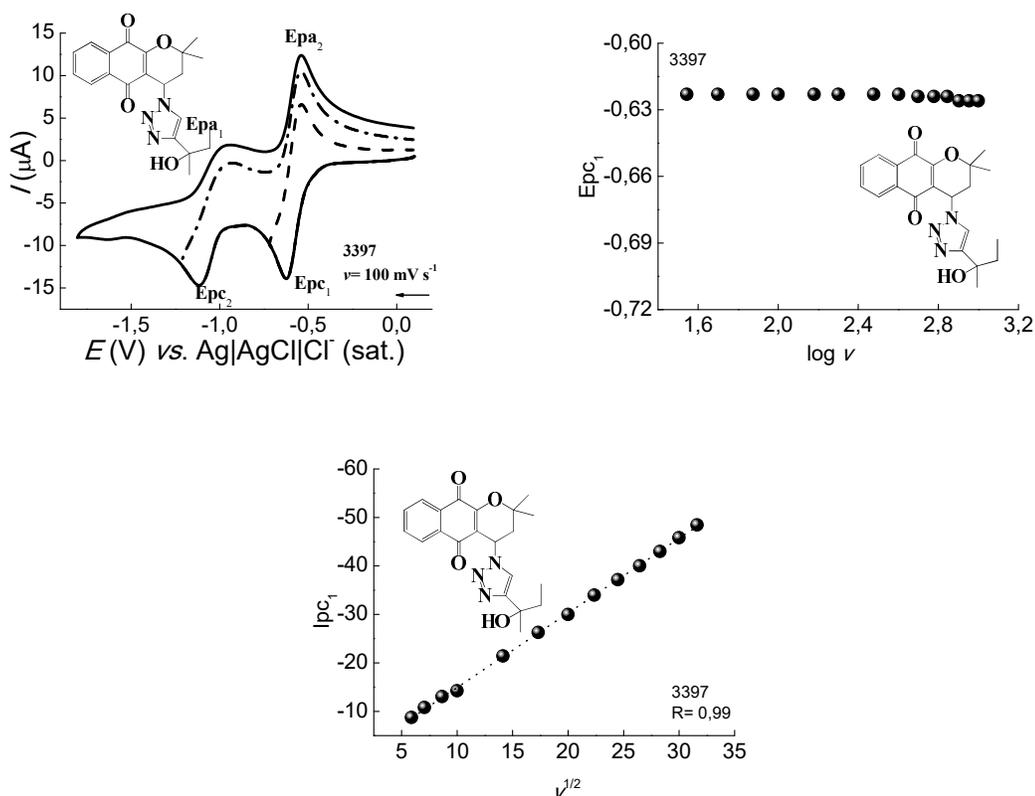


CLASSE 7

Esta classe apresenta a mesma estrutura que sustenta o anel quinônico da classe 5 acrescidos do anel triazólico. As mesmas observações realizadas sobre o núcleo de selênio e sobre a redução da classe quinona são pertinentes também nesta classe. O composto 3397 se reduz mais facilmente ($E_{pc1} = -0,624$ V) que o composto 3384 ($E_{pc1} = -0,633$ V), mas a diferença é pequena. O composto ESNJ 244, assim como os demais com núcleo de calcogênio na

estrutura apresenta uma terceira onda catódica em potencial mais negativo ($E_{pc3} = -1,281 \text{ V}$) em função da redução desse grupo (**Figura 48**).

Figura 48 Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial da quinona 3397 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pertencente a classe 7 em meio aprótico (DMF/ TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. Análise da corrente de pico (I_{pc1}), para a primeira onda de redução em função de $\nu^{1/2}$ e gráfico de potencial de pico de primeira onda de redução em função do $\log \nu$ (DMF/ TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Autora.

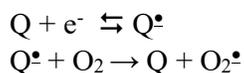
5.1.2 Estudos de Quinonas, em Meio Aprótico, em Presença de Oxigênio

Como já mencionado, as quinonas podem atuar, em presença de oxigênio, pelo mecanismo de transferência de elétrons seguido de estresse oxidativo (TE/ EO). Essa classe de compostos pode sofrer uma redução monoelétrica originando o ânion radical semiquinona e este pode transferir o elétron para o oxigênio molecular formando o ânion radical superóxido. Este, por sua vez, pode ser transformado em peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, espécies

reativas que uma vez presentes em sistemas vivos desenvolvem uma sequência de eventos que perturbam a homeostasia e conduzem ao estresse oxidativo. O oxigênio tem um papel importante na geração de EROs e no processo de ciclagem redox possível de ocorrer em quinonas (KOVACIC *et al.*, 2000; KOVACIC *et al.*, 2014).

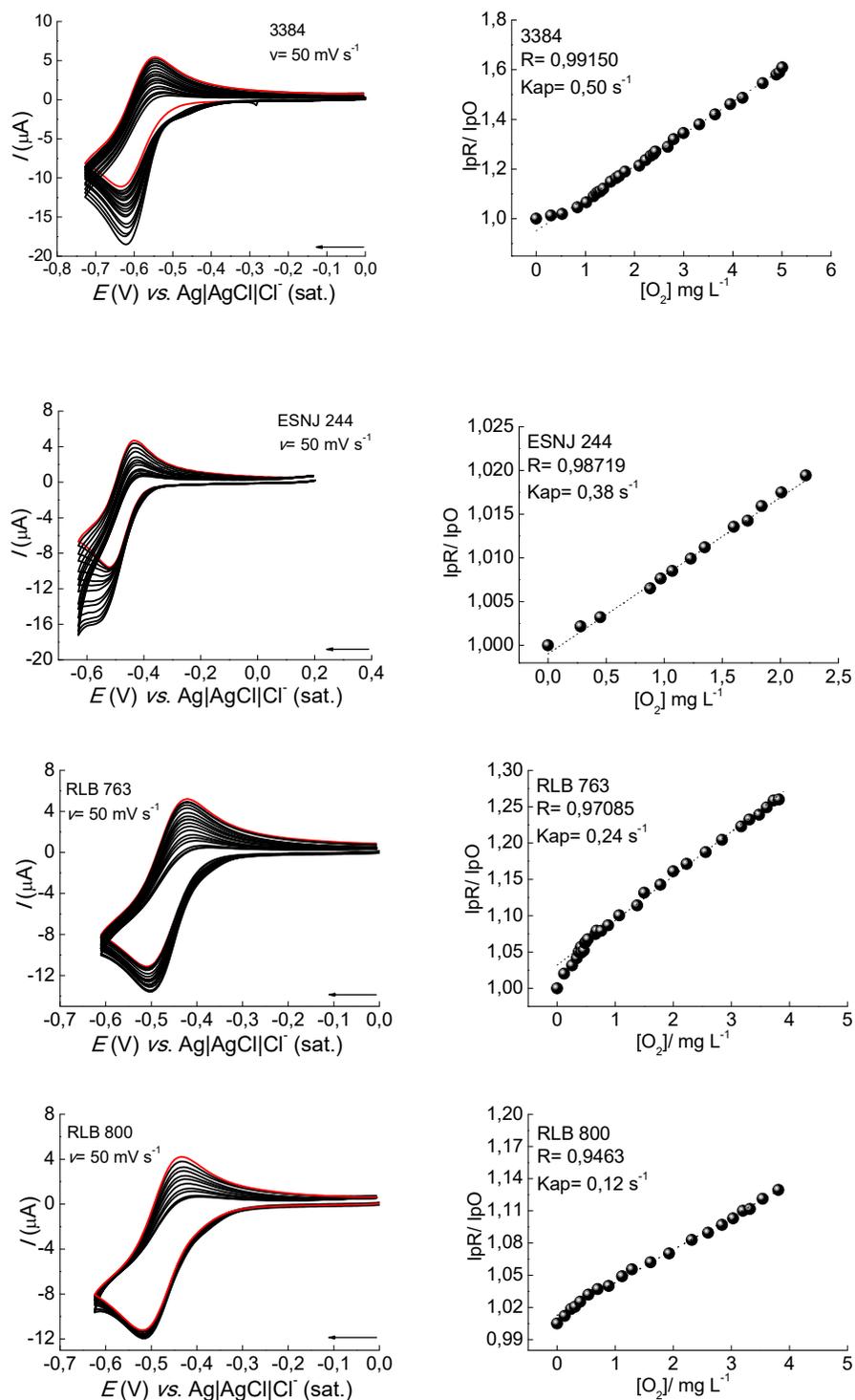
As quinonas a seguir foram avaliadas quanto à sua reatividade frente ao oxigênio. Procedeu-se o estudo em solvente orgânico (DMF). O uso do solvente orgânico se justifica devido a três principais fatores: ânion radical superóxido é instável em meio prótico; há necessidade de mimetizar o ambiente hidrofóbico das membranas biológicas, além da necessidade de formar semiquinonas, a partir da transferência de um elétron possível, principalmente, em ausência de fontes de prótons. A redução do oxigênio ao ânion radical superóxido é reversível e ocorre em potencial em torno de -0,8 V vs. Ag|AgCl|Cl⁻ em meio aprótico (DMF/ TBAP) (ANTUNES *et al.*, 1996; SONG *et al.*, 2010; AUGUSTO *et al.*, 2011).

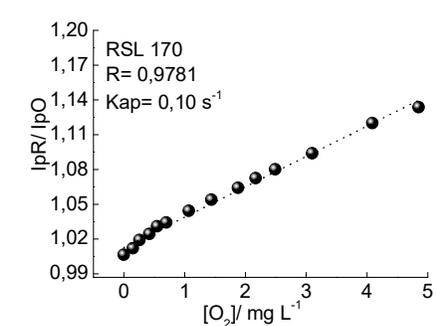
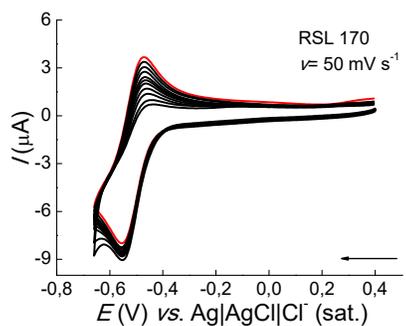
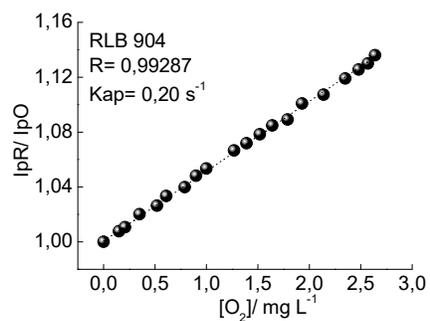
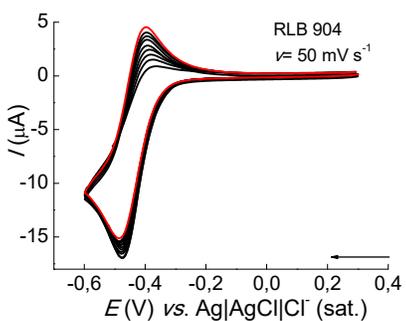
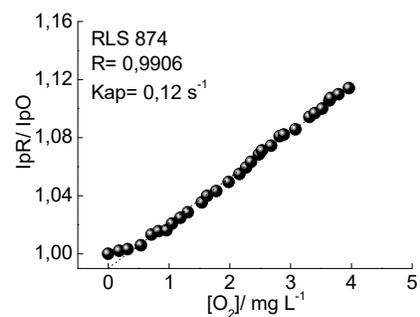
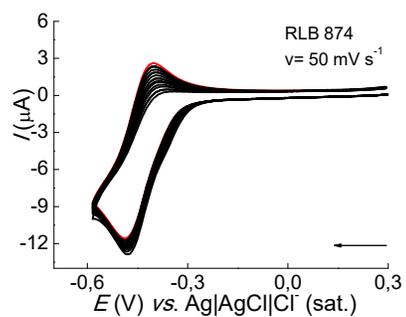
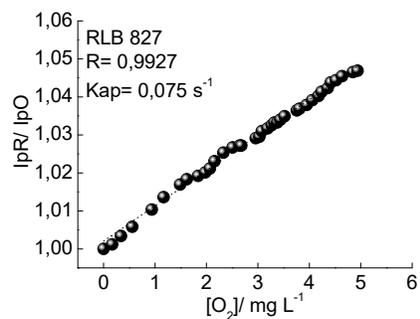
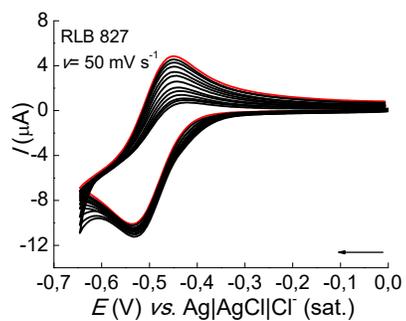
Com as sucessivas adições de oxigênio, o perfil eletroquímico referente à primeira redução monoelétrica é visivelmente alterado. Além do deslocamento dos valores de potencial catódico, a corrente associada ao processo redutivo aumenta com o incremento de oxigênio e há a redução e posterior desaparecimento do pico anódico, evidenciando a interação das semiquinonas, com o oxigênio, em um processo homogêneo de transferência de um elétron (**Figura 49**). O processo de interação dos ânions radicais formados com o oxigênio é um mecanismo eletroquímico- químico catalítico regenerando a quinona (FERREIRA, 2013):

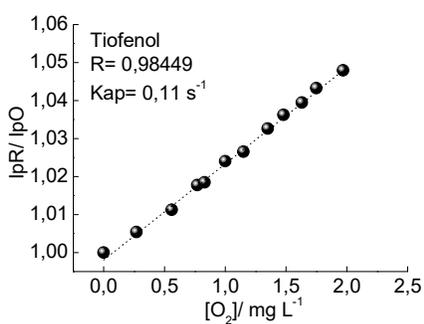
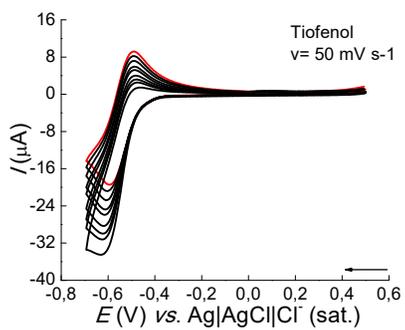
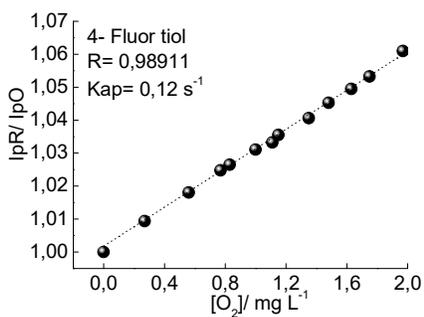
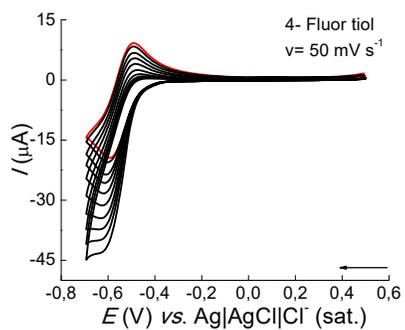
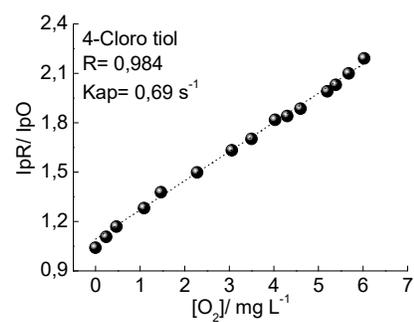
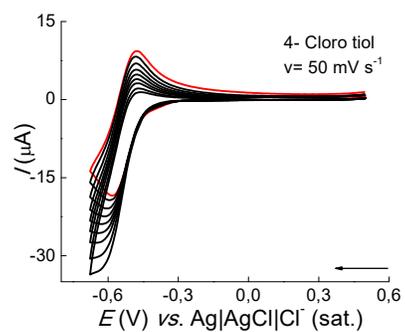
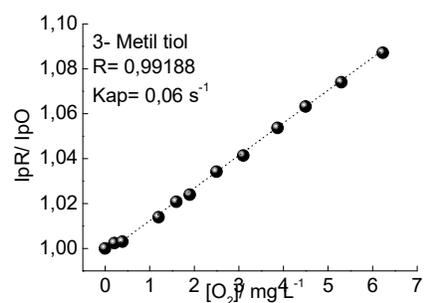
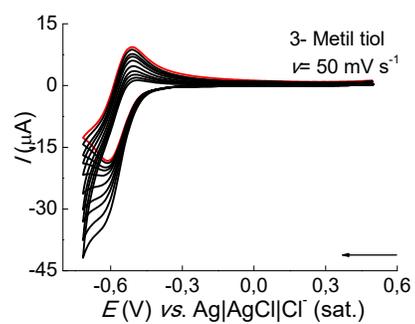


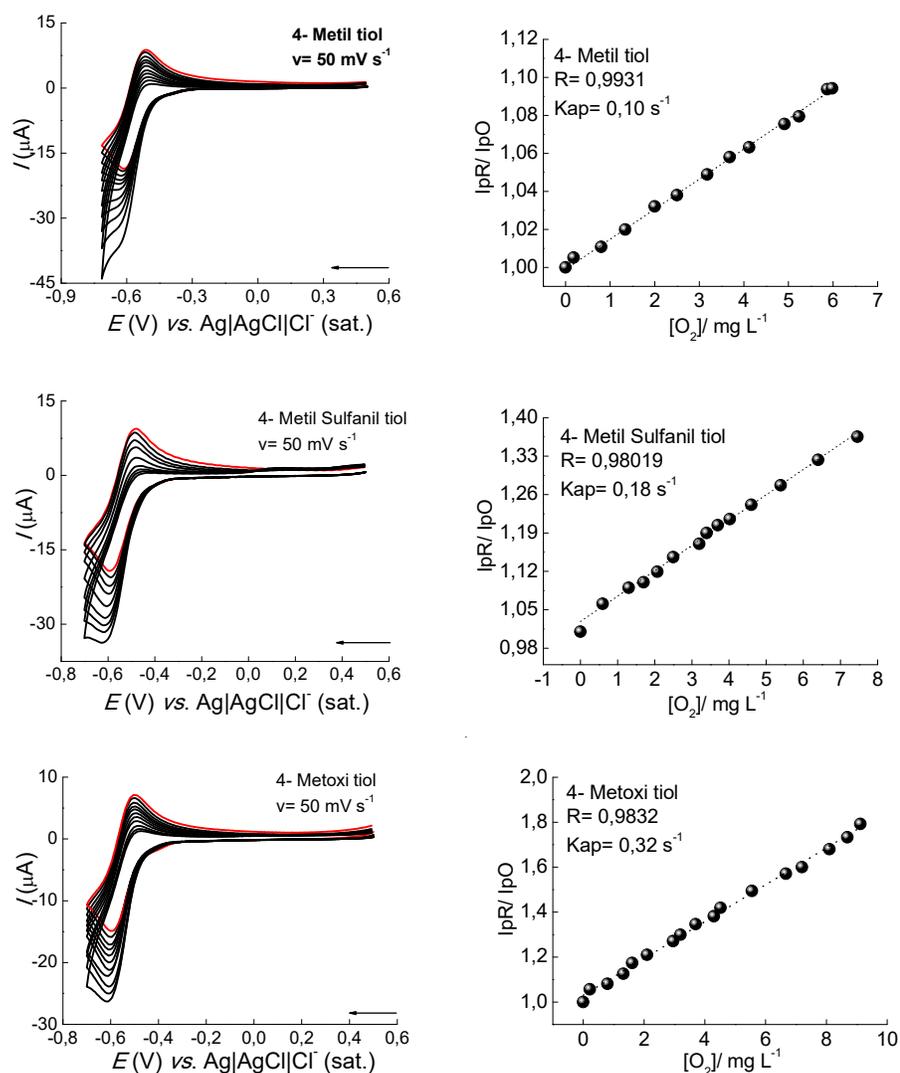
Evidenciou-se a capacidade de geração do ânion radical superóxido (SONG *et al.*, 2010). As constantes de associação entre semiquinonas e o oxigênio foram obtidas e a ordem de reatividade observada foi a seguinte: 3-Metil tiol < RLB827 < RSL 170 = 4-Metil tiol < tiofenol < 4- Flúor tiol = RLB 800 = RLB 874 < 3-Metil sulfanil tiol < RLB 904 < RLB 763 < 4-Metoxi tiol < ESNJ 244 < 3384 < 4-Cloro-tiol.

Figura 49 Voltamogramas cíclicos para algumas quinonas em DMF/TBAP ou DMF/TBAPF₆ (0,1 mol L⁻¹), eletrodo de carbono vítreo (3 mm), em presença de diferentes concentrações de oxigênio; $\nu = 0,05$ V s⁻¹ (à esquerda). Curva de saturação para I_{pR}/I_{pO} em função da concentração de oxigênio para cálculo da constante aparente de reatividade (à direita).









Fonte: Autora.

5.3. Atividade Citotóxica

As quinonas da classe 02 foram submetidas a uma triagem citotóxica a partir do teste do MTT tendo então o valor de IC_{50} (concentração do composto necessária para promover 50% de inibição de certa atividade) calculado. Tais substâncias foram avaliadas frente às linhagens tumorais PC3 (câncer de próstata), HCT-116 (côlon-humano), SF-295 (glioblastoma) K562 (leucemia mielóide crônica) e em relação à linhagem não tumoral PBMC (células não nucleadas do sangue periférico). A atividade citotóxica de nor β -lapachona já está descrita na literatura (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2009; DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2012),

porém a dos 12 derivados inclusos nesse trabalho frente a células tumorais ainda não havia sido realizada. A atividade citotóxica de tais amostras está apresentada na tabela abaixo, com seus respectivos valores de IC₅₀ (Tabela 04).

Tabela 04 Valores de IC₅₀ com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em triplicata em quatro linhagens de células cancerígenas e uma linhagem não tumoral.

Linhagens/ Quinonas	MTT [IC ₅₀ µg. mL ⁻¹ (µM)]				
	SF-295 (Glioblastoma)	PC3 (Próstata)	K562 (Leucemia)	HCT-116 (Colorretal)	PBMC (Sangue)
4-Metoxi tiol	1,421 (3,88) 0,9161- 2,204	0,9729 (2,7) 0,8342 - 1,135	0,5273 (1,4) 0,4033- 0,6894	0,7571 (2,1) 0,7038 - 0,8145	1,733 (4,73) 1,555- 1,930
4-Fluor tiol	8,545 (24,11) 7,820- 9,336	1,331 (2,09) 1,199 - 1,478	0,8510 (2,4) 0,7641- 0,9479	0,7410 (2,1) 0,6315- 0,8694	1,957 (5,52) 1,581- 2,422
Tiofenol	1,425 (4,24) 0,6229- 3,262	1,275 (2,12) 1,163- 1,398	0,3110 (0,9) 0,2799- 0,3457	0,7134 (2,1) 0,6194- 0,8216	1,195 (3,55) 1,072- 1,333
Pentafluor tiol	1,606 (3,77) 1,218- 2,118	1,299 (3,32) 1,108- 1,523	1,142 (2,7) 0,8800- 1,483	1,414 (3,3) 1,201- 1,665	1,385 (3,25) 1,277- 1,503
4-Metil tiol	1,721 (4,91) 1,565- 1,892	1,532 (3,47) 1,393- 1,684	0,5728 (1,6) 0,5097- 0,6436	1,217 (3,5) 1,100- 1,346	1,657 (4,73) 1,515- 1,812
4-Cloro tiol	1,793 (4,83) 1,624- 1,979	1,399 (3,36) 1,270- 1,542	0,5525 (1,5) 0,5057- 0,6036	1,246 (3,4) 1,055- 1,472	1,444 (3,89) 1,300- 1,603
3-Metil tiol	1,519 (4,33) 0,9435- 2,446	0,8059(2,19) 0,6985 -0,9298	0,7290 (2,1) 0,6827- 0,7784	0,7675 (2,2) 0,6606- 0,8916	1,161 (3,31) 1,066- 1,265
Ciclohexano tiol	> 10	3,880 (15,29) 2,949- 5,105	1,382 (4,0) 1,105- 1,728	5,237 (15,3) 4,995- 5,491	1,353 (3,9) 1,247- 1,468
Tioacetato tiol	1,099 (3,63) 0,8397- 1,438	2,806 (5,03) 2,492 3,159	0,7650 (2,5) 0,6506- 0,8994	1,520 (5,0) 1,310- 1,765	1,815 (6,0) 1,662- 1,981
Benzil tiol	1,452 (4,14) 0,7971- 2,645	1,470 (2,16) 1,316- 1,643	0,7572 (2,2) 0,6689- 0,8571	0,7570 (2,2) 0,6999- 0,8188	1,860 (5,31) 1,675- 2,066
4-Metil Sulfanil tiol	1,183 (3,09) 0,9437- 1,482	1,412 (1,98) 1,262- 1,580	0,5345 (1,4) 0,4849- 0,5891	0,7573 (2,0) 0,6421- 0,8933	1,583 (4,14) 1,416- 1,770
AA Boc Tiol	> 10	> 10	6,950 (15,1) 6,228- 7,756	8,525 (18,5) 7,856- 9,252	ND*
β-lapachona	0,91 (0,74- 1,11)c	1,56 (1,34- 1,98)e	1,47 (1,23- 1,78)e	0,87 0,74-0,95d	> 20,6c
Nor-β-lapachona	1,58 (1,31- 1,88)a	1,98 (1,53- 2,23)b	1,62 (1,44- 1,79)b	-	> 21,9a
Doxorrubicina	0,25 0,22-0,28	0,44 0,34-0,54	0,46 0,45-0,47	0,11 0,08-0,14	ND*

*ND= não definida; a. Extraído de DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2007; b. Extraído de CAVALCANTI *et al.*, 2011; c. Extraído de DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010; d. Extraído de VIEIRA *et al.*, 2015; Extraído de CAVALCANTI, 2010.

Fonte: Autora.

Os resultados de IC₅₀ (concentração efetiva que ocasiona a morte de 50% das células) obtidos para a linhagem de células de glioblastoma foram inferiores a 2 µg/mL, exceto para os compostos 4-flúor tiol, ciclohexano tiol e AA Boc tiol, sendo os valores de IC₅₀ para estes casos 8,525 µg/mL e superiores a 10 µg/mL. Ao avaliar a linhagem de câncer de próstata, valores de IC₅₀ menores do que 1 µg/mL são obtidos para os compostos 4-metoxi tiol e 3-metil tiol. A maior parte dos compostos apresentaram valores de IC₅₀ compreendidos entre 1 e 2 µg/mL e apenas duas quinonas, ciclohexano tiol e AA Boc tiol, apresentaram os maiores valores de IC₅₀

do grupo de substâncias analisadas. Essa tendência referente a essas duas últimas quinonas se dá em todas as linhagens de células tumorais abordadas no experimento.

Para a linhagem de câncer de cólon, os compostos que apresentaram valores de IC_{50} superiores a 1 $\mu\text{g/mL}$ foram 4-metoxi tiol, 4-flúor tiol, tiofenol, 3-metil tiol, benzil tiol e 4-metil sultanil tiol. Tais quinonas, acrescidas dos compostos 4- metil tiol, 4- cloro tiol e tioacetato tiol, apresentaram situação inversa na linhagem de células leucêmicas, ou seja, os valores de IC_{50} foram inferiores a 1 $\mu\text{g/mL}$. Usando o critério de classificação de Perez-Sacau e colaboradores (2007), em que as naftoquinonas testadas são classificadas como compostos com alta atividade ($IC_{50} < 2 \mu\text{M}$), moderadamente ativas ($2 \mu\text{M} < IC_{50} < 10 \mu\text{M}$) ou inativas ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$), pode-se observar que quase todas as quinonas apresentaram valores de IC_{50} abaixo de 2 μM com exceção da 4-flúor tiol (linhagem gliolastoma), ciclohexano tiol (glioblastoma, próstata e colorretal), tioacetato tiol (próstata e colorretal) e AABoc tiol que em todas as linhagens apresentou valores de IC_{50} superiores a 6 μM , classificando-a como inativa.

Para todas as amostras foi calculado o índice de seletividade (IS) (**Tabela 05**). Este índice permite avaliar a seletividade de um determinado composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando seu potencial para futuros testes clínicos. O cálculo deste índice corresponde à divisão entre o valor da IC_{50} de cada composto-teste na linhagem de células normais PBMC e o valor da IC_{50} de cada composto na linhagem de células neoplásicas ($IS = IC_{50} \text{ PMBC} / IC_{50} \text{ células neoplásicas}$). O índice de seletividade foi utilizado por Queiroz e colaboradores ao avaliarem, *in vitro*, a atividade antineoplásica de plantas do cerrado e posteriormente por Nakamura e colaboradores (2006) ao estudarem a atividade leishmanicida do extrato hidroalcolico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnelli* (Piperaceae).

Tabela 05 Valores de índice de seletividade [IC₅₀ (células não tumorais)/ IC₅₀ (célula tumoral)] das quatro linhagens de células anticancerígenas.

Índice de seletividade IC ₅₀ (células não tumorais)/ IC ₅₀ (célula tumoral)				
Linhagens/ Quinonas	SF-295 (Glioblastoma)	PC3 (Próstata)	K562 (Leucemia)	HCT-116 (Colorretal)
4- Metoxi tiol	1,22	1,25	2,3	3,14
4- Fluor tiol	0,23	0,17	0,20	0,27
Tiofenol	0,84	0,66	2,11	2,96
Pentafluor tiol	0,86	0,66	0,58	0,41
4- Metil tiol	0,96	0,63	1,10	0,90
4- Cloro tiol	1,79	1,40	0,55	1,25
3- Metil tiol	0,76	0,95	1,30	1,70
Ciclohexano tiol	ND*	0,35	0,98	0,07
Tioacetato tiol	1,65	0,59	0,77	0,51
Benzil tiol	1,28	0,87	1,15	1,52
4-Metil Sulfanil tiol	1,34	0,95	1,77	2,34
AA Boc Tiol	ND*	ND*	ND*	ND*
β-lapachona	ND*	ND*	ND*	ND*
Nor- β-lapachona	ND*	ND*	ND*	ND*
Doxorrubicina	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND= não definida

Fonte: Autora.

Suffness e colaboradores (1991) consideraram IS significativo quando o composto em questão apresenta um valor maior ou igual a 2,0, indicando que o composto apresenta duas vezes mais atividade na linhagem de células neoplásicas do que em células normais, tendo, portanto, ação anticâncer. O índice de seletividade encontrado para os compostos avaliados neste trabalho variou entre 0,2- 3,14 µg/mL. Apenas três quinonas apresentaram valores de IS superiores a 2, sendo estas: 4-metoxi tiol em que os valores de IS são 2,3 µg/mL e 3,14 µg/mL respectivamente para as linhagens K562 e HCT-116, o composto tiofenol cujo IS foi de 2,11 µg/mL em K562 e 2,96 µg/mL na linhagem HCT-116 e finalmente a substância 4-metil sulfanil tiol com índice de 2,34 na linhagem HCT-116. As demais amostras apresentaram valores de IS inferiores a 2,0, indicando baixa seletividade.

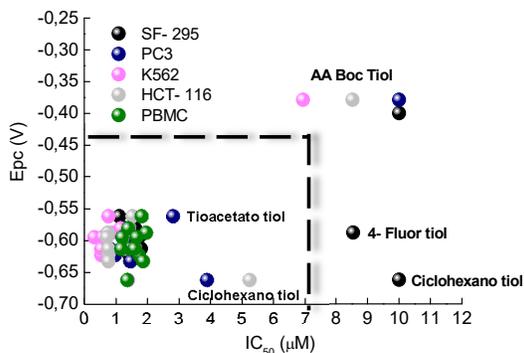
A atividade de compostos biologicamente ativos está diretamente relacionada às suas propriedades físico-químicas, pois os mesmos precisam atravessar os tecidos e alcançar seu(s) sítio(s) receptor(es) para que possam desempenhar sua ação, desencadeando por conseguinte, a resposta biológica (BARREIRO *et al.*, 2009). Entre as propriedades físico-químicas mais importantes para o estabelecimento da atividade biológica de compostos químicos citam-se as de natureza estérica, eletrônica e hidrofóbica, propriedades relacionadas aos efeitos eletrônicos transmitidos por grupos substituintes presentes nas moléculas (TAVARES, 2004). Compreender a dimensão e natureza desses efeitos são fundamentais para o entendimento das

relações entre estrutura química e atividade biológica (LABUTE, 2000; TAVARES, 2004). Em eletroquímica, o principal parâmetro de correlação com a atividade biológica de um grupo em questão é o potencial de redução referente à primeira onda (E_{pc1}) (HILLARD *et al.*, 2008; DE ABREU *et al.*, 2011). Pode-se perceber que a possível atividade atribuída aos compostos quinônicos depende dos valores de E_{pc1} , apesar da inexistência de uma correlação linear no gráfico. Há uma faixa ótima de potencial de redução. Todos os compostos presentes na área demarcada no gráfico (linha tracejada), com valores de potencial de redução de primeira onda, maiores (menos negativos) que $-0,7$ V, foram ativos. Há uma faixa ideal para a atividade (**Figura 50**). O composto mais facilmente redutível, o AA Boc tiol, comparado aos demais, apresentou um maior valor de IC_{50} para todas as linhagens cancerígenas. Uma possível explicação seria a de ser reduzido fora de seu sítio de ação, sofrendo reações de degradação. As quinonas 4-flúor-tiol e ciclohexano tiol referente a linhagem SF-295 ficaram fora dessa área demarcada.

Pode-se observar que as modificações na posição 3 do anel naftofuranoquinônico resultaram em uma série análoga mais bioativa que a nor- β -lapachona em todas as linhagens para a maior parte dos compostos. O composto β -lapachona foi adicionado à tabela por ser uma quinona de referência em atividade biológica, tendo sido esta mais ativa na linhagem SF-295 (glioblastoma) que a nova série. Com relação às demais linhagens tumorais houve variações, mas a maior parte das novas quinonas foram mais bioativas que a β -lapachona.

A busca racional por compostos candidatos a agentes terapêuticos vem ganhando mais destaque em função da estrutura química estar relacionada à atividade biológica. Por similaridade, compostos com estruturas químicas análogas podem apresentar atividades farmacológicas semelhantes. Dessa maneira, o estudo racional de uma série de compostos bioavaliados pode fornecer informações a cerca de grupos farmacofóricos envolvidos no mecanismo de ação biológica, os quais serão fundamentais no desenvolvimento de uma estrutura-protótipo (BARREIRO, 2009). Na classe estudada, a inserção de um átomo de enxofre aumentou a polarizabilidade, conferiu um incremento de lipossolubilidade (BARREIRO *et al.*, 2009) o que sugere uma alteração no perfil relacionado a este aspecto em relação à nor- β -lapachona.

Figura 50 Correlação entre os potenciais de pico catódico (E_{pc1}) e a concentração inibitória mínima (IC_{50}) em quatro linhagens de células cancerígenas e uma linhagem não tumoral para as quinonas da classe 2.

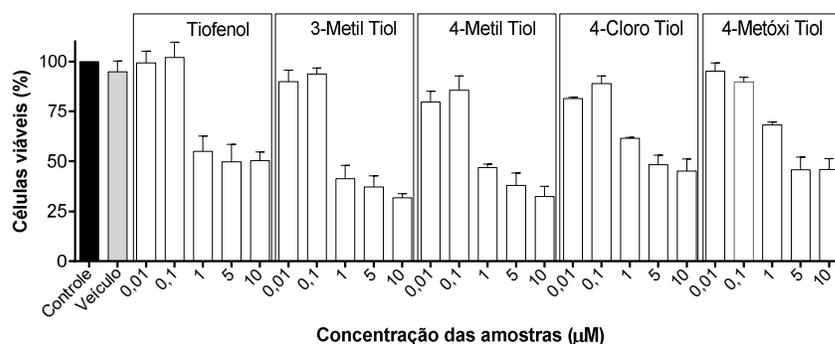


Fonte: Autora.

Outro ensaio de MTT utilizando células do epitélio alveolar de adenocarcinoma humano (A549) (**Figura 51**) foi realizado apenas para as amostras tiofenol, 3-metil tiol, 4-metil tiol, 4-cloro tiol e 4-metóxi tiol, utilizando as concentrações 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM para cada uma das amostras. Nas concentrações 0,01 μM e 0,1 μM , não houve citotoxicidade expressiva dos compostos testados, uma vez que os grupos-teste se mantiveram com valores percentuais próximos ao grupo controle. Já nas duas concentrações mais elevadas houve uma redução de mais de 50% de células viáveis. As quinonas 3-metil tiol e 4-metil tiol apresentaram respostas bem semelhantes nas concentrações 1, 5 e 10 μM sugerindo que a mudança na posição do grupo metila não influenciou numa resposta diferenciada quanto à citotoxicidade nessa linhagem. Esse fato procedeu no ensaio de MTT anterior e não refletiu em uma grande diferença nos valores de seletividade para esses isômeros. Já no caso do tiofenol, a ausência do grupo metila implicou em um comportamento semelhante para as três maiores concentrações. Em compostos bioativos, a inserção de um grupamento (alquila, halogênio, nitro etc) pode modificar profundamente diversos parâmetros como biodisponibilidade, coeficiente de partição, densidade eletrônica, afetar a interação do substituinte com seu receptor além de interferir na potência, duração e a natureza do efeito em ambiente celular (WERMUTH, 2003). De forma geral, segundo da Silva Júnior e colaboradores (2007) a presença de grupos eletroretiradores em derivados nor- β -lapachonicos tende a aumentar a atividade citotóxica, enquanto grupos eletrodoadores tendem a reduzir a atividade antiproliferativa desses compostos podendo-se estabelecer uma correlação com a constante de Hammett. Neste estudo com adenocarcinoma, a única molécula com substituinte eletroretirador (4-cloro tiol) apresenta

efeito citotóxico semelhante à quinona 4-metil tiol nas duas concentrações iniciais e a quinona 4-metoxi tiol nas concentrações de valores mais altos, ambas portadoras de grupos eletrodadores, ou seja, o oposto do esperado para a relação entre propriedades físico-químicas e atividade biológica expressa pela constante de Hammet. Neste caso o efeito citotóxico na concentração 10 μM se dá na seguinte ordem: 3-metil tiol; 4-metil tiol > 4 metóxi tiol; 4-cloro tiol > tiofenol. Neste caso pode-se observar o efeito citotóxico de determinado grupo de compostos como sugerido por Leszczynski e colaboradores (2012) e Smith (2010) dando aos mesmos um perfil estruturalmente específico: substituintes eletrorretiradores reduzem a densidade eletrônica no anel aromático, tornando-o menos reativo e, por conseguinte, menos susceptível ao metabolismo redox de enzimas P450/ NQOs ao passo em que grupos eletrodadores promovem o oposto. Além disso pode-se também observar que quanto mais lipofílica a quinona, maior sua citotoxicidade utilizando os valores da constante de lipofilicidade (π) que indicam a influência de um grupo em particular sobre o coeficiente de partição. Valores positivos de π indicam substituintes que agregam caráter lipofílico à estrutura e no caso das quinonas analisadas, os maiores valores dessa constante pertencem ao grupo metila seguido dos grupos metóxi, cloro e por último átomo de hidrogênio do composto tiofenol, cujo anel aromático não apresenta substituições.

Figura 51 Avaliação do efeito citotóxico dos compostos tiofenol, 3-metil tiol, 4-metil tiol, 4-cloro tiol e 4-metóxi tiol (0,01, 0,1, 1, 5 e 10 μM) sobre células A549 utilizando ensaio colorimétrico por redução do MTT. Resultados expressos em percentual de células viáveis em comparação ao grupo exposto apenas ao meio de cultivo RPMI (controle). Veículo representa células tratadas com DMSO (0,04%) nas mesmas concentrações que as amostras.



Fonte: Autora.

Esses compostos foram avaliados frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi* (CARDOSO *et al.*, 2015) e pode-se observar que os valores de IC_{50} para tiofenol, 3-metil tiol e

4- metil tiol são respectivamente: $32,3 \pm 1,8$, $83,6 \pm 6,1$ e $158,4 \pm 36,9$ (**tabela 06**), ou seja, a introdução de um grupo metila influenciou o IC_{50} e diminuiu a seletividade especialmente para a quinona 4-metil tiol. O grupo metila é muito utilizado nas estratégias de modificação molecular e, como mencionado acima, sua introdução pode promover modificações em diversos aspectos relacionados à atividade biológica de determinada série de compostos biologicamente ativos (WERMUTH, 2003; BARREIRO *et al.*, 2011). Segundo Wermuth (2003), “o grupo metila, geralmente considerado quimicamente inerte, é capaz de alterar profundamente as propriedades farmacológicas de uma molécula”. Pode ser adicionado, em alguns casos, para bloquear estericamente sítios metabólicos ou mesmo para a promoção de um aumento na potência da molécula em ambiente celular, em função da redução da energia de dessolvatação (WERMUTH *et al.*, 2015).

Outro fato interessante é a diferença de atividade entre os compostos 4-cloro tiol e 4-fluor tiol/ Pentafluor tiol. Mesmo estando na mesma posição e sendo grupos eletrorretiradores, a diferença nos valores de IC_{50} é grande e a introdução de outros átomos de flúor nas demais posições do anel aromático não resultaram em melhoria da atividade, denotando que neste caso grupos eletrorretiradores não tendem a aumentar a atividade citotóxica e que provavelmente o cloro é um grupo farmacofórico. Semelhante observação foi feita por Wermuth e colaboradores (2004). Apesar de não ser um fármaco, a β -lapachona é uma quinona-referência muito importante do ponto de vista da pesquisa científica especialmente em função das suas atividades farmacológicas contra o *T. cruzi*, diferenciando-a de outras naftoquinonas (FERREIRA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2016). Todos os novos compostos propostos por Cardoso e colaboradores (2015) e avaliados nesse trabalho frente a linhagens cancerígenas mostraram-se mais ativos do que esta quinona de referência.

Tabela 06 Valores de IC_{50} e Índice de Seletividade (IS) frente a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Dados extraídos de CARDOSO *et al.*, 2015.

Quinona	IC_{50}	IS
Benzil tiol	$32,3 \pm 1,8$	0,54
4- Cloro tiol	$9,2 \pm 1,4$	4,23
4- Metil tiol	$158,4 \pm 36,9$	-
Metoxi tiol	$59,5 \pm 5,8$	0,34
3- Metil tiol	$83,6 \pm 6,1$	0,31
4- F tiol	$164,7 \pm 24,0$	-
Pentafluor tiol	$182,7 \pm 12,9$	-
β-lapachona	$391,5 \pm 16,5$	-

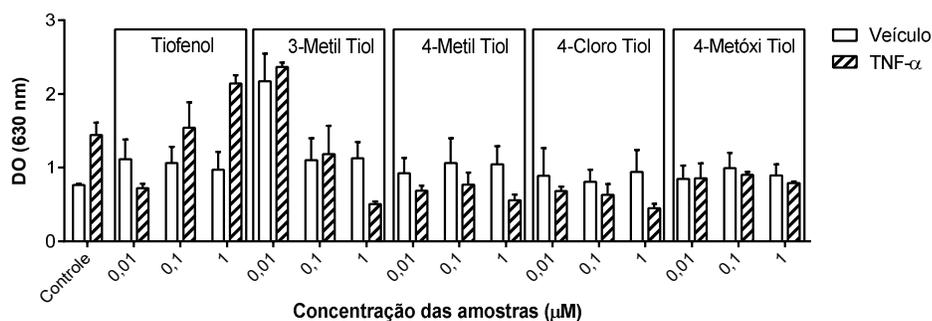
Fonte: Autora (adaptado de CARDOSO *et al.*, 2015).

As mesmas quinonas, submetidas ao ensaio colorimétrico por redução do MTT com células A549, foram submetidas ao teste de NBT (nitrozul de tetrazólio). O TNF α (fator de necrose tumoral) é uma citocina que apresenta citotoxicidade promovendo alterações na função mitocondrial. Além disso, a mesma ativa a produção de EROs nas mitocôndrias em virtude dos danos promovidos ao complexo III da cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma o efeito destas quinonas sobre a geração de espécie reativa de oxigênio foi avaliada em células humanas (A549) em duas condições experimentais distintas e independentes:

- 1ª condição: células não estimuladas.
- 2ª condição: células estimuladas com o mediador inflamatório TNF α .

Na primeira condição, as células foram cultivadas em um ambiente livre de estímulo inflamatório e submetidas ao tratamento com as respectivas quinonas. Neste caso as substâncias causaram discreto aumento na geração de espécies reativas na célula, exceto a substância 3-metil-tiol na menor concentração (0,01 μ M). No segundo grupo (com TNF α), as células apresentam a condição para o incremento de produção de EROs, apenas o grupo celular submetido ao tratamento com tiofenol apresentou capacidade de aumentar ainda mais a produção de EROs (**Figura 52**).

Figura 52 Medida da produção de espécies reativas por NBT em células A549 tratadas com Tiofenol, 3-Metil Tiol, 4-Metil Tiol, 4-Cloro Tiol e 4-Metóxi Tiol (0,01, 0,1 e 1 μ M) e mantidas sob condição de estímulo com TNF- α (30 ng/mL) ou veículo (DMSO, 0,04%) por 24 h. As barras representam a média \pm erro padrão da média (EPM) da densidade óptica (DO) em cada grupo.



Fonte: Autora.

Um terceiro teste de MTT foi realizado com as quinonas da série RSL (classe 8), as quais se mostraram, de forma geral, serem mais ativas e seletivas para as linhagens de células cancerígenas escolhidas que as quinonas da série análoga da nor- β -lapachona (classe 2). Apenas as quinonas RSL 50, RSL 151 e RSL 170 apresentaram valores de IC₅₀ superiores a 25 μ M para

todas as linhagens (exceto o composto RSL 151 na linhagem HL-60) (**Tabela 07**), sendo portanto, consideradas inativas segundo os critérios de Perez- Sacau e colaboradores (2007). As quinonas RSL 71, RSL 138, RSL 149, RSL 150 (apenas HL-60), RSL 152, RSL 154, RSL 155 apresentaram resultados de alta atividade e RSL-170 intermediário apresentou atividade moderada para as linhagens cancerígenas estudadas.

Tabela 07 Valores de IC₅₀ com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em triplicata em cinco linhagens de células cancerígenas e uma linhagem não tumoral para as quinonas da classe 8.

Linhagens/ Quinonas	MTT [IC ₅₀ µg. mL ⁻¹ (µM)]					
	SW620 (Cólon)	A549 (pulmão)	HL-60 (leucemia)	MDA-MB435 (melanoma)	SF295 (glioblastoma)	L929 (Fibroblasto murinho (não tumoral))
RSL-50	>25	>25	>25	>25	>25	>25
RSL-71	1,66 (1,45-1,79)	1,28 (0,97-1,44)	0,76 (0,64-0,93)	1,53 (1,27-1,75)	0,98 (0,75-1,13)	1,11 (0,74-1,35)
RSL-138	1,15 (0,94-1,32)	0,56 (0,48-0,69)	0,42 (0,20-0,88)	0,83 (0,71-0,98)	0,73 (0,64-0,86)	>25
RSL-149	1,50 (1,38-1,72)	1,37 (1,20-1,48)	1,18 (0,79-1,42)	1,77 (1,58-1,96)	1,36 (1,18-1,53)	>25
RSL-150	2,41 (2,30-2,68)	2,18 (1,94-2,31)	1,61 (1,37-1,84)	2,14 (1,82-2,36)	2,68 (2,57-2,81)	14,30 (13,72-15,16)
RSL-151	>25	>25	16,86 (14,28-17,41)	>25	>25	>25
RSL-152	1,17 (1,03-1,25)	1,26 (1,17-1,32)	0,79 (0,53-1,16)	1,02 (0,80-1,27)	1,42 (1,28-1,74)	14,04 (13,87-15,30)
RSL-154	0,88 (0,71-1,03)	0,72 (0,63-0,78)	0,45 (0,33-0,51)	0,60 (0,57-0,68)	0,85 (0,71-1,02)	1,06 (0,71-1,29)
RSL-155	0,64 (0,56-0,77)	0,50 (0,37-0,61)	0,47 (0,28-0,79)	0,77 (0,64-0,83)	0,49 (0,37-0,55)	12,34 (11,61-13,69)
RSL-170- intermediária	4,13 (3,74-4,38)	3,60 (3,49-3,73)	3,47 (3,05-3,62)	4,28 (3,93-4,47)	3,78 (3,21-4,37)	4,42 (3,10-5,27)
RSL-170	>25	>25	>25	>25	>25	>25

Fonte: Autora.

Com relação à seletividade dos mesmos (**Tabela 08**), o IS encontrado para os compostos avaliados nessa classe variou entre 0,67- 26,26 µg/mL. As quinonas que apresentaram melhores valores de seletividade foram: RSL 150, RSL 152 e RSL 155, sendo esta última a mais seletiva para todas as linhagens analisadas.

Tabela 08 Valores de índice de seletividade [IC_{50} (células não tumorais)/ IC_{50} (célula tumoral)] das linhagens de células anticancerígenas para as quinonas da classe 8.

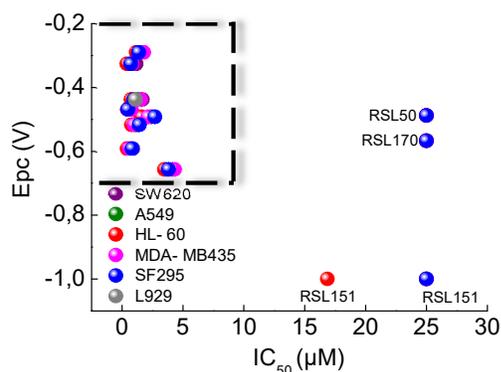
Índice de seletividade IC_{50} (células não tumorais)/ IC_{50} (célula tumoral)					
Linhagens/ Quinonas	SW620 (Cólon)	A549 (pulmão)	HL-60 (leucemia)	MDA-MB435 (melanoma)	SF295 (glioblastoma)
RSL-50	ND	ND	ND	ND	ND
RSL-71	0,67	0,87	1,46	0,73	1,13
RSL-138	ND	ND	ND	ND	ND
RSL-149	ND	ND	ND	ND	ND
RSL-150	5,93	6,56	8,88	6,68	5,34
RSL-151	ND	ND	ND	ND	ND
RSL-152	12	11,14	17,77	13,76	9,88
RSL-154	1,20	1,47	2,36	1,76	1,25
RSL-155	19,28	24,68	26,26	16,03	25,18
RSL-170- intermediária	1,07	1,22	1,27	1,03	1,17
RSL-170	ND	ND	ND	ND	ND

*ND= não definida

Fonte: Autora.

Assim como ocorreu para a classe 2, neste conjunto de quinonas também não houve uma correlação linear no gráfico (**Figura 53**), mas todas as quinonas com valores de potencial maiores que $-0,7$ V apresentaram atividade com exceção de RSL 50 e RSL 170, cujos valores de potencial (E_{pc1}) são respectivamente $-0,488$ V e $-0,567$ V. As mesmas diferem apenas por possuírem grupos eletrorretirador (nitro: RSL 50) e eletrodoador (metoxi: RSL 170) em suas estruturas, já a quinona RSL 71 com estrutura semelhante, porém sem substituintes, foi ativa. A quinona RSL 151 que se reduz em potencial mais negativo ($-1,00$ V) foi inativa em todas as linhagens cancerígenas testadas.

Figura 53 Correlação entre os potenciais de pico catódico (E_{pc1}) e a concentração inibitória mínima (IC_{50}) em cinco linhagens de células cancerígenas e uma linhagem não tumoral para as quinonas da classe 8.



Fonte: Autora.

5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana biofilme

As quinonas pertencentes à classe 2 foram testadas frente a bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*), não havendo atividade frente a estas últimas. A escolha desses dois grupos de bactérias se deu em virtude de avaliar se a atividade das quinonas estaria relacionada à presença da parede celular. Também foi avaliada a atividade frente ao fungo *C. albicans*, sendo as quinonas pouco ativas ($> 400 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente a este organismo (**Tabela 10**).

P. aeruginosa é um organismo aeróbico ubíquo considerado importante em função dos seus múltiplos mecanismos de resistência: a baixa permeabilidade da membrana externa, as bombas de efluxo que exportam para o exterior celular uma gama variada de compostos, a expressão de AmpCb-lactamase combinadas com a habilidade de aquisição de mecanismos de resistência a múltiplas drogas (ZAVASCKI *et al.*, 2010). Já *E. coli* é considerada um organismo padrão, habitante da microbiota intestinal humana, mas há cepas patogênicas, que podem causar infecções intestinais e extra- intestinais. Muitas bactérias do gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota anfibiônica da pele e superfícies mucosas de humanos dentre outra gama variada de ambientes, sendo organismos de grande adaptabilidade. A combinação entre resistência a antibióticos, virulência mediada por toxinas e invasividade conferem a *S. aureus* patogenicidade (RODE *et al.*, 2007).

Segundo Gabrielson e colaboradores (2003), a sensibilidade de um grupo de compostos não apenas varia entre os grupos de bactérias (gram-positivas e gram-negativas) como também guarda uma relação com as diferentes espécies. Dessa forma, a “impressão digital (toxic “fingerprint”) promovida por um composto ou grupo de compostos em uma cultura bacteriana depende da adaptabilidade e capacidade de resistência dos mesmos aos efeitos danosos do(s) composto(s) sobre seus processos fisiológicos (GABRIELSON *et al.*, 2003).

Em geral, a maior atividade das quinonas em bactérias e fungos está associada principalmente à lipofilicidade. Omosa e colaboradores (2016) fizeram uma série de observações de mais de 40 quinonas testadas frente a diversas cepas das mesmas bactérias utilizadas neste trabalho e houve um impressionante aumento de atividade de benzoquinonas com incremento do número de carbonos na cadeia lateral; o autor atribuiu o aumento de lipofilicidade como resposta à boa atividade. Um estudo conduzido por Bogdanov e colaboradores (1993) sugeriu que, para derivados de isoxazolilnaftoquinonas, a atividade antimicrobiana estaria relacionada ao grupamento hidroxila em posição *orto* à carbonila

quinonoídica. Já Riffel e colaboradores (2002) não observaram essa relação nas naftoquinonas estudadas e Gershon e colaboradores (1975) observaram que, nas 28 naftoquinonas testadas, apenas aquelas possuindo grupos eletrorretiradores nas posições 2 e 3 apresentaram bons valores de atividade. É consensual que em bactérias, especialmente o grupo das gram-negativas, o equilíbrio lipo-hidrofílico seja imprescindível para a boa atividade não apenas em relação a quinonas como também outros grupos de compostos (RIFFEL *et al.*, 2002). No caso das quinonas estudadas neste experimento, tioacetato tiol foi a que demonstrou melhor atividade frente a *S. aureus* seguido de benzil tiol e 4-metil tiol e 4-cloro tiol, sendo que estas duas últimas apresentaram os mesmos valores de CIM. As demais substâncias apresentaram atividade superior a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com exceção de AA Boc tiol que não apresentou qualquer atividade (**Tabela 09**). Para estas quinonas os valores de CBM foram próximos aos respectivos valores de CIM para *S. aureus*. Segundo Kuete (2010) e Kuete e colaboradores (2010) a atividade antibacteriana é definida como significativa quando os valores de CIM são inferiores a 10 $\mu\text{g/mL}$, moderada quando pertencentes ao intervalo $10 \mu\text{g/mL} < \text{CIM} < 100 \mu\text{g/mL}$ e baixa quando são valores superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$. No presente caso, apenas as quatro quinonas supracitadas tiveram atividade moderada enquanto as demais apresentaram baixa atividade ou nenhuma atividade.

Tabela 09 Valores de MIC (concentração inibitória mínima), CBM (concentração bactericida mínima) e CFM (concentração fungicida mínima) para as quinonas avaliadas.

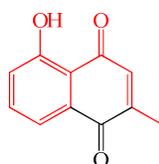
Compostos	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa e E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	
	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CFM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Benzil tiol	50 \pm 6,33	60	-	> 400	> 400
4-cloro tiol	70 \pm 1,33	80	-	> 400	> 400
4-metil tiol	70 \pm 1,42	80	-	> 400	> 400
Tioacetato tiol	30 \pm 4,1	40	-	> 400	> 400
4-metoxi tiol	> 400	> 400	-	> 400	> 400
4-fluor tiol	> 400	> 400	-	> 400	> 400
Tiofenol	> 400	> 400	-	> 400	> 400
Pentafluor tiol	> 400	> 400	-	> 400	> 400
3-metil tiol	> 400	> 400	-	> 400	> 400
Ciclohexano tiol	> 400	> 400	-	> 400	> 400
4-metil sulfanil tiol	> 400	> 400	-	> 400	> 400
AA Boc Tiol	-	-	-	> 400	> 400

Fonte: Autora.

Segundo Omosa e colaboradores (2016), grupamentos alquila em posição *orto* e *meta* à carbonila quinônica reduzem drasticamente ou mesmo eliminaram a atividade biológica.

Grupos fortemente eletrorretiradores como flúor e nitro também prejudicaram a atividade biológica, mas tal fato não procede com o cloro. Para Kuete e colaboradores (2011), empenhados em determinar o grupo farmacofórico que confere atividade biológica, investigaram uma série de flavonóides, cumarinas, xantonas e a quinona plumbagina e observaram que os efeitos estereoeletrônicos não eram tão importantes para conferir atividade frente a bactérias e sim o grupo farmacológico observado (**Figura 54**).

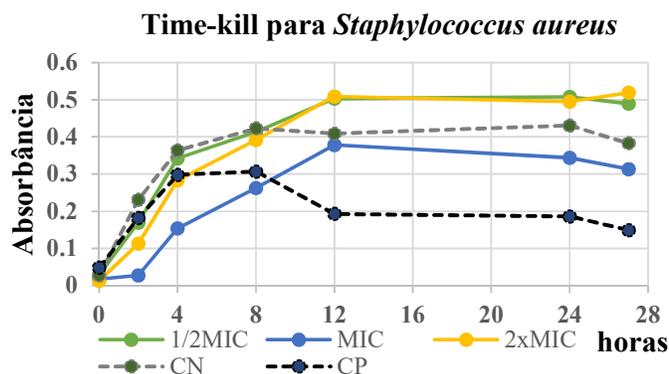
Figura 54 Estrutura da quinona plumbagina destacando, em vermelho, o grupo farmacofórico elencado por Kuete e colaboradores (2011) como responsável pela atividade biológica conferida a variados grupos de compostos estudados.



Fonte: Autora (adaptado de KUETE *et al.*, 2011).

A partir dos experimentos de CIM, escolheu-se a quinona mais ativa (tioacetato tiol), do conjunto testado, para experimentos de biofilme com determinação da curva de morte da bactéria escolhida. A determinação da curva de morte é bastante utilizada para avaliar a ação biocida sobre as células de biofilme. Apesar trabalhosa, esta técnica tem como vantagem uma imagem dinâmica da ação antimicrobiana e o seu tempo de interação e os resultados indicativos das concentrações necessárias para inibir o crescimento microbiano (PETERSEN *et al.* 2006; TONG *et al.* 2006). Pode-se observar que os resultados de avaliação do tempo de morte para a droga mostram um comportamento de efeito bacteriostático e apenas para as primeiras horas de incubação, ou seja, promove a inibição do crescimento celular sem promoção de morte em geral atuando sobre inibição de síntese proteica (**Figura 55**). Diversos antibióticos são bons agentes bacteriostáticos como a tetraciclina, os macrolídeos, sulfonamidas e oxazolidinonas, atuando sobre um amplo espectro de bactérias. Avaliando o tempo de efeito antimicrobiano, o composto apresenta efeito mais evidente apenas nas primeiras 4 horas de interação quinona-microrganismo. O crescimento microbiano depois das 4 horas de incubação pode ser compreendido pela interação do composto (2 x CIM e 1/2 x CIM) facilitando a captação de nutrientes do meio ou facilitando o desenvolvimento de aderência bacteriana.

Figura 55 Curva de tempo de morte frente a *S. aureus* submetido ao composto tioaceto tiol.



Fonte: Autora.

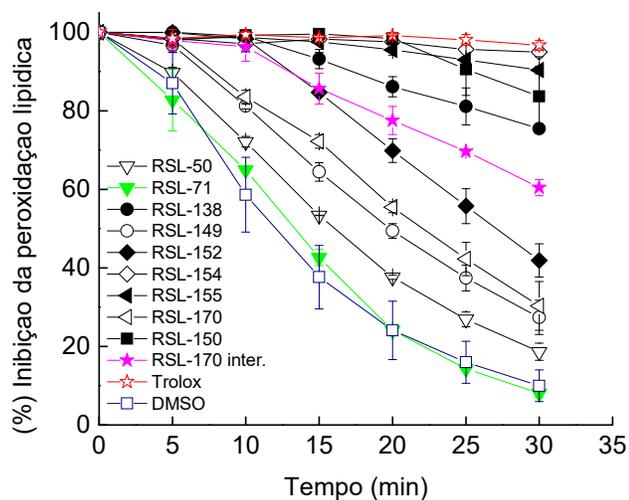
5.5 Peroxidação lipídica

Quinonas são uma das classes de compostos com grande plasticidade em sistemas biológicos, apresentando um comportamento duplo a depender do sistema em particular, podendo atuar como antioxidantes, contribuindo para a homeostase celular ou como agentes citotóxicos através da geração de EROs (PAIVA *et al.*, 2015) como já abordado anteriormente.

Modelos que mimetizam a bicamada lipídica são frequentemente utilizados para verificar se determinados compostos podem oferecer proteção contra a peroxidação lipídica, avaliando dessa forma a atividade antioxidante dos mesmos (ITOH *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante das quinonas pertencentes à classe 8 foi avaliada frente à peroxidação lipídica através da utilização de um modelo de lipoperoxidação em membrana (lipossomas unilamelares de lecitina de soja) monitorado pelo radical peroxila. A **figura 56** mostra a proteção contra a peroxidação lipídica em função do tempo, tendo sido previamente observado o comportamento do conjunto lipossoma + sonda C11- BODIPY^{581/591}+ DMSO+ AAPH (branco), da solução de trolox (controle positivo) e DMSO (controle negativo).

Figura 56 Proteção contra a peroxidação lipídica (%). (-□-) DMSO; (-*-) Trolox (1,9 mg mL⁻¹), os demais símbolos representam as amostras estudadas a 10μM.



Fonte: Autora.

Na ausência de antioxidantes, a ocorrência da peroxidação lipídica lipossomal foi induzida por AAPH, levando à perda de fluorescência. O oposto ocorreu com o controle positivo (trolox), sendo a peroxidação inibida em cerca de 95% ao final da avaliação. Apenas dois compostos (RSL 154 e RSL 155) mantiveram comportamentos bem próximos ao trolox, sendo promissores na proteção lipídica ao contrário da quinona RSL 71 cujo comportamento se assemelhou ao controle negativo. As quinonas RSL 138, RSL 170 intermediário e RSL 152 ofereceram proteção nos primeiros 10 min e a RSL 150 nos primeiros 20 min. Essa tendência de decaimento no experimento possibilita agrupar essas quinonas em subclasses.

5.6 Estudos por UV-Vis: avaliação da interação DNA-quinonas

Anterior ao estudo de interação das substâncias propostas com a macromolécula de DNA foi realizado um estudo prévio das mesmas por UV-vis com o intuito de acompanhar as bandas de absorção em função da concentração. Assim, a escolha da banda de estudo e faixa de concentração depende da solubilidade das amostras e intensidade das bandas no espectro. Esse reconhecimento inicial foi importante para estabelecer o analito que será o agente titulante, dada

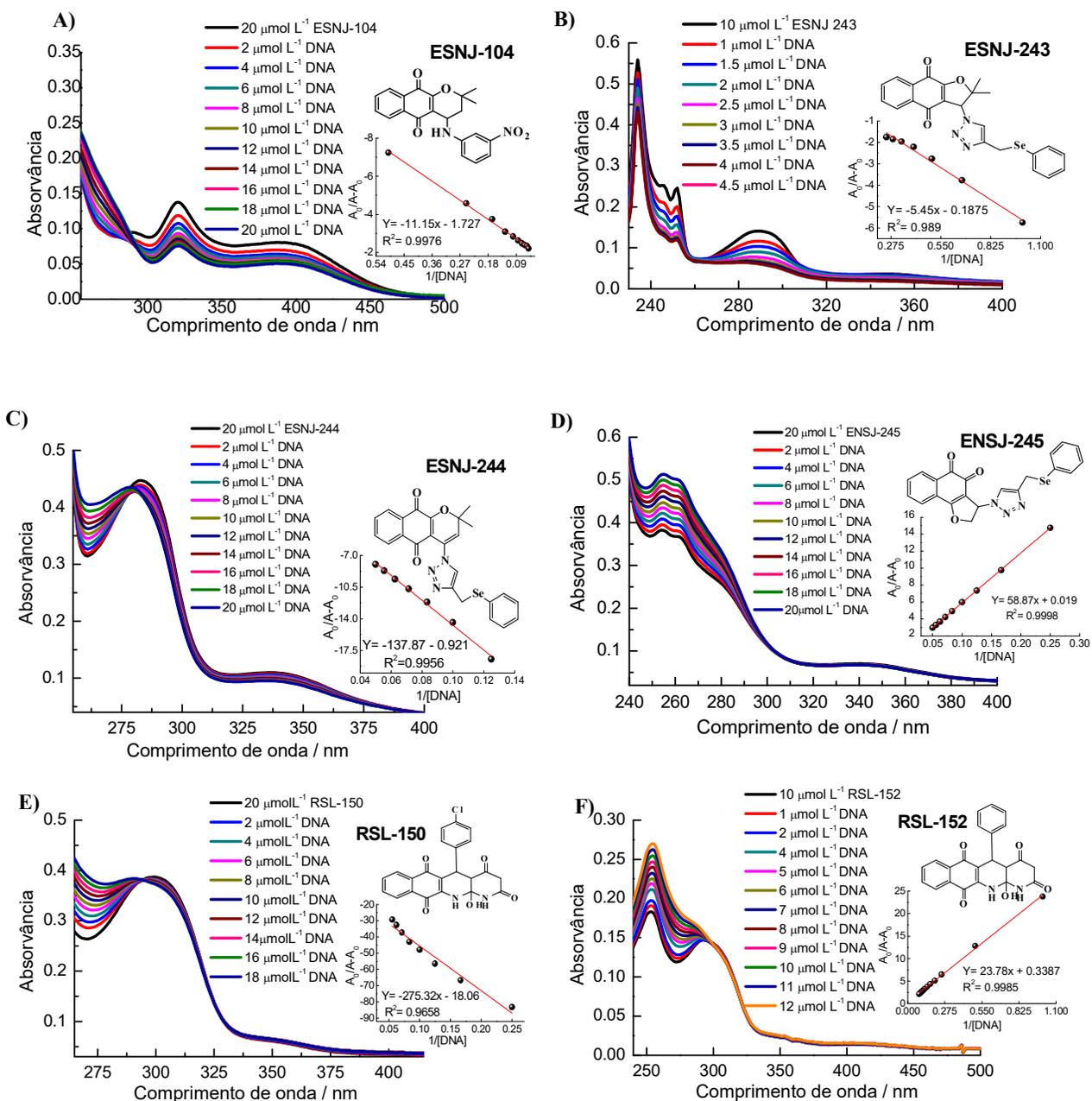
a possibilidade da técnica de titulação em UV-vis fixar ou variar o DNA dependendo do perfil espectral da substância a ser avaliada.

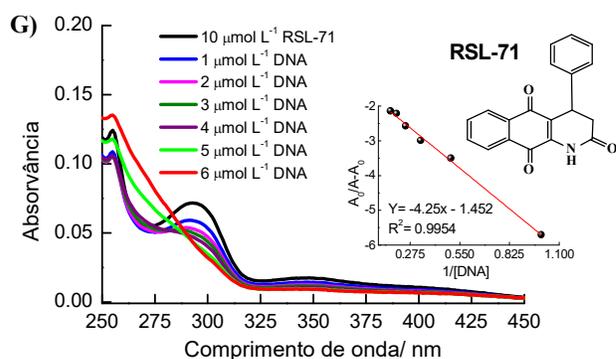
Para os estudos de interação das quinonas por UV-vis foi utilizada a equação abaixo, em que, de modo simplificado, o K_b = intercepto/slope.

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_L}{\varepsilon_{L-DNA} - \varepsilon_L} + \frac{\varepsilon_L}{\varepsilon_{L-DNA} - \varepsilon_L} \cdot \frac{1}{K_b [DNA]}$$

Os espectros de titulação por UV-vis e a regressão linear para a obtenção dos valores das constantes de ligação, com base na banda escolhida, estão demonstrados na **figura 57**, onde o agente titulante foi o ctDNA.

Figura 57 Espectros no UV-vis de quinonas sob adição de concentrações crescentes de ctDNA e seus respectivos gráficos de $A_0/A-A_0$ vs. $1/[DNA]$ (insert). **A)** Espectro da ESNJ104, $20\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 2 a $20\mu\text{mol L}^{-1}$. **B)** Espectro da ESNJ243, $10\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 1 a $4,5\mu\text{mol L}^{-1}$. **C)** Espectro da ESNJ244, $20\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 2 a $20\mu\text{mol L}^{-1}$. **D)** Espectro da ESNJ245, $20\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 2 a $20\mu\text{mol L}^{-1}$. **E)** Espectro da RSL150, $20\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 2 a $18\mu\text{mol L}^{-1}$. **F)** Espectro da RSL152, $10\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 1 a $12\mu\text{mol L}^{-1}$. **G)** Espectro da RSL71, $10\mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ctDNA de 1 a $6\mu\text{mol L}^{-1}$.





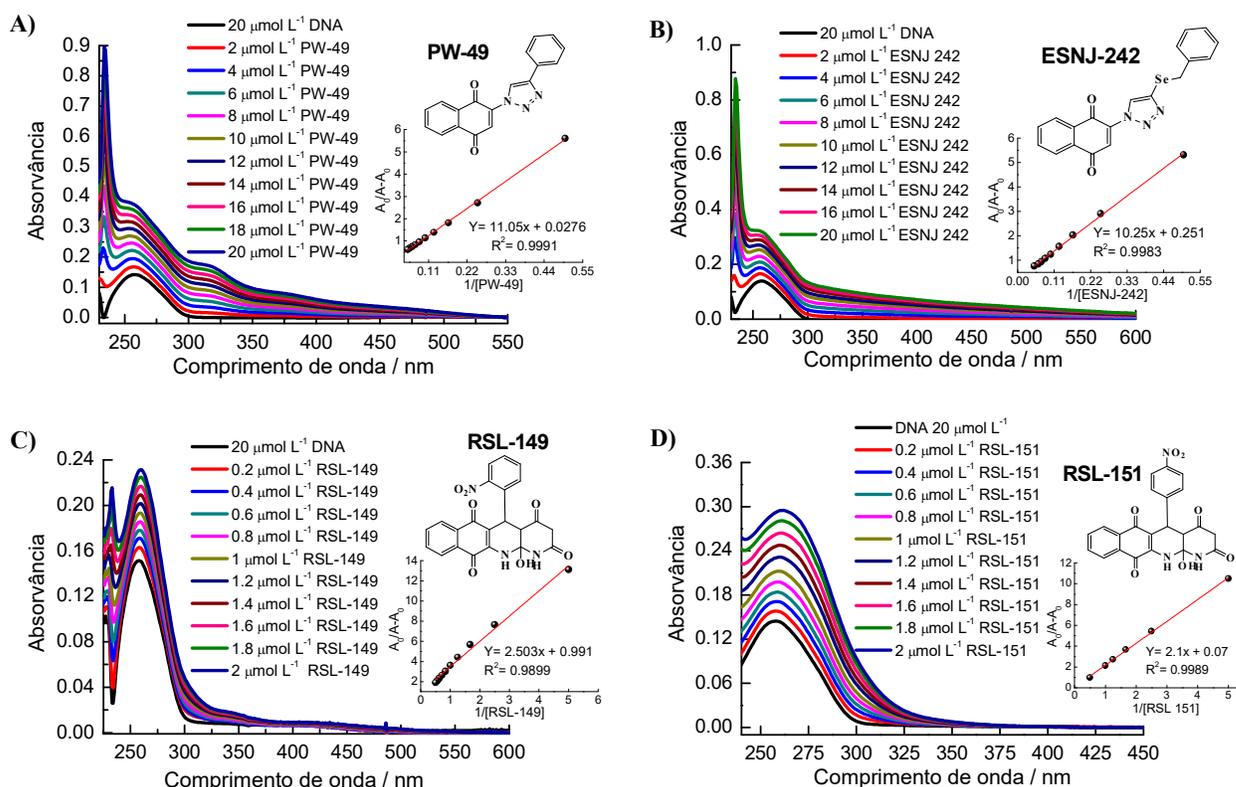
Fonte: Autora.

Dentre as quinonas escolhidas para o estudo de interação espectrofotométrica com DNA, as representadas na **figura 58**, por não apresentarem bandas bem definidas e já testadas pela metodologia anterior sem êxito, foram adicionadas em concentrações crescentes numa solução de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ctDNA, de modo que, diferentemente da figura anterior, as mudanças observadas foram no espectro de ctDNA em função das adições crescentes das diferentes quinonas.

As quinonas representadas pelas letras A, B, C, E e G (**figura 58**), exibiram efeito hipocrômico de suas bandas com a adição de concentrações crescentes de ctDNA, evidência de um complexo de interação. As quinonas ENSJ244 e RSL150, apresentaram também um deslocamento hipsocrômico nítido em comparação as demais, mais um indício de interação.

Diferentemente das anteriores, as quinonas ENSJ245 e RSL152 (**D e F figura 58**) apresentaram efeito hiperocrômico de suas bandas com a adição de concentrações crescentes de DNA. Embora a banda monitorada apresente um comprimento de onda próximo ou igual a banda II de absorção do ctDNA (260nm), é possível observar um aumento na absorção para valores maiores que a contribuição da banda do DNA. Na **tabela 11** estão expressas as intensidades das bandas de absorção, a um dado comprimento de onda, das quinonas, do DNA e do possível complexo de interação, de modo que, facilite a visualização do efeito envolvido (hiper ou hipocrômico) pela diferença de absorção entre o complexo formado em solução e a soma da absorção do DNA e da quinona.

Figura 58 Espectros no UV-vis do ctDNA sob adição de concentrações crescentes de quinonas e seus respectivos gráficos de $A_0/A-A_0$ vs. $1/[Q]$, insert. **A)** Espectro de ctDNA, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de PW49 de 2 a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. **B)** Espectro de ctDNA, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de ESNJ242 de 2 a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. **C)** Espectro de ctDNA, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de RSL149 de 0,2 a $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. **D)** Espectro de ctDNA, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ausência e presença de RSL151 de 0,2 a $2 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Autora

Como pode-se observar na **figura 58**, o DNA apresenta efeito hipercrômico quando em presença das quinonas, porém, como RSL149 e RSL151 absorvem na região do DNA foi realizada a subtração da absorção do complexo (DNA-quinona) pela soma das absorções individuais tanto do DNA como da quinona, sozinhos em solução, no intuito de comprovar que quando ambos estão juntos há uma alteração no espectro que está associada a um processo de interação entre a macromolécula e o ligante e não apenas uma contribuição da absorção dos compostos (**tabela 10**).

Tabela 10 Valores das absorvâncias das quinonas avaliadas, ctDNA e complexo formado num determinado comprimento de onda e a uma dada concentração a 25 °C.

Quinonas	λ , nm	C, μM Q/DNA	A_{quinona}	A_{ctDNA}	Comparação		ΔA
					A_{complexo}	$A_{\text{quinona}} + A_{\text{ct-DNA}}$	
ESNJ104	320	20/20	0,13762	0,00255	0,07555	0,14017	-0,06462
PW49	258	20/20	0,2450	0,137	0,386	0,382	+0,004
ESNJ242	258	20/20	0,1902	0,134	0,3252	0,3244	+0,001
ESNJ243	290	10/4,5	0,1419	0,02	0,06025	0,162	-0,1017
ESNJ244	337	20/20	0,11	0,004	0,09455	0,114	-0,01945
ESNJ245	254	20/20	0,38286	0,1401	0,5151	0,5228	0,0077
RSL71	347	10/6	0,01809	0,0043	0,0089	0,2239	-0,0135
RSL149	258	2/20	0,047	0,142	0,2315	0,189	+0,0425
RSL150	299	20/18	0,3889	0,00881	0,3728	0,39771	-0,0249
RSL151	258	2/20	0,0846	0,145	0,2954	0,2296	+0,066
RSL152	253	10/12	0,18217	0,0687	0,27	0,251	+0,019

$$\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{quinona}} + A_{\text{ct-DNA}})$$

Fonte: Autora.

De acordo com a **Tabela 10**, os valores cuja diferença de absorção foi positiva, representados na última coluna, evidenciam um efeito hiperacrômico no comprimento de onda definido para os estudos de titulação espectrofotométrica, já as variações com valores negativos caracterizam um efeito hipocrômico. As alterações na absorvância são indicativos de interação (SILVA, *et al.*, 2016).

Os valores das constantes de ligação entre as quinonas do estudo e ctDNA, calculadas a partir da regressão linear das **figuras 57 e 58**, estão representadas na **tabela 11**, assim como seus respectivos coeficientes de determinação.

Tabela 11 Valores das constantes de interação das quinonas com ctDNA por titulação espectrofotométrica a 25°C e respectivo coeficiente de determinação.

Quinonas	K_b (L mol^{-1})	R^2
PW49	$2,5 \times 10^3$	0,9991
ESNJ104	$1,55 \times 10^5$	0,9976
ESNJ242	$2,44 \times 10^4$	0,9983
ESNJ243	$3,44 \times 10^4$	0,989
ESNJ244	$6,68 \times 10^3$	0,9956
ESNJ245	$3,28 \times 10^2$	0,9998
RSL149	$3,9 \times 10^5$	0,9899
RSL150	$6,56 \times 10^4$	0,9658
RSL151	$3,33 \times 10^4$	0,9989
RSL152	$1,42 \times 10^4$	0,9985
RSL71	$3,42 \times 10^5$	0,9954

Fonte: Autora.

De acordo com a **tabela 11**, as quinonas RSL149, RSL71 e ESNJ104, apresentaram os maiores valores de K_b , indicando que estas possuem maior afinidade com a macromolécula que as demais quinonas, nas condições de realização do experimento, sendo que a ESNJ245 a de menor valor de constante, sugerindo que esta seja a molécula de menor afinidade.

Devido a técnica de espectroscopia no UV-Vis ser abrangente para estudos de interação com DNA não se pode determinar mecanismos de interação, sendo o resultado, em geral, limitado apenas a um indicativo. Para tanto, elegeu-se os estudos de fluorescência a fim de direcionar ou excluir o mecanismo de intercalação do brometo de etídio para as substâncias supracitadas.

5.6.1 Avaliação do modo de ligação

Tendo em vista que as quinonas em estudo não apresentam fluorescência, alguns ensaios com base na fluorescência do ligante não puderam ser utilizadas para elucidação do modo de interação entre os compostos propostos e o ctDNA. Dentre esses, o ensaio de avaliação do efeito de quenching do íon iodeto (I^-) do iodeto de potássio (KI), muito utilizado em função do composto ter carga negativa e ser repelido pelas cargas negativas do grupo fosfato do DNA, por este motivo este íon extingue a fluorescência de fluoróforos que estejam presentes na parte exterior da molécula, ou seja, as que interagem por groove e eletrostaticamente, e não tem acesso as moléculas intercalantes, por estarem protegidas. Assim, compara-se o valor da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) na ausência e presença de ctDNA, caso a mesma diminua com a adição de DNA é um indício de ligação por intercalação (SAVARIZ *et al.*, 2014).

Um ensaio bem estabelecido na literatura é por competição com DAPI (4', 6- diamidino-2-fenilindol, dicloridrato) ou Hoechst 33258, cujo modo de ligação é groove. Neste ensaio é observada a interferência de adições crescentes do ligante no espectro desses compostos ligados ao DNA, quando há competição pela ligação groove a intensidade de fluorescência diminui com o aumento da concentração do ligante (HEGDE *et al.*, 2012; VUJCI *et al.*, 2013). Quando o ligante é fluorescente a competição é avaliada pela adição de Hoechst ou DAPI e consequente diminuição da fluorescência do ligante avaliado.

A estratégia escolhida foi o uso do brometo de etídio (BE), clássico intercalador, utilizado como sonda. Ao se intercalar entre os pares de bases da dupla hélice de DNA, o complexo formado é estabilizado pela interação por empilhamento entre as bases e o BE

(HEGDE *et al.*, 2012). Esta propriedade somada ao fato de que a fluorescência do BE aumenta 24 vezes na presença de DNA é o fundamento da metodologia, já que esta fluorescência pode ser neutralizada, pelo menos em parte, pela adição de uma segunda molécula que compete pelo mesmo sítio. O grau de inibição da fluorescência do BE ligado ao DNA foi utilizado para determinar o modo de ligação entre a quinona e o DNA.

É importante ressaltar que o ctDNA utilizado não apresenta uma sequência de bases seletiva sendo a proporção AT 58% e a GC 42%, dados do fabricante, e que para se obter o aumento de seletividade para uma dada classe de compostos em que os mesmos possam ser empregados com finalidades farmacêuticas ou analíticas seria interessante empregar um DNA sintético com uma proporção de bases de interesse ou de algum organismo em se conheça a sequência dominante.

5.6.2 Avaliação da interação DNA-quinona por fluorescência molecular

Para determinar o valor da constante de Stern-Volmer, empregou-se a seguinte equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q]$$

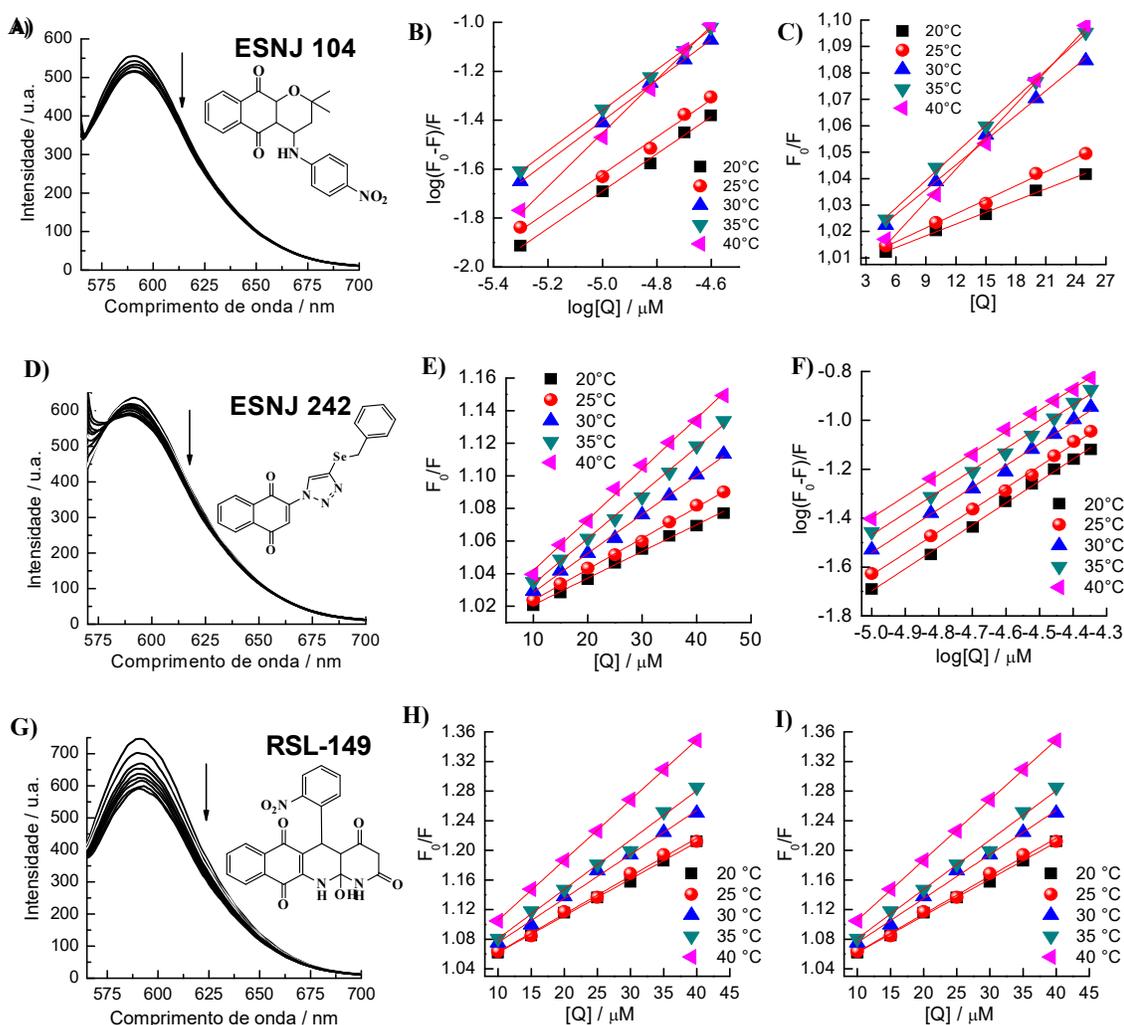
onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença da quinona, respectivamente e $[Q]$ é a concentração da quinona. K_{sv} é a constante de quenching, que pode ser obtida por meio do coeficiente angular do gráfico F_0/F vs $[Q]$.

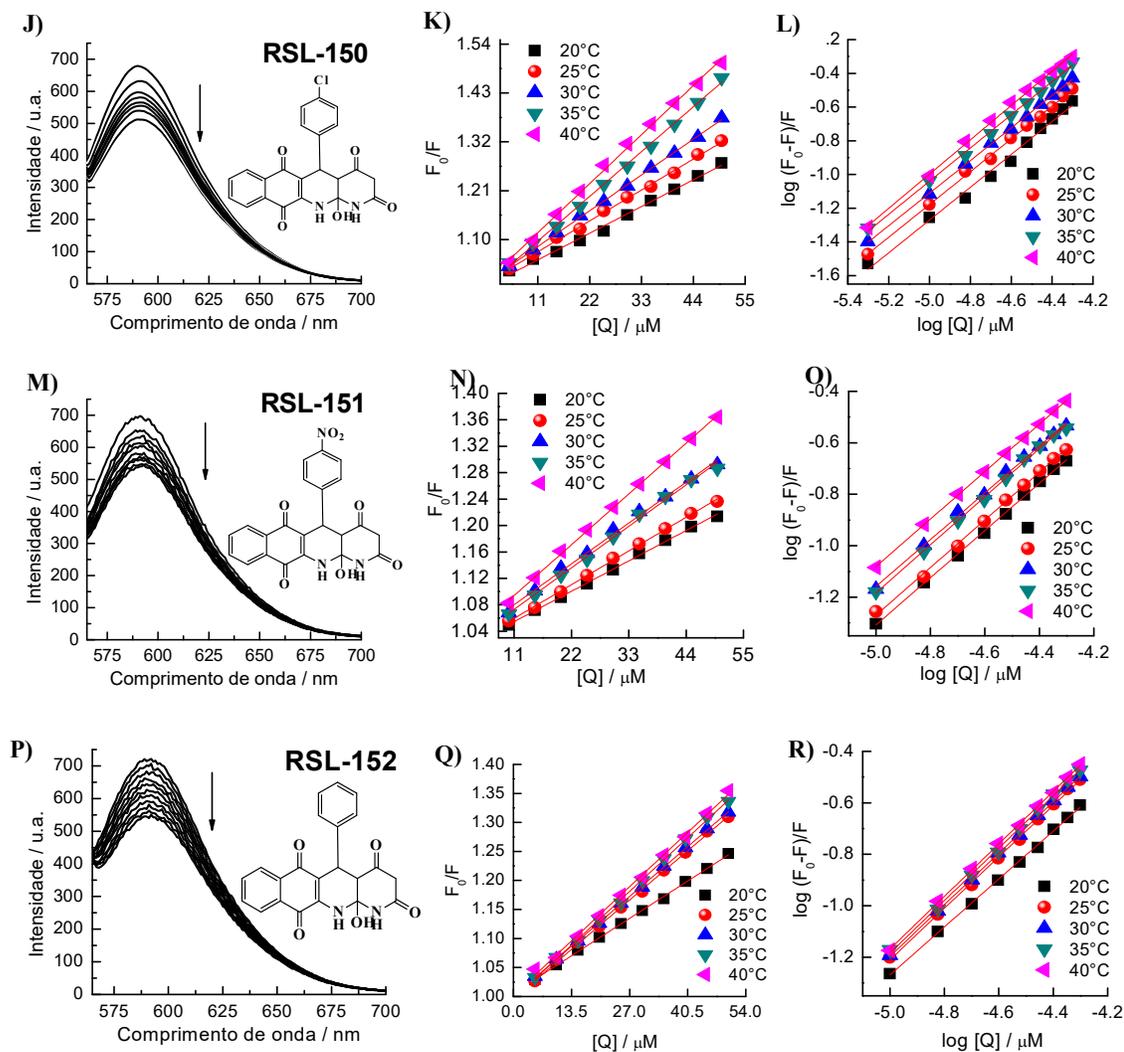
O cálculo da constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) do complexo supramolecular formado, entre as quinonas avaliadas e ctDNA, foi realizado a partir de uma titulação fluorimétrica (PLSIKOVA *et al.*, 2012). Estes parâmetros foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q]$$

A partir da curva de $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$ se obtém os valores de K_b (antilogaritmo do coeficiente linear) e n (coeficiente angular). A **Figura 59**, apresenta os espectros de emissão do complexo BE-ctDNA na ausência e presença de incrementos crescentes das quinonas e os perfis das curvas a partir da linearização das equações citadas acima, respectivamente no $\lambda_{em.} = 595$ nm, após excitar em 546 nm e ler na faixa de emissão de 565–700 nm (JENKINS, 1997).

Figura 59 Titulação fluorimétrica de quinonas em complexo BE- ctDNA ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl pH 7,4, a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. **A)** Perfil espectral em presença de ESNJ104 ($5 - 25 \mu\text{mol L}^{-1}$); **B)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **C)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **D)** Perfil espectral em presença de ESNJ242 ($10 - 45 \mu\text{mol L}^{-1}$); **E)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **F)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **G)** Perfil espectral em presença de RSL149 ($10 - 40 \mu\text{mol L}^{-1}$); **H)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **I)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **J)** Perfil espectral em presença de RSL150 ($5 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$); **K)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **L)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **M)** Perfil espectral em presença de RSL151 ($10 - 45 \mu\text{mol L}^{-1}$); **N)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **O)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$; **P)** Perfil espectral em presença de RSL152 ($5 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$); **Q)** Gráfico de F_0/F vs $[Q]$; **R)** Curva $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[Q]$.





Fonte: Autora.

A **Figura 59** representa a avaliação da interação quinona-DNA por competição com BE, por fluorescência molecular. Os espectros demonstram uma diminuição da emissão de fluorescência do complexo BE-ctDNA com as adições das quinonas ao meio. O gráfico de Stern-Volmer para quinona fornece dados sobre o processo de quenching, enquanto que a curva logarítmica dupla é utilizada para o cálculo da constante de ligação das quinonas com o ctDNA.

Empregou-se um excesso de 5 a 50 vezes das quinonas em relação à BE inicial, obtendo-se reduções de 7,58% a 24,9% do sinal, como apresentado na **Tabela 12**. Segundo Ling e colaboradores (2008), se a redução do sinal de fluorescência para o excesso empregado não chegar a 50% de redução do sinal, é um indicativo que a interação não ocorre de forma similar ao BE.

Tabela 12 Valores das constantes de quenching das quinonas com o ctDNA por competição com o brometo de etídio (BE) e correspondente decréscimo na fluorescência a 25°C.

Quinonas	K _{sv} (L mol ⁻¹)	BE-ctDNA
		Decréscimo do sinal de fluorescência (%)
ESNJ104	1,8 x 10 ³	7,58
ESNJ242	1,9 x 10 ³	8,26
RSL149	5,12 x 10 ³	20,94
RSL150	6,32 x 10 ³	24,71
RSL151	4,6 x 10 ³	23,2
RSL152	6,3 x 10 ³	24,9

Fonte: Autora.

A **tabela 12** também exibe baixos valores de constante de Stern-Volmer, quando comparados a outras moléculas intercaladoras citadas na literatura que se utiliza do mesmo ensaio (SILVA *et al*, 2013; VASCONCELLOS *et al*, 2016). Assim, há a possibilidade da interação entre as quinonas e o ctDNA ser por groove ou eletrostática, para tanto, faz-se necessário a análise dos dados termodinâmicos das quinonas obtidos do gráfico da regressão linear de $\ln K_b$ vs $1/T$, expresso na **figura 60**, utilizando a equação de Van't Hoff:

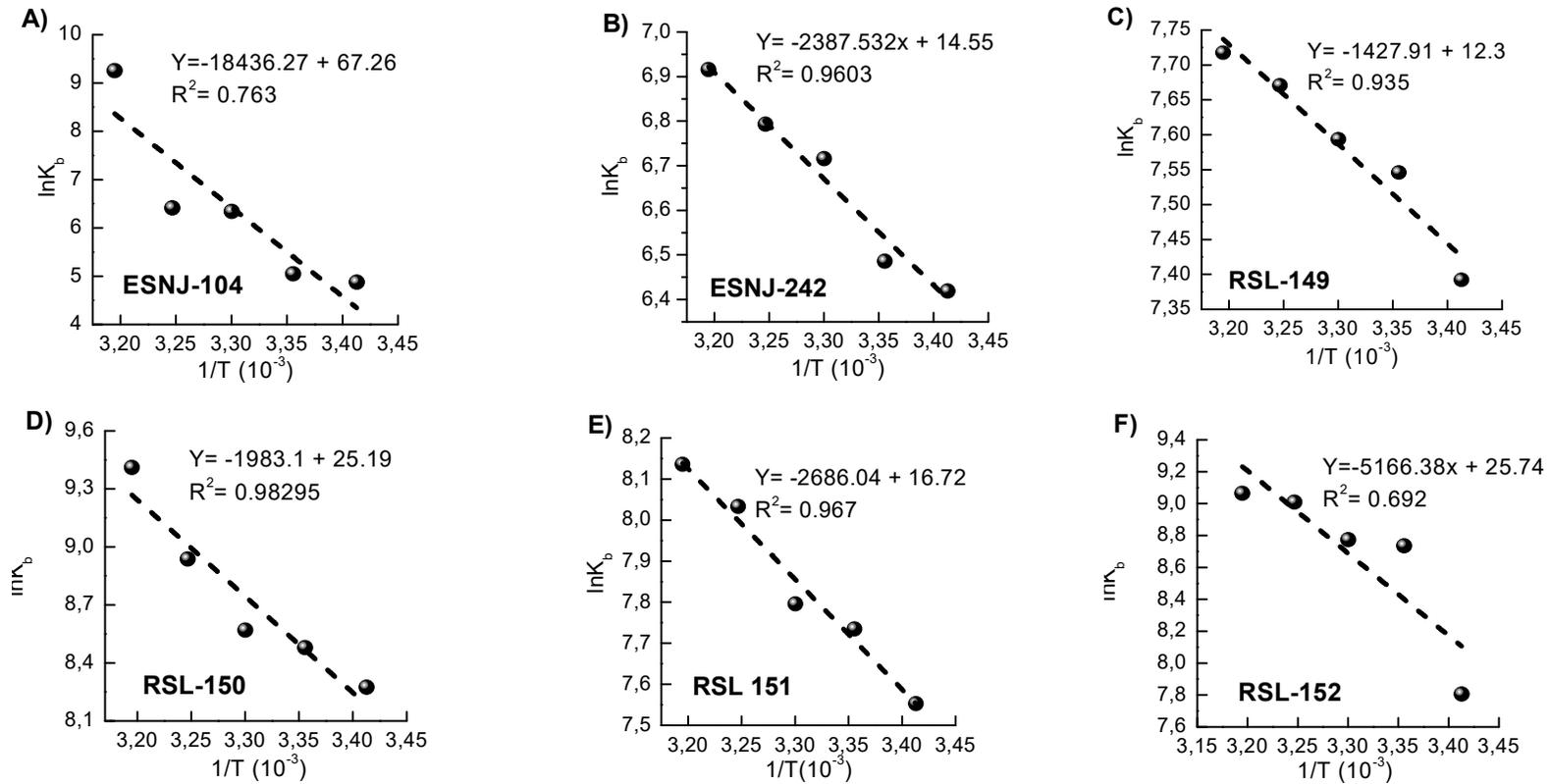
$$\ln K_b = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$$

em que R é a constante dos gases (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹). Com base nas constantes de ligação a cinco diferentes temperaturas, a energia livre de Gibbs para o complexo ctDNA- quinona pode ser calculada por meio da equação:

$$\Delta G = -RT \ln K_b = \Delta H - T\Delta S$$

A **Tabela 13** mostra os valores de constante de Stern-Volmer, constante de ligação, número de sítios de ligação, seus respectivos coeficientes de determinação, bem como, energia de Gibbs, entalpia e entropia, resultados obtidos para as quinonas supracitadas, a cinco temperaturas distintas

Figura 60 Regressão linear de $\ln K_b$ vs $1/T$, para obtenção dos parâmetros termodinâmicos. **A)** Quinona ESNJ104; **B)** Quinona ESNJ242; **C)** Quinona RSL149; **D)** Quinona RSL150; **E)** Quinona RSL151 e **F)** Quinona RSL152.



Fonte: Autora.

Tabela 13 Parâmetros de interação do ctDNA com as quinonas a 20, 25, 30, 35 e 40°C.

Quinonas	Temperatura (°C)	Constante de Stern Volmer		Parâmetro de ligação			Parâmetros termodinâmicos		
		K_{sv} (L mol ⁻¹)	R ²	K_b (L mol ⁻¹)	n	R ²	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
ESNJ104	20°C	$1,48 \times 10^3$	0,9958	$1,3 \times 10^2$	0,76126	0,995	-10,5761	153,28	559,23
	25°C	$1,77 \times 10^3$	0,9895	$1,55 \times 10^2$	0,76275	0,9895	-13,3723		
	30°C	$3,12 \times 10^3$	0,9968	$5,67 \times 10^2$	0,83116	0,9992	-16,1684		
	35°C	$3,48 \times 10^3$	0,998	$6,1 \times 10^2$	0,8289	0,9986	-18,9646		
	40°C	$4,11 \times 10^3$	0,995	$1,04 \times 10^3$	1,09398	0,9968	-21,7607		
ESNJ242	20°C	$1,64 \times 10^3$	0,9967	$6,13 \times 10^2$	0,89688	0,995	-15,5934	19,85	120,97
	25°C	$1,9 \times 10^3$	0,998	$6,55 \times 10^2$	0,88981	0,9987	-16,1982		
	30°C	$2,4 \times 10^3$	0,9978	$8,25 \times 10^2$	0,89157	0,9977	-16,803		
	35°C	$2,8 \times 10^3$	0,997	$8,91 \times 10^2$	0,8837	0,9978	-17,4079		
	40°C	$3,11 \times 10^3$	0,9967	$1,01 \times 10^3$	0,8803	0,9958	-18,0127		
RSL149	20°C	$4,96 \times 10^3$	0,9944	$1,62 \times 10^3$	0,885	0,9947	-18,0885	11,872	102,25
	25°C	$5,12 \times 10^3$	0,9895	$1,89 \times 10^3$	0,897	0,997	-18,5998		
	30°C	$5,95 \times 10^3$	0,9998	$1,98 \times 10^3$	0,8859	0,9924	-19,111		
	35°C	$6,65 \times 10^3$	0,9974	$2,14 \times 10^3$	0,8847	0,9994	-19,6223		
	40°C	$8,12 \times 10^3$	0,9946	$2,25 \times 10^3$	0,8672	0,998	-20,1336		
RSL150	20°C	$5,46 \times 10^3$	0,9937	$3,92 \times 10^3$	0,97272	0,9905	-19,9313	41,429	209,4225
	25°C	$6,32 \times 10^3$	0,99756	$4,81 \times 10^3$	0,97207	0,9981	-20,9784		
	30°C	$7,32 \times 10^3$	0,9995	$5,27 \times 10^3$	0,96646	0,99968	-22,0255		
	35°C	$9,16 \times 10^3$	0,9983	$7,61 \times 10^3$	0,98415	0,9982	-23,0726		
	40°C	$10,03 \times 10^3$	0,9975	$12,22 \times 10^3$	1,01692	0,9982	-24,1198		
RSL151	20°C	$4,1 \times 10^3$	0,9985	$1,9 \times 10^3$	0,91758	0,99902	-26,7121	14,018	139,01
	25°C	$4,6 \times 10^3$	0,9986	$2,28 \times 10^3$	0,92583	0,9982	-27,4071		
	30°C	$5,6 \times 10^3$	0,9952	$2,4 \times 10^3$	0,90876	0,9976	-28,1022		
	35°C	$5,7 \times 10^3$	0,9955	$3,08 \times 10^3$	0,9344	0,9984	-28,7972		
	40°C	$6,9 \times 10^3$	0,9991	$3,41 \times 10^3$	0,9228	0,99986	-29,4923		
RSL152	20°C	$4,77 \times 10^3$	0,9996	$2,45 \times 10^3$	0,93176	0,9989	-19,7433	42,95	213,98
	25°C	$6,29 \times 10^3$	0,9989	$6,22 \times 10^3$	1,00079	0,9988	-20,8132		
	30°C	$6,36 \times 10^3$	0,9976	$6,45 \times 10^3$	1,0025	0,9997	-21,8831		
	35°C	$6,85 \times 10^3$	0,9992	$8,17 \times 10^3$	1,01922	0,9985	-22,9531		
	40°C	$6,92 \times 10^3$	0,999	$8,64 \times 10^3$	1,0209	0,9995	-24,023		

Fonte: Autora.

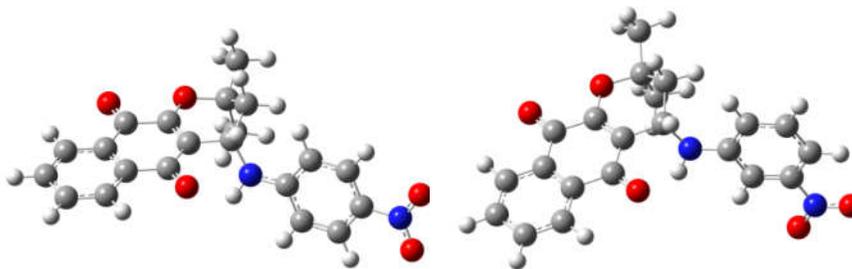
Mediante os valores de entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia de Gibbs (ΔG) podemos inferir sobre o mecanismo de ligação do complexo DNA- ligante. Os parâmetros termodinâmicos obtidos do estudo da interação das quinonas com ctDNA revelaram um processo espontâneo, dado o ΔG apresentar valores negativos, o modo de ligação ser groove, devido as forças que estabilizam a ligação serem majoritariamente interações hidrofóbicas pois a entalpia e entropia apresentarem valores positivos (SHAHABADI *et al.*, 2013). Em todos os casos as constantes de ligação do complexo ctDNA-quinona aumentam com o aumento da temperatura, aumentando a estabilidade do sistema.

De acordo com os resultados obtidos nas diferentes temperaturas estudadas (20, 25, 30, 35, 40 °C) percebeu-se que K_{SV} aumenta com o incremento da temperatura. Com o aumento da temperatura há um maior número de choques e o aumento do valor da constante de Stern-Volmer é um indicativo do favorecimento da formação do complexo quando há colisão entre o inibidor, ligante e o fluoróforo durante o tempo de vida no estado excitado com adição de energia, temperatura, ao sistema. Desta forma, a interação é por quenching dinâmico e não estático (ZHANG *et al.*, 2009).

5.7 Cálculos estruturais eletrônicos e análise de sítios de captura de elétrons

Esse estudo foi direcionado apenas para as nitroquinonas ESNJ104 e ESNJ 110 (**Figura 61**). Como mencionado na metodologia, tais quinonas foram pré-otimizadas utilizando o funcional M06-2X e o conjunto de base 6-31G e em seguida otimizadas. As estruturas otimizadas dessas moléculas são mostradas na figura abaixo, referidas no texto como mol01 e mol02 respectivamente para (ESNJ 110) e metanitroquinonas (ESNJ104).

Figura 61 Estruturas das nitroquinonas ESNJ110 e ESNJ 104 referidas no texto como Mol01 e Mol02 otimizadas com M06-2X/6-31G.



Fonte: Autora.

Para a etapa de otimização foi investigado qual seria o funcional mais apropriado para lidar com tais sistemas. No caso das quinonas (neutras e reduzidas), é necessário utilizar funcionais adequados para tratar ânions, radicais e birradicais. Muitos trabalhos na literatura utilizam os funcionais B3LYP, BLYP ou PBE (IKRYANNIKOVA *et al.*, 2004; D'AURIA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; BACHMAN *et al.*, 2014; ER *et al.*, 2015). Provavelmente, a preferência por tais funcionais pode estar mais relacionada a sua "ampla aplicação" do que a eficiência dos mesmos para lidar com radicais.

De acordo com Peveratti (2014) o efeito da troca Hartree-Fock tem grande influência em sistemas multi-referência como os birradicalares. Em geral, funcionais locais com pouca (ou nenhuma) Troca Hartree-Fock seriam os mais adequados para lidar com esses sistemas. Na avaliação feita no próprio artigo, o funcional com melhor desempenho seria o M11-L.

Outra possibilidade seria usar o funcional BHandHLYP, já utilizado em artigos anteriores para essas espécies (ARMENDÁRIZ-VIDALES *et al.*, 2014). Uma pesquisa bibliográfica revelou que o desempenho do funcional foi bem avaliado para cálculos com aminoácidos (WU *et al.*, 2009), interações não-ligadas (ZHAO *et al.*, 2005) e propriedades elétricas (do NaCl) (MAROULIS *et al.*, 2013). Mas não fica claro se também seria eficiente para radicais e dirradicais.

Dessa forma, foi escolhido o funcional M11-L e o grupo de funções de base 6-31+G(d,p) para as etapas de otimização e frequência. O efeito do solvente (DMF) foi considerado de forma implícita através do modelo contínuo PCM (TOMASI *et al.*, 2005). Inicialmente foram tratadas as moléculas neutras (carga 0) e com multiplicidade 1 (estado singleto). Para cada redução, foram feitos novos cálculos usando o mesmo funcional, conjunto de funções de base e solvente implícito; porém diminuindo a carga e considerando as diferentes possibilidades de multiplicidade, como mostra a **tabela 14**.

Tabela 14 Combinações de Carga e Multiplicidade usados nos cálculos de Mol01 e Mol02.

	Carga	Possíveis Multiplicidades
Molécula Neutra	0	Singleto
1ª Redução	-1	Dubleto
2ª Redução	-2	Singleto ou Triplete
3ª Redução	-3	Dubleto ou Quarteto

Fonte: Autora.

Percebe-se pela tabela anterior, que dois estados de spin são possíveis para os compostos que sofreram duas ou três reduções. Para avaliar qual dos estados é o mais provável em cada redução, avaliou-se a energia livre de formação de cada estrutura, contabilizando as contribuições térmicas e eletrônicas. O resultado é mostrado na **tabela 15**.

Tabela 15 Energias livres de formação das estruturas Mol01 e Mol02 após a segunda e terceira redução em kcal/mol.

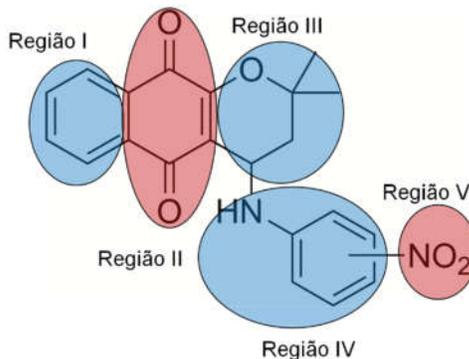
Segunda Redução			$\Delta G_{\text{Singleto-Tripleto}}$
	Singleto	Tripleto	
Mol01	-813429.7044	-813429.8412	0.1368
Mol02	-813429.5632	-813428.1790	-1.3843
Terceira Redução			$\Delta G_{\text{Dubleto-Quarteto}}$
	Dubleto	Quarteto	
Mol01	-813494.8958	-813463.5667	-31.3290
Mol02	-813492.1284	-813462.6819	-29.4465

Fonte: Autora.

Para Mol01, o estado de mais baixa energia após a segunda redução é um tripleto, enquanto para Mol02 é um singleto. Esses resultados sugerem que em Mol02 o elétron da segunda redução é adicionado ao mesmo orbital da primeira, portanto o emparelhamento dos elétrons daria origem a um diânion de camada fechada. Já em Mol01, os elétrons da primeira e segunda reduções estão em orbitais diferentes, o que caracteriza o estado tripleto; a espécie seria, portanto, um diânion dirradical.

De forma a facilitar a análise, as estruturas dos compostos foram divididas em regiões como mostra a figura a seguir. As Regiões II e V correspondem ao anel quinona e ao grupo nitro respectivamente, e são sítios de redução comuns em vários sistemas. As Regiões I e III correspondem aos anéis adjacentes ao anel quinona, mas excluindo os átomos de carbono que já estão inclusos na Região II. Finalmente, a Região IV corresponde ao anel aromático ao qual o grupo nitro está ligado (**Figura 62**).

Figura 62 Estrutura de Mol01 e Mol02 dividida em regiões.



Fonte: Autora.

Como forma de entender melhor as mudanças nas estruturas eletrônicas de Mol01 e Mol02 com as reduções, as cargas atômicas dos átomos foram calculadas usando o modelo QTAIM (do inglês, *Quantum Theory of Atoms in Molecules*) para os compostos neutros e reduzidos. As diferenças de cargas líquidas entre uma etapa da redução e a anterior foram calculadas para cada região e usadas como parâmetro para caracterizar o sítio de redução. Essas diferenças são mostradas na **tabela 16**.

Tabela 16 Diferenças de Cargas Líquidas de Região das estruturas Mol01 e Mol02 para cada etapa de redução.

	Regiões	(Red01)- (Red00)	(Red02)- (Red01)	(Red03)- (Red02)
Mol01	I	-0,268	-0,025	-0,221
	II	-0,5502	-0,046	-0,509
	III	-0,105	-0,032	-0,101
	IV	-0,028	-0,234	-0,050
	V	-0,045	-0,664	-0,119
Mol02	I	-0,282	-0,122	-0,263
	II	-0,580	-0,269	-0,598
	III	-0,110	-0,097	-0,110
	IV	-0,002	-0,176	-0,018
	V	-0,026	-0,339	-0,014

Fonte: Autora.

Os dados da **tabela 16** mostram que, em ambas as estruturas, a diferença de carga na primeira redução é concentrada no grupo quinona (Região II), com uma participação menor do anel aromático adjacente (Região I), sugerindo que este seja o sítio da redução.

Já na segunda redução, a diferença de carga é concentrada no grupo nitro (Região V) para Mol01, mas para Mol02 as diferenças de cargas nos grupos quinona (Região II) e nitro (Região V) são valores considerados próximos (-0,269 e -0,339 respectivamente). Talvez uma possível explicação é a redução ocorrer em torno do grupo nitro, mas a estrutura ser estabilizada por delocalização ou transferência de carga. Para a terceira redução, novamente a maior alteração de carga fica em torno da naftoquinona (Regiões I e II) tanto em Mol01 quanto em Mol02, indício de que este seja o sítio desta redução.

5.8 QSAR

Foram modeladas mais de 23 estruturas pertencentes a este trabalho e já publicadas (DIOGO *et al.*, 2013), porém apenas aquelas com atividade biológica definida, requisito para os estudos de QSAR, foram utilizadas para a construção dos modelos, resultando em um conjunto de 15 quinonas (**Tabela 3**). As moléculas foram inicialmente pré-otimizadas utilizando método semi-empírico AM1 seguida de uma otimização mais rigorosa (DFT, funcional M06-2X e o conjunto de bases 6-311+g(d,p)), na presença e ausência do solvente DMF sendo possível obter, para ambos os casos, diversos descritores químico-quântico, eletrônicos e estruturais como momento dipolar, polarizabilidade, energias dos orbitais de fronteira dentre outros (utilizando o programa Gaussian 0.9) além dos mais de 1437 descritores estruturais e topológicos 2D e 3D fornecidos pela plataforma on-line E-dragon.

A plataforma on-line E-Dragon permite a obtenção prática e rápida de descritores moleculares os quais estão organizados em 20 diferentes blocos compondo descritores de natureza diversa: constitucionais como massa molecular e número de átomos; geométricos como índice de aromaticidade; topológicos como a soma das áreas superficiais dos átomos polares e propriedades moleculares como estimativa acerca da regra dos cinco de Lipinski. Pode-se obter valores para cerca de 1.600 descritores diferentes (TETKO *et al.*, 2005; VCCLAB, 2016).

Em seguida decorreu a seleção de variáveis para o processo de construção do modelo. Essa etapa é importante uma vez que se elimina os temas não relevantes na modelagem bem como características potenciais dos interferentes e gera-se um subconjunto com um número melhor de variáveis (COSTA FILHO *et al.*, 2002). A partir da matriz com mais de 1400 descritores, eliminou-se aqueles com coeficiente de correlação de Pearson com o vetor de

atividades biológicas inferior a 0,3 bem como os descritores que possuíam correlações entre si maiores do que 0,9, a fim de diminuir a colinearidade dos dados (MARTINS *et al.*, 2013) totalizando oito descritores para os modelos (com/sem solvente DMF) os quais foram submetidos ao algoritmo de seleção de preditores ordenados OPS (“ordered predictors selection”) pela operação de pré-processamento por autoescalonamento com o intuito de nivelar os mesmos em importância de análise. Tal algoritmo efetua seleção de variáveis baseado em em descritores os quais otimizam a correlação com a variável dependente (MARTINS *et al.*, 2013). Em seguida, sucessivas regressões PLS (“partial least squares”) são realizadas com um número crescente de descritores até que se encontre o melhor modelo com base em parâmetros estatístico (MARTINS *et al.*, 2013). Neste trabalho, o vetor de regressão foi utilizado como vetor informativo e o coeficiente de determinação da validação cruzada leave-one-out (LOO), q^2 , como critério de seleção. Os descritores selecionados segundo OPS para os melhores modelos seguem na **tabela 17**.

Tabela 17 Descritores selecionados com OPS para o melhor modelo correlacionado com a atividade biológica sem solvente e com solvente.

Quinonas	SEM SOLVENTE			COM SOLVENTE				
	Mor27u	HATS2p	Mor32e	Mor22e	HATS2p	GATS3v	MATS2m	DISPv
1	-0,412	0,142	-0,163	0,090	0,146	1,110	3,448	-0,074
2	-0,476	0,119	-0,261	-0,269	0,120	1,034	8,456	-0,092
3	-0,169	0,128	-0,429	-0,082	0,128	1,013	3,619	-0,143
4	-0,265	0,127	-0,245	0,001	0,126	0,992	5,101	-0,037
5	-0,271	0,126	-0,247	0,146	0,125	1,039	8,015	-0,129
6	-0,384	0,138	-0,309	0,186	0,137	1,050	6,108	-0,139
7	-0,444	0,137	-0,338	-0,050	0,136	0,973	5,459	-0,120
8	-0,417	0,117	-0,480	-0,246	0,117	0,994	8,742	-0,144
9	-0,430	0,143	-0,424	0,068	0,142	1,025	8,873	-0,118
10	-0,396	0,158	-0,452	0,066	0,154	1,018	6,482	-0,100
11	-0,489	0,117	-0,441	-0,180	0,115	0,944	12,127	-0,124
12	-0,392	0,128	0,445	0,125	0,126	1,018	11,284	-0,111
13	-0,357	0,132	-0,585	-0,049	0,130	1,018	10,514	-0,111
14	-0,521	0,135	-0,526	-0,277	0,135	0,889	7,249	-0,166
15	-0,688	0,142	-0,622	0,009	0,140	0,917	8,342	-0,131

Fonte: Autora.

A validação cruzada leave-one-out (LOO), também denominada validação interna, consiste em excluir sucessivamente uma amostra por vez do conjunto de treinamento, construir um modelo sem a mesma, e então realizar a previsão para a amostra excluída, sendo tal procedimento feito quantas vezes for o número de amostras do conjunto. A diferença entre o valor experimental e o estimado para as amostras retiradas são importantes para calcular o erro padrão da validação cruzada (SEV, standard error of validation) e o coeficiente de correlação

da validação LOO (q^2_{LOO}). O modelo com todas as n amostras é expresso em termos do coeficiente de correlação de determinação múltipla (R^2) e o erro padrão de calibração (SEC, standard error of calibration) (MARTINS *et al.*, 2013).

Os parâmetros estatísticos da regressão PLS para os melhores modelos são apresentados nas **Tabelas 18 e 19**. A validação cruzada foi obtida excluindo-se uma amostra por vez (LOO). O número ideal de variáveis latentes (VL) é dois para o modelo sem DMF e um para o modelo de atividade biológica com solvente uma vez que apresentaram os menores valores de PRESS (Soma dos Quadrados dos Erros de Predição) e SEV (Erro Padrão de Validação). Os coeficientes de correlação obtidos para os modelos sem solvente foram $q^2_{\text{Ativi. Biol}} = 0,80$ e $r^2 = 0,92$ (para atividade biológica sem solvente) e $q^2_{\text{Ativi. Biol}} = 0,68$ e $r^2 = 0,78$ (para atividade biológica com solvente).

Tabela 18 Parâmetros estatísticos obtidos com a regressão PLS (modelo de atividade sem solvente).

Variáveis latentes	SEV	PRESS	q^2	r^2	SEC
1	0,24185	0,877368	0,726628	0,857363	0,186870
2	0,206492	0,639582	0,801365	0,926389	0,165772
3	0,211814	0,67298	0,793623	0,898211	0,171614

Fonte: Autora

Tabela 19 Parâmetros estatísticos obtidos com a regressão PLS (modelo de atividade com solvente).

Variáveis latentes	SEV	PRESS	q^2	r^2	SEC
1	0,264618	1,050340	0,682375	0,788713	0,2277437
2	0,321647	1,551854	0,562454	0,797631	0,231674
3	0,323889	1,573562	0,561444	0,798626	0,241380

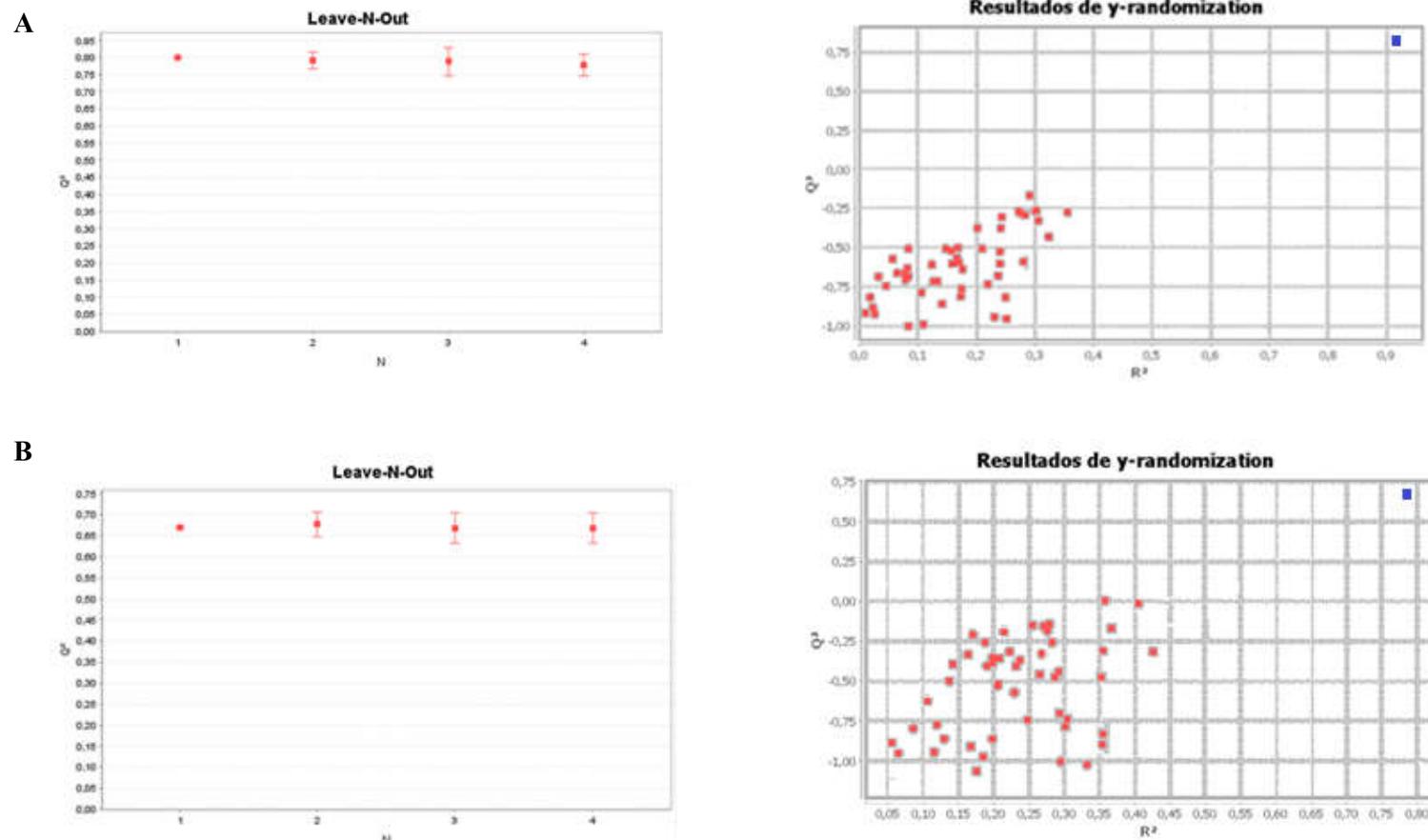
Fonte: Autora.

Os modelos obtidos foram submetidos aos testes de validação cruzada leave-N-out e Y-randomization, realizados para avaliar a robustez e a estabilidade dos modelos PLS. No primeiro, N compostos são retirados do conjunto de treinamento para serem usados numa validação cruzada para o modelo PLS. Neste caso, para cada N , os dados foram aleatorizados cinco vezes e os valores médios de q^2 foram tomados para a comparação com o q^2 obtido pela validação cruzada leave-one-out (LOO). Nessa etapa é possível escolher alguns parâmetros como número de variáveis latentes, de repetições em cada validação e de amostras passíveis de

remoção durante o processo. É recomendável que N represente pelo menos 30% das amostras e bons modelos de QSAR apresentam um valor médio de q^2 próximo ao q^2_{LOO} da validação cruzada (MARTINS *et al.*, 2013).

A possibilidade de correlação ao acaso entre a variável dependente e os descritores selecionados foi verificada submetendo o modelo (obtido após seleção de variáveis com algoritmo OPS) ao teste de aleatorização de y (y-randomization). Neste teste, os valores de atividade biológica são misturados randomicamente e os valores de r^2 e q^2 são calculados. Para alguns modelos houve valores um pouco altos de r^2 , porém os valores de q^2 se revelaram negativos, um indicativo de modelos com os valores corretos de atividade biológica fornece parâmetros estatísticos apropriados (MARTINS *et al.*, 2013). Tal situação não procede com números randômicos; dessa forma existe, no conjunto de dados, uma correlação verdadeira entre a variável dependente (atividade biológica) e os descritores (TROPSHA, 2005; MARTINS *et al.*, 2013). Os resultados da validação cruzada leave-N-out e y-randomization (com 50 repetições, retirando-se uma amostra LOO em cada uma delas) para os modelos selecionados, mostrados na **figura 63**, indicam que todos os modelos são satisfatórios com relação a estes testes.

Figura 63 Resultados da validação leave-N-out e y-randomization para os melhores modelos selecionados pelo OPS relativos a atividade biológica (A) sem influência do solvente e (B) com influência do solvente. Os pontos vermelhos representam os modelos gerados com os valores de y randomizados e o ponto azul representa os valores de R^2 e Q^2 para o modelo real.



Fonte: Autora.

É necessário observar valores da atividade biológica experimental, da atividade biológica prevista e a diferença entre os mesmos, o que caracteriza os resíduos, para cada composto em análise. Valores de resíduos próximos a zero é bom indicativo do poder preditivo do modelo gerado (**tabela 20**).

Tabela 20 Valores de pIC50 (atividade biológica) sem solvente e com solvente previstos pelos modelos QSAR e os correspondentes observados experimentalmente bem como das respectivas diferenças para o conjunto de quinonas elencadas para este estudo.

Quinonas	SEM SOLVENTE			COM SOLVENTE		
	Experimental	Predito	Resíduo.	Experimental	Predito	Resíduo.
1	4,963	5,067	-0,104	4,963	5,286281	-0,323281
2	4,347	4,172	0,175	4,347	4,023404	0,323596
3	4,093	4,627	-0,534	4,093	4,377474	-0,284474
4	4,662	4,670	-0,008	4,662	4,741367	-0,079367
5	4,402	4,698	-0,296	4,402	4,40064	0,00136
6	4,762	4,649	0,113	4,762	4,598027	0,163973
7	4,682	4,471	0,211	4,682	4,299356	0,382644
8	3,445	3,839	-0,394	3,445	3,86174	-0,41674
9	4,491	4,459	0,032	4,491	4,493705	-0,002705
10	5,036	4,660	0,376	5,036	4,730134	0,305865
11	3,800	3,710	0,090	3,8	3,5444	0,2556
12	4,225	4,090	0,135	4,225	4,263429	-0,038429
13	4,078	3,888	0,190	4,078	4,204575	-0,126575
14	3,783	3,963	-0,180	3,783	3,645498	0,137502
15	3,738	3,852	-0,114	3,738	4,198017	-0,460017

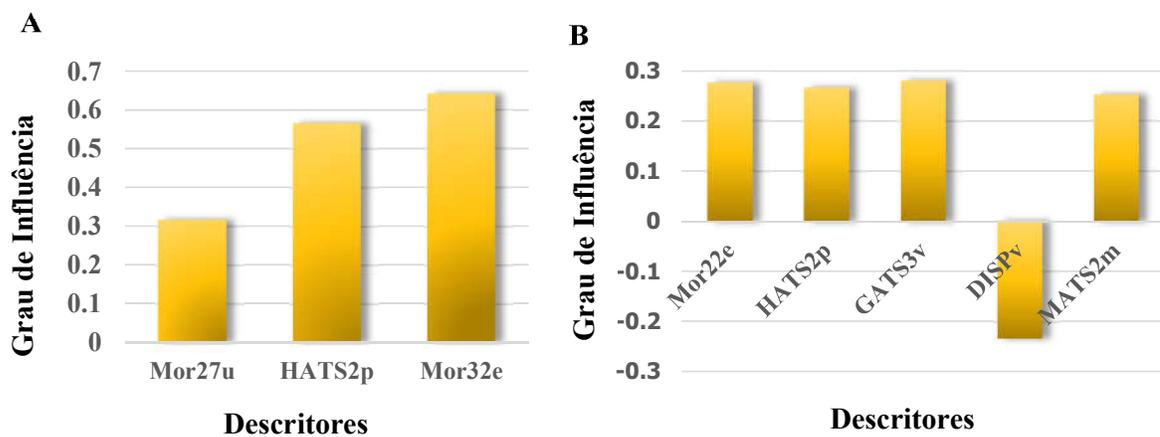
Fonte: Autora.

Obtido um modelo validado e preditivo, os descritores são analisados segundo o vetor de regressão gerado, fornecendo informações e subsídios para síntese e planejamento molecular de novos compostos com melhor atividade ou a identificação de regiões moleculares envolvidas na interação com o bioensaio (DEVINYAK *et al.*, 2014). As contribuições de cada descritor para o vetor de regressão dada pelas equações abaixo referente aos modelos propostos podem ser observadas na **figura 64**.

$$pIC_{50} = 0,318(\text{Mor27u}) + 0,566(\text{HATS2p}) + 0,641(\text{Mor32e}) \quad (\text{Modelo sem DMF})$$

$$pIC_{50} = 0,277(\text{Mor22e}) + 0,266(\text{HATS2p}) + 0,281(\text{GATS3v}) - 0,233(\text{DISPv}) + 0,253(\text{MATS2m}) \quad (\text{Modelo com DMF})$$

Figura 64 Contribuição de cada descritor para o vetor de regressão no modelo de atividade biológica (A) sem e (B) com solvente.



Fonte: Autora.

Embora diversos descritores não tenham significado químico aparente, a tentativa de interpretação qualitativa de alguns com maior contribuição para o modelo segundo o vetor de regressão pode auxiliar numa melhor compreensão das características moleculares selecionadas e, possivelmente sugerir modificações estruturais que venham a melhorar a atividade biológica de outras moléculas (DEVINYAK *et al.*, 2014). As contribuições de cada descritor para o vetor de regressão para os melhores modelos obtidos estão apresentados na **figura 64**. Os coeficientes de regressão dos descritores Mor27u, HATS2p, Mor32e (modelo de atividade sem solvente) e Mor22e, HATS2p, GATS3v e MATS2m (modelo de atividade com solvente), indicam que valores positivos destes descritores são favoráveis para os respectivos modelos, exceto para DISPv.

Os descritores Mor27u e Mor32e tiveram semelhantes parcelas de contribuição para o modelo cujas moléculas foram otimizadas na ausência do solvente assim como os descritores Mor22e GATS3v para o modelo em que as mesmas moléculas foram otimizadas na presença de DMF. Lembrando que, como mencionado anteriormente, a interpretação qualitativa não é tarefa fácil ou simples especialmente para os descritores holísticos, topológicos e de autocorrelação. Alguns autores afirmam que tais descritores são mais frequentes em modelos de QSAR como “uma medida quantitativa da falta de homogeneidade estrutural ou da diversidade de um grafo molecular, sendo relacionados à simetria associada às estruturas” (MELO, 2009) em modelos cujo conjunto de

moléculas estudadas pertençam à mesma classe, mas não necessariamente a uma mesma série. Esses tipos de descritores são apresentados na literatura como relacionados à importância da “forma, tamanho, simetria e/ou ramificação” (MELO, 2009) dentre outras características de um conjunto de compostos que apresentam atividade biológica sem muitos detalhes sobre suas contribuições/ influência na atividade biológica no modelo ao qual pertencem (KATRITZKY *et al.*, 1993; TODESCHINI *et al.*, 2000; MELO, 2009). Os descritores pertencentes aos modelos estão elencados na tabela a seguir.

Tabela 21 Descritores selecionados pelo OPS para os modelos com DMF e sem o referido solvente obtidos a partir do programa E-Dragon.

Descritores	Definição	Classe
Mor27u	3D-MoRSE-signal 27/ unweighted	3D-MoRSE
Mor32u	3D-MoRSE-signal 32/ unweighted	3D-MoRSE
HATS2p	leverage-weighted autocorrelation of lag 2/ weighted by atomic polarizabilities	Getaway
Mor22e	3D-MoRSE-signal 22/ weighted by atomic Sanderson electronegativities	3D-MoRSE
GATS3v	Geary autocorrelation-lag 3/ weighted by atomic masses	2D autocorrelations
MATS2m	Moran autocorrelation-lag 2 / weighted by atomic masses	2D autocorrelations
DISPv	d COMMA2 value/ weighted by atomic van der Waals volumes	Geometrical descriptors

Fonte: Autora (Extraído de VCCLAB- Virtual Computational Chemistry Laboratory. Dragon Descriptors).

Os descritores topológicos e geométricos relacionados especialmente ao volume molecular e tamanho são úteis para compreender a ação de determinado conjunto de compostos bioativos já que as forças de dispersão de curto alcance irão desempenhar um papel importante na ligação da substância aos receptores biológicos (BARREIRO *et al.*, 2009). Os descritores 3D-Morse (“Molecule Representation of Structure based on Electron diffraction”) presentes em ambos os modelos são descritores geométricos que se relacionam a tridimensionalidade de diferentes propriedades moleculares codificando informações sobre a estrutura molecular (BIRCK *et al.*, 2016). Os descritores selecionados (Mor27u, Mor32e e Mor22e) possuem coeficientes de regressão positivos sendo que a eletronegatividade pondera esses descritores (Mor32e e Mor22e) os quais influenciam positivamente para uma melhor atividade dos compostos, sendo que para o

modelo com solvente, o incremento de tais características pode refletir em compostos mais bioativos em ambientes lipofílicos. Sabe-se que as moléculas bioativas devem possuir diversas características tridimensionais como volume molecular acessível à solvatação (CONNOLLY, 1983; BARREIRO *et al.*, 2009) para melhorar a afinidade ao seu possível ligante e que Sanderson observou a relação entre eletronegatividade e tamanho atômico, informações importantes uma vez que o volume molecular relacionado com geometrias moleculares e as distâncias das ligações sofrem profundas modificações no vácuo e nos diferentes solventes. Tais percepções podem ser úteis na proposta de modificações estruturais que influenciem em alterações nas propriedades físico-químicas de uma série compostos e como consequência colaborar para o incremento da atividade biológica (TODESCHINI *et al.*, 2009).

Os descritores GETAWAY também estão associados a autocorrelação, em que certas propriedades dos átomos são consideradas desde que estejam numa distância topológica (k) e tais propriedades vão influenciar as mudanças conformacionais das moléculas. Dessa forma alguns descritores pertencentes a esta classe, como HATS2p, fornecem principalmente informações relacionadas à forma da molécula possibilitando correlacionar que determinado grau de liberdade conformacional favorece a atividade (CONSONNI *et al.*, 2002). Os demais descritores do modelo de atividade biológica com solvente com coeficientes de correlação positivos (GATS3v, MATS2m) são ponderados pelo volume atômico de van der Waals e massas atômicas indicando que essas características também influenciam na atividade dos compostos.

No modelo em que as moléculas foram otimizadas na ausência do solvente, a eletronegatividade e as propriedades topológicas são fatores importantes que influenciam a atividade biológica, já no modelo em que as moléculas foram otimizadas na presença do solvente além do volume e das propriedades topológicas, a massa e o volume atômico de van der Waals são importantes e influenciam a atividade. Embora a literatura careça de muitos trabalhos em que o mesmo conjunto de moléculas tenha sido otimizado na ausência e na presença do solvente, tais estudos ajudam a entender quais propriedades intrínsecas das moléculas influenciam a atividade biológica e quais estão relacionadas à influência do solvente auxiliando no planejamento estrutural de compostos bioativos com mais dinamicidade (TODESCHINI *et al.*, 2009).

6 Conclusões

- ✓ Os estudos eletroquímicos das quinonas em meio aprótico permitiram observar que a redução das mesmas ocorre através de um mecanismo de redução típico de quinonas: duas ondas de redução monoelétrônicas sequenciais, totalizando o consumo de dois elétrons ao fim do processo redutivo, sendo a primeira etapa de redução referente a formação do ânion radical quinônico ($Q^{\cdot-}$) e o segundo processo resulta na formação do diânion quinônico (Q^{2-}). As quinonas com átomo de calcogênio em sua estrutura apresentaram uma terceira onda catódica referente a redução do mesmo, além do processo oxidativo com um pico de alta intensidade de corrente;
- ✓ Em quinonas portadoras de dois sistemas naftoquinônicos (anel diidrofuranonaftoquinona e 1,4 naftoquinona), o sistema oronaftoquinônico se reduz mais facilmente em virtude da assimetria eletrônica e maior polaridade da ligação carbonílica nesses sistemas em comparação ao sistema em que as carbonilas estejam dispostas na posição 1,4;
- ✓ Em compostos com dois centros eletroativos, como as nitroquinonas há uma dificuldade em se individualizar os processos redutivos referentes a estes grupos, como ocorreu com os compostos da classe 5, nesse caso estudos computacionais a fim de observar os sítios propícios ao recebimento de elétrons possibilitou esclarecer para o composto ESNJ110 que após a formação do ânion radical semiquinona, a segunda redução ocorre no grupo nitro e a terceira redução no grupo quinona, porém a semelhança nos valores de diferenças de carga no segundo e terceiro processos redutivos no composto ESNJ104 não possibilitou uma proposta mecanística conclusiva sobre qual processo ocorreu primeiro;
- ✓ Estudos eletroquímicos em presença de oxigênio realizados para algumas das quinonas evidenciaram que seus produtos da redução interagem com oxigênio segundo mecanismo eletroquímico-catalítico (EC), o que sugere a participação de EROs no mecanismo de ação molecular desses compostos em células cancerígenas. Essa ação citotóxica está associada aos valores de potencial de redução facilitando a transferência de elétrons para oxigênio colaborando para o desequilíbrio redox em ambiente celular;
- ✓ Com relação aos ensaios de MTT, para a série 2, as modificações na posição 3 do anel naftofuranoquinônico resultaram em uma série análoga mais bioativa que a nor- β -lapachona em todas as linhagens para a maior parte dos compostos. Além disso, a possível atividade atribuída aos compostos quinônicos depende dos valores de E_{pc1} , havendo uma

faixa ótima de potencial de redução, apesar da inexistência de uma correlação linear no gráfico. Já para a série 8, ocorre similar situação: apesar da inexistência de uma correlação linear, todas as quinonas com valores de potencial maiores que - 0,7V apresentaram atividade com exceção de RSL 50 e RSL 170;

✓ As quinonas pertencentes a classe 2 foram testadas frente ao fungo *C. albicans*, bactérias gram- positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*). Apenas quatro quinonas apresentaram atividade moderada frente a *S. aureus*: benzil tiol, 4-cloro tiol, 4-metil tiol e tiacetato tiol sendo, esta última, a de melhor atividade e, portanto, submetida a ensaios para ver a formação de biofilme, o qual indicou um perfil de ação basteriostático para esta quinona;

✓ A capacidade antioxidante das quinonas pertencentes a classe 8 foi avaliada frente à peroxidação lipídica através da utilização de um modelo de lipoperoxidação em membrana. Apenas dois compostos (RSL 154 e RSL 155) mantiveram comportamentos bem próximos ao trolox, sendo promissores na proteção lipídica ao contrário da quinona RSL 71 cujo comportamento se assemelhou ao controle negativo;

✓ Os estudos espectrofotométricos possibilitaram determinar valores de constante de formação de complexos entre ctDNA de fita dupla para as quinonas das séries propostas sendo que RSL149, RSL71 e ESNJ104 apresentaram os maiores valores de K_b evidenciando maior interação com ctDNA em solução;

✓ Através do método de inibição da fluorescência do complexo BE-DNA as quinonas estudadas exibiram uma redução do sinal inferior a 50%, indicando que a interação não ocorre por intercalação como com o BE;

✓ Os parâmetros termodinâmicos revelaram um processo de interação espontâneo e cujo modo de ligação é majoritariamente groove para as quinonas ESNJ-104, ESNJ-242, RSL-149, RSL-150, RSL-151 e RSL-152. Segundo os dados de K_{sv} , a interação ocorreria por quenching dinâmico e não estático;

✓ Quanto aos modelos de QSAR para as 15 quinonas com atividade frente a *T. cruzi*, os modelos obtidos mostram-se robustos. Os valores de q^2 para tais modelos em que os compostos foram otimizados na ausência e presença do solvente foram respectivamente 0,80 e 0,65. No modelo construído na ausência do solvente, a eletronegatividade e volume são fatores importantes que ponderam os descritores e, por conseguinte influenciam a atividade biológica, já no modelo em que o solvente estava presente além do volume e das propriedades topológicas, a massa e o volume atômico de van der Waals são importantes e influenciam a atividade.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. New Jersey: Wiley- Interscience, 2009, 840 p.

AGARWAL, S.; JANGIR, D. K.; MEHROTRA, R. Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf- thymus DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 177–182, 2013.

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 5ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2009, 1463 p.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5- 16, 2001.

ARAÚJO, C. A.; WANIEK, P. J.; JANSEN, A. M. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. **Vector- Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 3, p. 227- 234, 2010.

ARAÚJO, A. J.; DE SOUZA, A. A.; DA SILVA JÚNIOR, E. N.; MARINHO-FILHO, J. D. DE MOURA, M. A. B. F.; ROCHA, D. D.; VASCONCELLOS, M. C.; COSTA, C. O.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; FERREIRA, V. F.; DE ABREU, F. C.; PINTO, A. V.; MONTENEGRO, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GOULART, M. O. F. Growth inhibitory effects of 3'- nitro- 3- phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: A redox- dependent mechanism. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 585- 594, 2012.

ARMENDÁRIZ-VIDALES, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, L. S.; GONZÁLEZ, F. J.; DE SOUZA, A. A.; DE ABREU, F. C.; JARDIM, G. A. M.; DA SILVA, E. N.; GOULART, M. O. F.; FRONTANA, C. Nature of Electrogenated Intermediates in Nitro-Substituted Nor- β -Lapachones: The Structure of Radical Species during Successive Electron Transfer in Multiredox Centers. **Journal of Organic Chemistry**, v. 79, p. 5201- 5208, 2014.

ARSHAD, N.; RASHID, N.; ABSAR, S.; ABBASI, M. S. A.; SALEEM, S.; MIRZA, B. UV-absorption studies of interaction of karanjin and karanjachromene with ds. DNA: Evaluation of binding and antioxidant activity. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 2040- 2047, 2013.

ASCHE, C. Antitumour Quinones. **Mini- Reviews in Medicinal Chemistry**, v.5, p. 449-467, 2005.

AUGUSTO, O; MIYAMOTO, S. Oxygen Radicals and Related Species. In: PANTOPOULOS, K.; SCHIPPER, H. M. (Ed.). **Principles of Free Radical Biomedicine**. New York: Nova Science Publishers, Inc. v. 1, 2011, p. 1-23.

BACHMAN, J. E.; CURTISS, L. A.; ASSARY, R. S. Investigation of the Redox Chemistry of Anthraquinone Derivatives Using Density Functional Theory. **Journal of Physical Chemistry. A**, v. 118, p. 8852- 8860, 2014.

BACIOCCHI, E.; ROL, C.; SCAMOSCI, E.; SEBASTIAN, G. V. Medium and Structure Effects on the Anodic Oxidation of Aryl Arylmethyl Sulfides. **American Chemical Society Publications**, v. 56, n. 19, p. 5498– 5502, 1991.

BAHIA, M. T.; NASCIMENTO, A. F. S.; MAZZETI, A. L.; MARQUES, L. F.; GONÇALVES, K. R.; MOTA, L. W. R.; DINIZ, L. F.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; SHACKLEFORD, D.M.; KOLTUN, M.; SAUNDERS, J.; WHITE, K. L.; SCANDALE, I.; CHARMAN, S. A.; CHATELAIN, E. Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease, **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 58, p. 4362- 4370, 2014.

BANERJEE, S; PADHYE, S.; AZMI, A.; WANG, Z.; PHILIP, P. A.; KUCUK, O.; Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 62, p. 938- 946, 2010.

BARRA, C. V.; NETO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, p. 1998- 2016, 2015.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2ed. São Paulo: Artmed, 2009. 536 p.

BARREIRO, E. J.; KÜMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M. The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5215–5246, 2011.

BARREIRO, E. Privileged Scaffolds in medicinal chemistry: An introduction. In: BRÄSE, S. **Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry Design, Synthesis, Evaluation**. Cambridge: United Kingdom Royal Society of Chemistry, 2016, p. 1- 15.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, 29, n. 1, p. 113- 123, 2006.

BELLO, R.I., GÓMEZ- DÍAZ, G.; LÓPEZ- LLUCH, G.; FORTHOFFER, N.; CÓRDOBAPEDREGOSA, M.C.; NAVAS, P.; VILLALBA, J. M. Dicoumarol relieves serum withdrawal-induced G0/1 blockade in HL-60 cells through a superoxide-dependent mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1613- 1625, 2005.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1- 16, 2016.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14- 19, 1996.

BERRIDGE, M. V.; HERST, M. P.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127- 152, 2005.

BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; REINICKE, K. E.; DONG, Y.; YANG, C.R.; GIRARD, L.; MINNA, J. D.; BORNMANN, W. G.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non- small- cell lung cancer cells by β -lapachone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 11832- 11837, 2007.

BHASIN, D.; CHETTIAR, S. N.; ETTER, J. P., MOK, M.; LI, P.-K., Anticancer activity and SAR studies of substituted 1, 4-naphthoquinones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 4662- 4669. 2013.

BIRCK, M. G.; CAMPOSA, L. J.; MELO, E. B. Estudo computacional de 1h-imidazol-2-il-pirimidina-4,6-diaminas para a identificação de potenciais precursores de novos agentes antimaláricos. **Química Nova**, v.39, n.5, p.567- 574, 2016.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P. TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivatio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886- 895, 2009.

BOGDANOV, P. M.; ALBESA, I.; SPERANDEO, N. R.; DE BERTORELLO, M. M. Actividad antibacteriana *in vitro* de isoxazolilnaftoquinonas. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 25, p. 119- 128, 1993.

BOLOGNESI, M. L.; LIZZI, F.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; CAVALLI, A. Synthesis of a small library of 2-phenoxy-1, 4-naphthoquinone and 2-phenoxy-1, 4-anthraquinone derivatives bearing anti-trypanosomal and anti-leishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2272- 2276, 2008.

BOVERIS, A.; DOCAMPO R.; TURRENS J. F.; STOPPANI, A.O. Effect of β -lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry Journal**, v. 75, p. 431- 439, 1978.

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia Geral**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p. 219- 276.

BROUDE, E. A.; NACHOD, F. C. **Determination of Organic Structures by Physical Methods**, New York: Academic Press Inc, 1955, 809 p.

BROUWER, H. Testing for chemical toxicity using bactéria. **Journal of Chemical Education**, v. 68, n. 8, p. 695-697, 1991.

CAMARGO, E. P. Doenças Tropicais. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 95- 110, 2008.

CARDOSO, M. F.; SALOMÃO, K.; BOMBAÇA, A. C.; DA ROCHA, D. R.; DA SILVA, F. C.; CAVALEIRO, J. A.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of new 3- phenylthio- nor- β - lapachone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 15, p. 4763- 4768, 2015.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms**. 5th. New York: Springer Science, 2007, 1212 p.

CAVALCANTI, B. C.; DA SILVA JUNIOR, E. N.; DE DEUS, C. F.; PESSOA, C. O.; COSTA- LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; PINTO, M. C. F. R.; SIMONE, C. A.; FERREIRA, V. F.; GOULART, M. O. F.; ANDRADE, C. K. Z.; PINTO, A. V. 3-Arylamino and 3-Alkoxy-nor- β -lapachone Derivatives: Synthesis and Cytotoxicity against Cancer Cell Lines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 504-508, 2010.

CAVALCANTI, B. C. **Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilamino nor-beta-lapachônicos: estudos de mecanismo de ação**. 2010. 170f. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2010.

CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; CABRAL, I. O.; FERREIRA, J. R. O.; MAGALHÃES, H. I. F.; JÚNIOR, H. V. N.; DA SILVA JÚNIOR, E. N.; DE ABREU, F. C.; COSTA, C. O.; GOULART, M. O. F.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical Genotoxicology of Nor- β -lapachone in Human Cultured Lymphocytes and Chinese Hamster Lung Fibroblasts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 9, p. 1560- 1574, 2011.

CAVALCANTI, B. C.; CABRAL, I. O.; RODRIGUES, F. A. R.; BARROS, F. W. A.; ROCHA, D. D.; MAGALHÃES, H. I. F.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; CARVALHO, T. S. C.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; DE MELO, I. M. M.; DA SILVA JÚNIOR, E. N. Potent Antileukemic Action of Naphthoquinoidal Compounds: Evidence for an Intrinsic Death Mechanism based on Oxidative Stress and Inhibition of DNA Repair. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 145- 163, 2013.

CAVALLI, A.; LIZZI, F.; BONGARZONE, S.; BRUN, R.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; BOLOGNESI, M. L. Privileged structure- guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 3031- 3035, 2009a.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected tropical diseases: multitarget-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, 7339- 7359, 2009b.

CENAS, N.; NIVINSKAS, H.; ANUSEVICIUS, Z.; SARLAUSKAS, J.; LEDERER, F.; ARNÉR, E. S. J. Interactions of Quinones with Thioredoxin Reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 2583–2592, 2004.

CHEN, W.; QIU, J.; SHEN, Y. Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti- cancer drugs. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 6, p. 230-237, 2012.

CONNOLLY, M. L. Analytical Molecular-Surface Calculation. **Journal of Applied Crystallography**, v. 16, p. 548- 558, 1983.

CONSONNI, V.; TODESCHINI, R.; PAVAN, M. Structure/ response correlations and similarity/ diversity analysis by GETAWAY descriptors. Theory of the novel 3D

molecular descriptors. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 42, n. 3, 2002.

COURA, J. R. DE CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J.; Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 46-52, 2002.

CRAWFORD, P. W.; CARLOS, E.; ELLEGOOD, J. C.; CHENG, C. C.; DONG, Q.; LIU, D. F.; LUO, Y. L.: The electrochemistry of antineoplastic furanquinones: electrochemical properties of benzo[b]naphtho[2,3-d]furan-6,11-dione derivatives. **Electrochimica Acta**, v. 41, p. 2399- 2403, 1996.

CRUZ, F. S.; DOCAMPO, R.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide from β - lapachone in bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 14, p. 630- 633, 1978.

CRUZ, T.; GASPAR, R.; DONATO, A.; LOPES, C. Interaction Between Polyalkylcianoacrylate Nanoparticles and Peritoneal Macrophages: MTT Metabolism, NBT Reduction, and NO Production. **Pharmacological Research**, v.14, n. 1, p. 73- 79, 1997.

DA CRUZ, E. H. G. ; CARVALHO, P. H. P. R. ; CORREA, J. R. ; SILVA, D. A. C. ; DIOGO, E. B. T. ; SOUZA FILHO, J. D. ; COELHO, B. ; PESSOA, C. ; OLIVEIRA, H. C. B. ; GUIDO, B. C. ; SILVA FILHO, D. A. ; NETO, B. A. D. ; DA SILVA JÚNIOR, E. N. Design, synthesis and application of fluorescent 2, 1, 3- benzothiadiazole- triazole-linked biologically active lapachone derivatives. **New Journal of Chemistry**, v. 38, p. 2569- 2580, 2014.

DA CRUZ, EDUARDO H. G.; SILVERS, MOLLY A.; JARDIM, G. A. M.; RESENDE, J. M.; CAVALCANTI, B. C.; BOMFIM, I. S.; PESSOA, C.; DE SIMONE, C. A.; BOTTESELLE, G. V.; BRAGA, A. L.; NAIR, D. K.; NAMBOOTHIRI, I. N. N.; BOOTHMAN, D. A.; DA SILVA JÚNIOR, E. N. Synthesis and antitumor activity of selenium- containing quinone-based triazoles possessing two redox centres, and their mechanistic insights. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 1-16, 2016.

DAKOVA, B.; LAMBEWS, L.; EVERS, M. Electrochemical behaviour of selenoorganic compounds-part 4. benzyl phenyl selenide. **Electrochimica Acta**, v. 39, n. 16, p. 2363- 2365, 1994.

DARAKHSHAN, S.; BIDMESHKI POUR, A.; HOSSEINZADEH COLAGAR, A.; SISAKHTNEZHAD, S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. **Pharmacological Research**, v. 95-96, p. 138–158, 2015.

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. 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.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; DE SOUZA, M. C. B. V.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; BARROS, F. W. A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; DE MORAES, M. O.; FERREIRA, V. F. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor- β -lapachone and nor- α -lapachone, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p.7035–7041, 2007.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V.; FERNANDES, M. C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; LOPES, F. A.; DE SIMONE, C. A.; ANDRADE, C. K.; PINTO, A. V.; FERREIRA, V. F.; DE CASTRO, S. L. Synthesis and anti- *Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor- lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 5030- 5038, 2008a.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; BARROS, F. W. A.; PESSOA, C.; COSTA- LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; FERREIRA, V. F. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor- β -lapachone and nor- α -lapachone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7035- 7041, 2008b.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; MENNA-BARRETO, R.F.S.; PINTO, M.C.F.R.; SILVA, R.S.F.; TEIXEIRA, D.V.; SOUZA, M.C.B.V.; DE SIMONE, C.A.; DE CASTRO, S.L.; FERREIRA, V.F.; PINTO, A.V. Naphthoquinoidal [1, 2, 3]- triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1774- 1780, 2008c.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; DE MOURA, M. A. B. F. ; PINTO, A. V. ; PINTO, M. C. F. R. ; ARAUJO, A. J. ; PESSOA, C. ; COSTA- LOTUFO, L. V ; MONTENEGRO, R. C. ; MORAES, M. O. ; FERREIRA, V. F. ; GOULART, M. O. F. . Cytotoxic, Trypanocidal Activities and Physicochemical Parameters of nor- beta- Lapachone- based 1, 2, 3- Triazoles **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 635- 643, 2009.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; DE DEUS, C. F.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; COSTALOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; PINTO, M. C. F. R.; de SIMONE, C. A.; FERREIRA, V. F.; GOULART, M. O. F.; ANDRADE, C. K. Z.; PINTO, A.V. 3-Arylamino and 3-alkoxy-nor- β -lapachone derivatives: synthesis and cytotoxicity against cancer cell lines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 504-508, 2010.

DA SILVA JÚNIOR, E. N.; GUIMARÃES, T. T.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; DE SIMONE, C. A.; PESSOA, C.; CAVALCANTI, B. C.; SABINO, J. R.; ANDRADE, C. K. Z.; GOULART, M. O. F.; CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: Synthesis of imidazolic anthraquinones, nor- β -lapachone derivatives and β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3224- 3230, 2010.

DA SILVA, F. C.; FERREIRA, S. B.; Da ROCHA, D. R.; FERREIRA, V. F. Chagas Disease: Challenges in Developing New Trypanocidal Lead Compounds. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n.1, p. 46-72, 2012.

DA SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F. Natural Napthoquinones with great importance in medicinal chemistry. **Current Organic Synthesis**, v. 13, p. 334- 371, 2016.

D'AURIA, M.; RACIOPPI, R. A DFT Study of 1, 4- Biradical Intermediates Involved in Stereoselective Paternò-Büchi Reactions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2010, p. 3831- 3836, 2010.

DE ARIAS, A. R.; ASCURRAT, M.; FLEITAS, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. *In vitro* Activity and Mutagenicity of Bisbenzylisoquinolines and Quinones Against *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 141- 144, 1994.

DE ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. de L.; GOULART, M. O. F. Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 19- 35, 2002.

DE ABREU, F. C.; FERREIRA, D. C. M.; GOULART, M. O. F.; WADHAWANC, J.; AMATORE, C.; SOUZAD, M. C. B.; GOMES, T. S.; FERREIRA, V. F.; XIMENESE, E. A. Electrochemistry of β - lapachone and its diazoderivative: relevance to their compared antimicrobial activities. **Electrochemistry Communications**, v. 7, p. 767-772, 2005.

DE ABREU, F. C.; DE MOURA, M. A.; FERREIRA, D. C. M.; CAVALCANTI, J. C. M.; GOULART, M. O. F. A importância dos parâmetros eletroquímicos em química medicinal, In: MONTANARI, C. A. (Org.) **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. São Paulo: Edusp, 2011, p. 125- 160.

DE MOLFETTA, F. A.; DE FREITAS, R. F.; DA SILVA, A. B. F.; MONTANARI, C. A. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, p. 1175- 1184, 2009.

DE MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 3, p. 325-338, 2001.

DE MOURA, K.C.G.; SALOMÃO, K.; MENNA-BARRETO, R.F.S.; EMERY, F.S.; PINTO, M.C.F.R.; PINTO, A.V.; DE CASTRO, S.L. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[b- 4, 3]naphtho[1, 2- d]imidazoles from β -lapachone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 639- 645, 2004.

DENNINGTON R., KEITH T., MILLAM J., Gauss View Program, Version 5 Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2009.

DEVINYAK, O.; HAVRYLYUK, D.; LESYK, R. 3D-MoRSE descriptors explained. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 54, p. 194–203, 2014.

DIAS, L. C.; DESSOY, A. D.; SILVA, J. J. N.; THIEMAN, O. H.; OLIVEIRA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444- 2457, 2009.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Neglected tropical diseases: a new era of challenges and opportunities. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1552- 1556, 2013.

DNDi. Nueva opción de medicamento para la enfermedad de Chagas es estudiada en Bolivia, 2017. Disponível em: <http://www.dndial.org/pt/centro-de-documentacao/pres-releases/616-fexichagas.html> Acessado em: 04 de janeiro de 2017.

DIOGO, E. B. T.; DIAS, G. G.; RODRIGUES, B. L.; GUIMARÃES, T. T.; VALENÇA, W. O.; CAMARA, C. A.; DE OLIVEIRA, R. N.; DA SILVA, M. G.; FERREIRA, V. F.; DE PAIVA, Y. G.; GOULART, M. O. F.; MENNA- BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L.; DA SILVA JÚNIOR, E. N. Synthesis and anti- *Trypanosoma cruzi* activity of Naphthoquinone- containing Triazoles: Electrochemical studies on the effects of the quinoidal moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6337- 6348, 2013.

DOCAMPO, R.; CRUZ, F.S.; BOVERIS, A.; MUNIZ, R.P.; ESQUIVEL, D.M. Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in β - apachone- treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 186, p. 292-297, 1978.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free Radical Metabolites in the Mode of Action of Chemotherapeutic Agents and Phagocytic Cells on *Trypanosoma cruzi*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, 223- 238, 1984.

DOERING, M.; DIESEL, B.; GRUHLKE, M. C. H.; VISWANATHAN, U. M.; MANIKOVA, D.; CHOVANECD, M.; BURKHOLZ, T.; SLUSARENKO, A. J.; KIEMER, A. K.; JACOB, C. Selenium- and tellurium- containing redox modulators with distinct activity against macrophages: possible implications for the treatment of inflammatory diseases. **Tetrahedron**, v. 68, p. 10577- 10585, 2012.

DRUMMEN, G. P. C. VAN LIEBERGEN, L. C.; OP DEN KAMP, J. A.; POST, J. A. C11-Bodipy^{581/591}, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 4, p. 473- 490, 2002.

DUBIN, M.; VILLAMIL, S.H.F.; STOPPANI, A.O.M. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by β - lapachone and related naphthoquinones. **Biochemical Pharmacology**, v. 39, n. 7, p. 1151- 1160, 1990.

EISNER, T., ROSSINI, C., GONZÁLEZ, A., EISNER, M. Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 1313- 1321, 2004.

ENCICLOPÆDIA BRITANNICA, 2007. Disponível em: <http://media.web.britannica.com/eb-media/37/96837-004-AAC9A5BB.jpg>. Acesso em 12 ago. 2016.

ER, S.; SUH, C.; MARSHAK, M. P.; ASPURU-GUZI, A. Computational Design of Molecules for an All- Quinone Redox Flow Battery. **Chemical Science**, v. 6, p. 885- 893, 2015.

FERREIRA, F. R.; ARAÚJO, A. J.; MARINHO FILHO, J. D. B.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; DA SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; DA COSTA, J. G.; DE ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F. Arylated α - and β -dihydrofuran naphthoquinones: Electrochemical parameters, evaluation of antitumor activity and their correlation. **Electrochimica Acta**, v. 110, p. 634-640, 2013.

FERREIRA, F. R. **Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico**. 2013. 151 p. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F. β -Lapachona: Sua Importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p.140-160, 2010.

FILOCHE, S.; WONG, L.; SISSONS, C. H. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. **Journal of Dental Research**, v. 1, n. 89, p. 8-18, 2010.

FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 64, p. 221- 253, 2000.

FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUNOZ, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 159-164, 1992.

FRANCE, R. R.; REES, N. V.; WADHAWAN, J. D.; FAIRBANKS, A. J.; COMPTON, R. G. Selective activation of glycosyl donors utilising electrochemical techniques: a study of the thermodynamic oxidation potentials of a range of chalcoglycosides. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, p. 2188- 2194, 2004.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, JR., J. A.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, N. J.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian 09, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

FRY, F. H.; HOLME, A. L.; GILES, N. M.; GILES, G. I.; COLLINS, C.; HOLT, K.; PARIAGH, S.; GELBRICH, T.; HURSTHOUSE, M. B.; GUTOWSKI, N. J.; JACOB,

C. Multifunctional redox catalysts as selective enhancers of oxidative stress, **Organic & Bioolecular Chemistry**, p. 2579- 2587, 2005.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. Photocatalytic interaction of resazurin N-oxide with cysteine optimizes preparation of anaerobic culture medium. **Anaerobe**, v. 8, p. 29-34, 2002.

GABRIELSON, J. KÜHN, I.; COLQUE-NAVARRO, P. HART, M.; IVERSEN, A.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco)toxic fingerprinting of chemicals. **Analytica Chimica Acta**, v. 485, p. 121- 130, 2003.

GERSHON, H.; SHANS, L. Fungitoxicity of 1,4-naphthoquinones to *Candida albicans* and *Trichophyton inentagrophytes*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, n. 9, p. 1317- 1321, 1975.

GIBSON, E. G.; KING, M. M.; MERCER, S. L.; DEWEESE, J. E. Two-Mechanism Model for the Interaction of Etoposide Quinone with Topoisomerase II α . **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, n. 9, p. 1541–1548, 2016.

GILES, G. I.; TASKER, K. M.; JOHNSON, R. J. K.; JACOB, C.; PEERS, C.; GREEN, C. K. Electrochemistry of chalcogen compounds: prediction of antioxidante activity. **Chemical Communications**, p. 2490- 2491, 2001.

GILES, G. I.; GILES, N. M.; COLLINS, C. A.; HOLT, K.; FRY, F. H.; LOWDEN, A. S.; GUTOWSKIB, N. J.; JACOB, C. Electrochemical, *in vitro* and cell culture analysis of integrated redox catalysts: implications for cancer therapy. **Chemical Communications**, p. 2030- 2031, 2003.

GONÇALVES, A. M.; VASCONCELLOS, M. E.; DOCAMPO, R.; CRUZ, F. S.; DE SOUZA, W.; LEON, W. Evaluation of the toxicity of 3-allyl- β -lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 1, 167- 176. 1980.

GOULART, M. O. F.; FREITAS, L. R.; TONHOLO, J.; DE ABREU, F. C.; RASLAN, D. S.; STARLING, S., ZANI, C. L.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E. Trypanocidal activity and redox potencial of heterocyclic and 2- hydroxy- napfthoquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2043- 2048, 1997.

GOULART, M. O.; FALKOWSKI, P.; OSSOWSKI, T.; LIWO, A. Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. **Bioelectrochemistry**, v. 59, p. 85- 87, 2003.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, C. L.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, MC. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1425- 1438, 2010.

GROARKE, J. D.; NOHRIA, A. Anthracycline Cardiotoxicity A New Paradigm for an Old Classic. **Circulation**, v. 131, p. 1946- 1949, 2015.

GUALDRON-LOPEZ, M.; MICHELS, P. A. M.; QUIÑONES, W.; CACERES, A. J.; AVILAN, L.; CONCEPCION, J.-L. **Trypanosomatid Diseases**. Weinheim: Wiley VCH, 2013, 400 p.

GUPTA, V. K.; JAIN, R.; RADHAPYARI K.; JADON N.; AGARWAL S. Voltammetric Techniques for the Assay of Pharmaceuticals- a Review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, p. 179- 196, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646- 674, 2011.

HEGDE, A. H.; PRASHANTH, S. N.; SEETHARAMAPPA, J. Interaction of antioxidant flavonoids with calf thymus DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 63, p. 40- 46, 2012.

HENDERSON, G.; ULRICH, P.; FAIRLAMBT, A. H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M.; M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: Alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 5374-5378, 1988.

HERNANDEZ, D. M.; DE MOURA, M. A. B. F.; VALENCIA, D. P.; Gonzalez, F. J.; Gonzalez, I.; de Abreu, F. C.; DA SILVA JUNIOR, E. N.; FERREIRA, V.; PINTO, A. V.; GOULART, M. O.; FRONTANA, C. Inner reorganization during the radical-biradical transition in a nor- β - lapachone derivative possessing two redox centers. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 3414- 342, 2008.

HICKEY, D. S.; ROBERTS, H. J. Selfish Cells: Cancer as Microevolution. **Journal of Orthomolecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 137- 146, 2007.

HILLARD, E. A.; DE ABREU, F. C.; FERREIRA, D. C.; JAOUEN, G.; GOULART, M. O.; AMATORE, C. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical Communications**, v. 21, n. 23, p. 2612- 2628, 2008.

HOFSTRAAT, K.; VAN BRAKEL, W. H. Social stigma towards neglected tropical diseases: a systematic review. **International Health**, v. 8, p. i53– i70, 2016.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.7, n. 97, p. 1027-1031, 2002.

IKRYANNIKOVA, L. N.; USTYNYUK, L. Y.; TIKHONOV, A. N. DFT Study of Nitroxide Radicals. 1. Effects of Solvent on Structural and Electronic Characteristics of 4-Amino-2,2,5,5-Tetramethyl-3-Imidazoline-N-Oxy 1. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, p. 4759- 4768, 2004.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), disponível em <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101> Acesso em 20 set. de 2016.

Infometrix Inc. Pirouette 4.0. Woodinville, 2008.

ITOH, N.; CAO, J.; CHEN, Z.; YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Advantages and limitation of BODIPY as a probe for the evaluation of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants in plasma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 2059-2063, 2007.

JANJUA, N. K.; SHAHEEN, A.; YAQUB, A.; PERVEEN, F.; SABAHAT, S.; MUMTAZ, M.; JACOB, C.; BA, L. A.; MOHAMMED, H. A. Flavonoid-DNA binding studies and thermodynamic parameters. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, p. 1600- 1604, 2011.

JARDIM, G. A. M.; REIS, W. J.; RIBEIRO, M. F.; OTTONI, F. M.; ALVES, R. J.; SILVA, T. L.; GOULART, M. O. F.; BRAGA, A. L.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; SALOMÃO, K.; DE CASTRO, S. L.; DA SILVA JÚNIOR, E. N. On the investigation of hybrid quinones: synthesis, electrochemical studies and evaluation of trypanocidal activity. **RSC Advances: An International Journal to Further the Chemical Sciences**, v.5, p.78047- 78060, 2015.

JENKINS, T. C. Optical absorbance and fluorescence techniques for measuring DNA-drug interactions. In: Keith: Drug-DNA interaction protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 90, p. 195-218, 1997.

KANAKIS, C. D.; TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C.; BARIYANGA, J.; TAJMIR-RIAAHI, H. A.; POLISSIOU, M. G. An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds: Models and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95 p. 204- 212, 2009.

KAROLIN, J.; JOHANSSON, L. B.- A.; STRANDBERG, L.; NY, T. 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.

KATRITZKY, A. R.; GORDEEVA, E. V. Traditional topological indices vs electronic, geometrical, and combined molecular descriptors in QSAR/QSPR research. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.33, p. 835-857, 1993.

KAWAI, M.; CHEN, J.; CHEUNG, C. Y. S.; CHANG, T. K. H. Transcript profiling of cytochrome P450 genes in HL- 60 human leukemic cells: Upregulation of CYP1B1 by alltrans-retinoic acid. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 248, p. 57- 65, 2003.

KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 496- 504, 2004.

KIM, H.-J.; WANG, X.; MA, J.; CHO, J.-H. A Density- Functional-Theory Study of Biradicals from Benzene to Hexacene. **Chemical Physics Letters**, v. 516, p. 141-145, 2011.

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.

KOVACIC, P., SOMANATHAN, R. Integrated Approach to Immunotoxicity: Electron Transfer, Reactive Oxygen Species, Antioxidants, Cell Signaling, and Receptors. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 28, p. 323- 346, 2008.

KOVACIC, P.; HALL, M. E. Bioelectrochemistry, reactive oxygen species, receptors, and cell signaling: how interrelated? **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 30, p. 1- 9, 2010.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Unifying effectors of circadian rhythm: Protein N-acetylation, phosphorylation, sulfation and other electrical effects. **Journal of Electrostatics**, v. 72, p. 198-202, 2014.

KRISHNAN, P., BASTOW, K.F. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives alpha-lapachone and beta-lapachone. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, p.187- 198, 2001.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta Medica**, v. 76, p. 1479- 1491, 2010.

KUETE, V.; EFFERTH, T. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 1, p. 1- 19, 2010.

KUETE, V.; ALIBERT- FRANCO, S.; EYONG, K. O.; NGAMENI, B.; FOLEFOC, G. N.; FOLEFOC, G. N.; NGUEMEVING, J. R.; TANGMOUO, J. G.; FOTSO, G. W.; KOMGUEM, J.; OUAHOUE, B. M. W. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 2, p.156- 179, 2011.

KURISU, G.; ZHANG, H.; SMITH, J. L.; CRAMER, W. A. Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. **Science**, v. 302, p. 1009- 1014, 2003.

LABUTE, P. A widely applicable set of descriptors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 18, p. 464-477, 2000.

LEPECQ, J.-B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ehidium bromide and nucleic acids: Physical- Chemical characterization. **Journal of Molecular Biology**, v. 27, p. 87- 106, 1967.

LESZCZYNSKI, J; SHUKLA, M. K. **Practical Aspects of Computational Chemistry II: An Overview of the Last Two Decades and Current Trends**. London: Springer, 2012, 541 p.

LING, X.; ZHONG, W.; HUANG, Q.; NI, K. Spectroscopic studies on the interaction of pazufloxacin with calf thymus DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 93, p. 172- 176, 2008.

LITT, E.; BAKER, M. C.; MOLYNEUX, D. Neglected tropical diseases and mental health: a perspective on comorbidity. **Trends in Parasitology**, v. 28, n 5, 2012.

LOPETEGUI R, SOSA MIATELLO C. Efecto inhibitorio de la sangre sobre la actividad letal anticrithidia *Trypanosoma cruzi* demenadiona *in vitro*. **Revista de la Sociedad de Argentina de Biología**, v. 37, p. 134- 140, 1961.

LOPES, C. B. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos com utilização de nanotubos de carbono e diferentes mediadores na determinação de Peróxido de Hidrogênio e Epinefrina**. 2014. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

LU, J.- J.; BAO, J.- L.; WU, G.- S.; XU, W.- S.; HUANG, M.- Q.; CHEN, X.- P.; WANG, Y.- T. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agentes. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 456- 463, 2013.

LUN, Z.- R.; LAI, D.- H.; WEN, Y.- Z.; ZHENG, L.- L.; SHEN, J.- L.; YANG, T.- B.; ZHOU, W.- L.; QU, L.- H.; HIDE, G.; AYALA, F. Cancer in the parasitic protozoans *Trypanosoma brucei* and *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 29, p. 8835- 8842, 2015.

LUND, H. Practical Problems in Electrolysis, In: LUND, H; HAMMERICH, O. (Ed.). **Organic Electrochemistry**, 4th. ed., New York: Marcel Dekker, 2001, p. 223- 292.

MADEO, J.; ZUBAIR, A.; MARIANNE, F. A review on the role of quinones in renal disorders. **SpringerPlus**, v. 2, p. 139- 146, 2013.

MACDONALD, R. C.; MACDONALD, R. I.; MENCO, B. P.; TAKESHITA, K.; SUBBARAO, N. K.; HU, L. R. 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 Radicals in Biology and Medicine**, v. 42, p. 1392- 1397, 2007.

MAEDA, H.; OHMORI, H. Electrochemistry of Phosphorus and Sulfur Compounds: A Unique Tool for Organic Synthesis. **Accounts of Chemical Research**, v. 32, n. 1, p. 72– 80, 1999.

MAHLER, H. R.; KLINE, B.; MEHROTRA, B. D. Some observation on the hypocromism of DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 9, p. 801- 811, 1964.

MARTINS J. P. A.; BARBOSA, E. G.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, M. M. C. LQTA-QSAR: A New 4D-QSAR Methodology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 1428- 1436, 2009.

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. *QSAR modeling*: um novo pacote computacional *open source* para gerar e validar modelos QSAR. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 554-560, 2013.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis, **Acta Tropica**, v.130, p. 167–174, 2014.

MAROULIS, G. Evaluating the Performance of DFT Methods in Electric Property Calculations: Sodium Chloride as a Test Case. **Journal of Reports in Theoretical Chemistry**, v. 1., p. 25- 35, 2013.

MELO, E. B. **Estudos teóricos (modelagem molecular e QSAR) de inibidores de HIV-1 integrase**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2009.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; HENRIQUES-PONS, A.; PINTO, A. V.; MORGADO-DINIZ, A.; SOARES, M. J.; DE CASTRO, S. L. Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 1034–104, 2005.

MENNA- BARRETO, R. F. S.; GONÇALVES, R. L. S.; COSTA, E. M.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V.; OLIVEIRA, M. F.; DE CASTRO, S.L. The activity on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones is mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 47, p. 644- 653, 2009.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**. v. 56, p. 185- 229, 2004.

MITTELMAN, M. W. Biological Fouling of Purified-Water Systems: Part 1, Bacterial Growth and Replication. **Microcontamination**, v. 10, n. 70, p. 51-55, 1985.

MOLYNEUX, D. Neglected tropical diseases. **Community Eye Health Journal**, v. 26, n. 82, p. 21- 24, 2013.

MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: How much are we really spending? **PLoS Medicine**, v. 6, p. 137- 146, 2009.

MOREL, C. M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 1522- 1523, 2006.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA- NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. *var. pallescens* (C. DC.) Yunck. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

NEMEIKAITĖ- CENIENE, A.; SARLAUSKAS, J.; ANUSEVICIUS, Z.; NIVINSKAS, H.; CENAS, N. Cytotoxicity of RH1 and related aziridinybenzoquinones: involvement of activation by NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) and oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 416, p. 110-118, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. New York: W. E. Freeman, 6ed., 2013, 1340 p.

NEVES, D.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Parasitologia Humana. 12ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 530 p.

NJOGU, P. M.; CHIBALE, K. Recent developments in rationally designed multitarget antiprotozoan agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1715- 1742, 2013.

NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; BONTA, M., NAVARRETE-ENCINA, P. A., SQUELLA J. A. Electrochemical characterization of *ortho* and *meta*-nitrotoluene derivatives in different electrolytic media: Free radical formation. **Electrochimica Acta**, v. 46, p. 4289-4300, 2001.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n 6, p. 976- 984, 2002.

OMOSA, L.; MIDIWO, J. O.; MBAVENG, A. T.; TANKEO, S. B.; SEUKEP, J. A.; VOUKENG, I. K.; DZOTAM, J. K.; ISEMEKI, J.; DERESE, S.; OMOLLE, R. A.; EFFERTH, T.; KUETE, V. Antibacterial activities and structure- activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes. **Springer Plus**, v. 5, p. 901- 920, 2016.

PAIVA, Y. G. ; DE SOUZA, A. A. ; LIMA-JUNIOR, C. G. ; SILVA, F. P. L. ; VASCONCELOS, C. C. ; DE ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F. ; VASCONCELOS, M. Correlation between electrochemical and theoretical studies on the leishmanicidal activity of twelve Morita- Baylis- Hillman adducts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 894- 904, 2012.

PAIVA, Y. G.; FERREIRA, R.; SILVA, T. L.; LABBE, E.; BURIEZ, O.; AMATORE, C.; GOULART, M. O. F. Electrochemically Driven Supramolecular Interaction of Quinones and Ferrocenes: An Example of Redox Activation of Bioactive Compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 136- 162, 2015.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 8, n. 46,. 2720- 2722, 2002.

PAULA, F. S. **Estudo Bioeletroquímico de Compostos Eletrobioativos. Relação Estrutura-Eletroatividade e Utilização de Biossensor de DNA no Estudo de Agentes Intercalantes e Alquilantes de DNA**. 2006. 180 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia)- Universidade Federal de Alagoas, Alagoas. 2006.

PAZ, M. M.; ZHANG, X.; LU, J.; HOLMGREN, A. A New Mechanism of Action for the Anticancer Drug Mitomycin C: Mechanism-Based Inhibition of Thioredoxin Reductase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 7, p. 1502-1511, 2012.

PETERSEN, P. J.; LABTHAVIKUL, P.; JONES, C. H.; BRADFORD, P. A. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p. 573- 576, 2006.

PÉREZ-SACAU, E.; DÍAZ-PEÑATE, R. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; GARCÍA-CASTELLANO, J. M.; PARDO, L.; CAMPILLO, M. Synthesis and Pharmacophore Modeling of Naphthoquinone Derivatives with Cytotoxic Activity in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cell Line. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 696–706, 2007.

PEREZ-SANCHEZ, C.; RUIZ-LIMON, P.; AGUIRRE, M. A. Mitochondrial dysfunction in antiphospholipid syndrome: implications in the pathogenesis of the disease and effects of coenzyme Q(10) treatment. **Blood**, v. 119, p. 5859- 5870, 2012.

PETRO, R.; SCHLESINGER, M. Applications of Electrochemistry in Medicine. In: SCHLESINGER, M. (Ed.). **Applications of Electrochemistry in Medicine**. London: Springer, 2013, p. 1- 34.

PEVERATI, R.; TRUHLAR, D. G. Quest for a Universal Density Functional: The Accuracy of Density Functionals across a Broad Spectrum of Databases in Chemistry and Physics. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 372, p. 20120476– 20120476, 2014.

PHILLIPS, R.M.; JAFFAR, M.; MAITLAND, D.J.; LOADMAN, P.M.; SHNYDER, S.D.; STEANS, G.; COOPER, P.A.; RACE, A.; PATTERSON, A.V.; STRATFORD, I.J. Pharmacological and biological evaluation of a series of substituted 1,4 -naphthoquinone bioreductive drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 2107-2116, 2004.

PINTO, A. V.; FERREIRA, V. F.; CAPELLA, R. S.; GILBERT, B.; PINTO, M. C. F. R.; SILVA, J. S. Activity of some naphthoquinones on bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 609- 610, 1987.

PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. **Molecules**, v. 14, p. 4570- 4590, 2009.

PLSIKOVA, J.; JANOVEC, L.; KOVAL, J.; UNGVARSKY, J.; MIKES, J.; JENDZELOYSKY, R.; FEDOROCKO, P.; IMRICH, J.; KRISTIAN, P.; KASPARKOVA, J.; BRABEC, V.; KOZURKOVA, M. 3,6-Bis (3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 283- 295, 2012.

PRATI, F.; ULIASSI, E.; BOLOGNESI, M. L. Two diseases, one approach: multitarget drug discovery in Alzheimer's and neglected tropical diseases. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 5, n. 7, p. 853–861, 2014.

PRATI, F.; BERGAMINI, C.; MOLINA, M. T.; FALCHI, F.; CAVALLI, A.; KAISER, M.; BOLOGNESI, M. L. 2-Phenoxy-1,4-naphthoquinones: From a Multitarget Antitrypanosomal to a Potential Antitumor Profile. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n.16, p. 6422–6434, 2015.

PROKOP, S.; MICHELSON, A. **Systems Biology in Biotech & Pharma** A Changing Paradigm. London: Springer, 2012, 146 p.

RAJENDRAN, M. Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 175-187, 2016.

RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor. **Drugs. Chemical Reviews**, v. 98, n. 8, p. 2723–2796, 1998.

RASSI JÚNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN- NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 152- 158, 2009.

REICH, H.; HONDAL, R. J. Why Nature Chose Selenium. **ACS Chemical Biology**, v.11, p. 821-841, 2016.

REICHMANN, M. E.; RICE, S. A.; THOMAS, C. A.; DOTY, P. A further examination of the molecular weight and size of desoxyribose nucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 3047-3053, 1954.

REICHSTEIN, A.; VORTHERMS, S.; BANNWITZ, S.; TENTROP, J.; PRINZ, H.; MÜLLER, K. Synthesis and Structure–Activity Relationships of Lapacho Analogues. 1. Suppression of Human Keratinocyte Hyperproliferation by 2-Substituted Naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-diones, Activation by Enzymatic One- and Two-Electron Reduction, and Intracellular Generation of Superoxide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p 7273–7284, 2012.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 367 p.

RIFFEL, A.; MEDINA, L. F.; STEFANI, V.; SANTOS, R. C.; BIZANIL, D.; BRANDELLI, A. *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 811- 818, 2002.

RODE, T. M.; LANGSRUD, S.; MORETRO. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress condition. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372-383, 2007.

RODRIGUEZ-BRENES, I. A.; KOMAROVA, N. L.; WODARZ, D. Tumor growth dynamics: insights into evolutionary processes. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 28, n.10, p. 597- 604, 2013.

ROSS, D.; KEPA, J. K.; WINSKI, S. L.; BEALL, H. D.; ANWAR, A.; SIEGEL, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene

regulation and genetic polymorphisms. **Chemico- Biological Interactions**, v. 129, p. 77-97, 2000.

SAITO, S. T.; SILVA, G.; PUNGARTNIK, C.; BRENDEL, M. Study of DNA–emodin interaction by FTIR and UV–vis spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 111, p. 59- 63, 2011.

SALAS, C. O.; FAÚNDEZ, M.; MORELLO, A.; MAYA, J. D.; TAPIA, R. A. Natural and Synthetic Naphthoquinones Active Against *Trypanosoma Cruzi*: An Initial Step Towards New Drugs for Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p. 144-161, 2011.

SALMON-CHEMIN, L.; LEMAIRE, A.; DE FREITAS, S.; DEPREZ, B.; SERGHERAERT, C.; DAVIOUD-CHARVE, E. Parallel Synthesis of a Library of 1,4-Naphthoquinones and Automated Screening of Potential Inhibitors of Trypanothione Reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 631- 635, 2000.

SALMON-CHEMIN, L.; BUISINE, E.; YARDLEY, V.; KOHLER, S.; DEBREU, M.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DAVIOUD- CHARVET, 2- and 3- Substituted 1, 4- Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and *in Vitro* Cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 548-565, 2001.

SANTINI-OLIVEIRA, M.; COLER, R. N.; PARRA, J.; VELOSO, V.; JAYASHANKAR, L.; PINTO, P. M.; CIOL, M. A.; BERGQUIST, R.; REED, S. G.; TENDLER, M. Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. **Vaccine**, v. 34, n. 4, p. 586- 594, 2016.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate- based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321- 324, 2007.

SAVAGE, R. E.; TYLER, A.N.; MIAO, X. S.; CHAN, T. C. K. Identification of a novel glucosylsulfate conjugate as a metabolite of 3, 4- dihydro- 2, 2- dimethyl- 2H-naphtho[1,2-b]pyran- 5, 6-dione (ARQ 501, β - Lapachone) in mammals. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 36, p. 753-758, 2008.

SAVARIZ, F. C.; FOGGIO, M. A.; GOES- RUIZ, A. L. T.; DA COSTA, W. F.; SILVA, M.; SANTOS, J. C. C.; FIGUEIREDO, I. M.; MEYER, E.; DE CARVALHO, J. E.; Sarragiotto, M. H. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 6867- 6875, 2014.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v.30, p. 1191- 1212, 2001.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox State and Redox Environment in Biology, In: FORMAN, H. J.; FUKUTO, J.M.; TORRES, M. (Ed). Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2004, p. 1- 15.

SCHNEIDER-STOCK, R.; FAKHOURY, I. H.; ZAKI, A. M.; EL-BABA, C. O.; GALI-MUHTASIB, H. U. Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 1, p. 18–30, 2014.

SHAABAN, S.; DIESTEL, R.; HINKELMANN, B.; MUTHUKUMAR, Y.; VERMA, R. P.; SASSE, F.; JACOB, C. Novel peptidomimetic compounds containing redox active chalcogens and quinones as potential anticancer agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 192- 205, 2012.

SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M. Gel electrophoresis and DNA interaction studies of the food colorant quinoline yellow. **Dyes and Pigments**, v. 96, p. 377- 382, 2013.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C.B.V. An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β -lapachone and derivatives. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407- 416, 2003.

SILVA, J. G.; DESPAIGNE, A. A.; LOURO, S. R. W.; BANDEIRA, C. C.; OUZAFAGUNDES, E. M.; BERALDO, H. Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 415- 426, 2013.

SILVA, M. M.; SAVARIZ, F. C.; SILVA-JÚNIOR, E. F.; AQUINO, T. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; SANTOS, J C. C.; FIGUEIREDO, I. M. Interaction of β -Carbolines with DNA: Spectroscopic Studies, Correlation with Biological Activity and Molecular Docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 1558- 1568, 2016.

SMITH, D. A. **Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicity of Functional Groups Impact of Chemical Building Blocks on ADMET**. Cambridge: RSC Publishing, 2010, 530 p.

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

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486- 495, 2016.

SOUZA, A. A. **Estudos Bioeletroquímicos de nitroquinonas derivadas da nor- β -lapachona**. 2011. 152f. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2011.

SPERANDEO, N. R.; BRUN, R. Synthesis and biological evaluation of pyrazolynaphthoquinones as new potential antiprotozoal and cytotoxic agents. **Chemical Biological Communications**, v. 4, p. 69- 72, 2003.

SPERANDEO, N. R.; BRINON, M. C.; BRUN, R. Synthesis, antiprotozoal and cytotoxic activities of new N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1,2-naphthoquinone-4-amino derivatives. **Farmaco**, v. 59, p. 431- 435, 2004.

STURM, J.C.; NÚÑEZ- VERGARA, L. J.; FUENTE, J.; CASTRO, C.; NAVARRETE-ENCINA, P.; SQUELLA, J. A. Substituent Effects on the Electrochemistry and Photostability of Model Compounds of Calcium Channel Antagonist Drugs. **Journal of the Electrochemical Society**, p. 399- 404, 2001.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J. M. **Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity**. London: Academic Press, 1991, 376 p.

TARLOVSKY, M. N.; GOIJMAN, S. G.; MOLINA PORTELA, M. P.; STOPPANI, A. O. Effects of isoxazolynaphthoquinoneimines on growth and oxygen radical production in *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. **Experientia**, v. 46, p. 502–505, 1990.

TAVARES, L. C. QSAR: the Hansch's approach. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631- 639, 2004.

TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory - design and description. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 19, p. 453- 463, 2005.

THOMAS, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction**. 2 ed. London: John Wiley & Sons Inc, 2007, 646 p.

THOMSON, K.; LIU, D.; KAISER, K. L. E. A direct resazurin test for measuring chemical toxicity. **Toxicity Assessment**, v. 1, p. 407-418, 1986.

TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. **Handbook of Molecular Descriptors**, Weinheim: Wiley-VCH, 2000, p.667.

TONG, W.; WANG, R.; CHAI, D.; LI, Z.; PEI, F. *In vitro* activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem- resistant *Acinetobacter spp.* **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 454- 456, 2006.

TONHOLO, J.; FREITAS, L. R.; DE ABREU, F. C.; AZEVEDO, D. C.; ZANI, C. L.; DE OLIVEIRA, A. B. Electrochemistry properties of biologically active heterocycles naphthoquinones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 12, p. 163- 169, 1998.

SPANOA, D.; HECKC, C.; DE ANTONELLISA, P.; CHRISTOFORI, G.; ZOLLOA, N. Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 234- 249, 2012.

SPERANDEO, N. R.; BRUN, R. Synthesis and biological evaluation of pyrazolynaphthoquinones as new potential antiprotozoal and cytotoxic agents. **European Journal of Chemical Biology**, v. 4, p. 69- 72, 2003.

SPERANDEO, N. R.; BRINON, M. C.; BRUN, R. Synthesis, antiprotozoal and cytotoxic activities of new N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1,2-naphthoquinone-4-amino derivatives. **Farmaco**, v. 59, p. 431- 435, 2004.

TENDLER, M.; ALMEIDA, M.; SIMPSON, A. Development of the Brazilian anti Schistosomiasis vaccine based on the recombinant fatty acid binding protein Sm14 plus GLA-SE adjuvante. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1- 6, 2015.

TETKO, I. V. Computing chemistry on the web. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1497-1500, 2005.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 2999- 3094, 2005.

TOTEVA, M.; RICHARD, J. The generation and reactions of quinone methides. **Advances in Physical Organic Chemistry**, v. 45, p. 39- 91, 2011.

TROPSHA, A. Application of Predictive QSAR Models to Database Mining, In: OPREA, T. I. (Ed.). **Chemoinformatics in Drug Discovery**. New York: WILEY-VCH, 2005, p. 437- 455.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001.

VAN NORREN, K.; VAN HELVOORT, A.; ARGILÉS, J. M.; VAN TUIJL, S.; ARTS, K.; GORSELINK, M.; LAVIANO, A.; KEGLER, D.; HAAGSMAN, H. P.; VAN DER BEEK, E. M. Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue. **British Journal of Cancer**, p. 311- 314, 2009.

VASCONCELLOS, M. C.; DE OLIVEIRA COSTA, C.; TERTO, E. G. S. ; DE MOURA, M. A. F. B. ; DE VASCONCELOS, C. C. ; de Abreu, F. C.; DE LEMOS, T. L. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C. Electrochemical, Spectroscopic and Molecular Cytogenetic Approaches toward the Understanding of Biflorin Cytotoxic and Genotoxic Effects. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 765, p. 168-178, 2016.

VCCLAB– **Virtual Computational Chemistry Laboratory. Dragon Descriptors**. Disponível em < http://www.vcclab.org/lab/indexhlp/dragon_descr.html> Acesso em nov. 2016.

VIEIRA, A. A.; BRANDÃO, I. R.; VALENÇA, W. O.; DE SIMONE, C. A.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; CARNEIRO, T. R.; BRAGA, A. L.; DA SILVA JÚNIOR, E. N.; Hybrid Compounds with Two Redox Centres: Modular Synthesis of Chalcogen-Containing Lapachones and Studies on their Antitumor Activity, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 254- 265, 2015.

VIERTLER, H.; GRUBER, J.; PARDINI, V. L. Anodic Oxidation of Sulfur- and Selenium-Containing Compounds, In: LUND, H; HAMMERICH, O. (Ed.). **Organic Electrochemistry**, 4th. ed., New York: Marcel Dekker, 2001, p. 621- 668.

VIJAN, L. E.; RADUCU, A. Spectroscopic Study of Hedamycin- DNA. **Interaction Macromolecular Symposium**, v. 265, p. 268–271, 2008.

VUJCI, M. T.; TUFEGDZI, S.; NOVAKOVIC, I.; DJIKANOVIC, D.; GASI, M. J.; SLADIC, D. Studies on the interactions of bioactive quinone avarone and its methylamino derivatives with calf thymus DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 405- 410, 2013.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306- 1320, 2012.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**, 2ed. London: Elsevier, 2003, 768 p.

WERMUTH, C. G. Selective Optimization of Side Activities: Another Way for Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 1303-1314, 2004.

WERMUTH, C. G.; ALDOUS, D.; RABOISSON, P.; ROGNAN, D. **The Practice of Medicinal Chemistry**, 4ed. London: Elsevier, 2015, 880 p.

WOO, C. C.; KUMAR, A. P.; SETHI, G.; TAN, K. H. B. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 443- 451, 2012.

YANKOVSKAYA, V.; HORSEFIELD, R.; TORNROTH, S.; LUNA- CHAVEZ, C.; MIYOSHI, H.; LÉGER, C.; BYRNE, B.; CECCHINI, G.; IWATA, S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. **Science**, v. 299, .p. 700- 704, 2003.

ZAVASCKI, A. P.; CARVALHAES, C. G.; PICÃO, R. C.; GALES, A. C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 1, p. 71-93, 2010.

ZHANG, Y.; ZHOU, B.; ZHANG, X. P.; HUANG, P.; LI-CH, L. Y. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 1345- 1352, 2009.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. Benchmark Databases for Nonbonded Interactions and Their Use To Test Density Functional Theory. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 1, p. 415- 432, 2005.

ZHAO, N.; WANG, X.; PAN, H.; HU, Y.; DING, L. Spectroscopic studies on the interaction between tryptophan-erbium (III) complex and herring sperm DNA.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 75, n. 5, p. 1435- 1442, 2010.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310 -316, 2009.

ANEXOS: TRABALHOS PUBLICADOS

Bioorganic & Medicinal Chemistry 22 (2014) 1608–1619



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

1,2,3-Triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: Potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones



Eduardo H. G. da Cruz^a, Caio M. B. Hussene^a, Gleiston G. Dias^a, Emilay B. T. Diogo^a, Isadora M. M. de Melo^a, Bernardo L. Rodrigues^a, Mauro G. da Silva^b, Wagner O. Valença^c, Celso A. Camara^c, Ronaldo N. de Oliveira^c, Yen G. de Paiva^d, Marília O. F. Goulart^d, Bruno C. Cavalcanti^e, Cláudia Pessoa^e, Eufrânio N. da Silva Júnior^{a,*}

^aInstituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^bDepartamento de Química Fundamental, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^cDepartamento de Ciências Moleculares, UFRPE, 52171-900 Recife, PE, Brazil

^dInstituto de Química e Biotecnologia, UFAL, Tabuleiro do Martins, 57072-970 Maceió, AL, Brazil

^eLaboratório Nacional de Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2013

Revised 13 January 2014

Accepted 20 January 2014

Available online 31 January 2014

Keywords:

1,4-Naphthoquinone

Lapachol

1,2,3-Triazoles

Click chemistry

Cancer

ABSTRACT

1,2,3-Triazole-, arylamino- and thio-substituted naphthoquinones (24, 8, and 2 representatives, respectively) were synthesized in moderate yields and evaluated against several human cancer cell lines (blood, ovarian, breast, central nervous system, colon, and prostate cancers and melanoma), showing, for some of them, IC₅₀ values below 2 μM. The cytotoxic potential of the tested naphthoquinones was also assayed on non-tumor cells such as human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and two murine fibroblast lines (L929 and V79 cells). α-Lapachone- and nor-α-lapachone-based 1,2,3-triazoles and arylamino-substituted naphthoquinones showed potent cytotoxicity against different cancer cell lines. The compounds may represent promising new lead derivatives for anticancer drug development. The electrochemical properties of selected compounds were evaluated in an attempt to correlate them with antitumor activity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are important participants in regulating normal cellular processes. A deregulated redox balance may contribute to the development of several human diseases, including cancers, as recently reported by Nogueira and Hay.¹ Several types of cancer cells exhibit disturbed intracellular redox balance, differentiating them from their non-cancerous counterparts.² ROS may act directly with DNA, lipids, and proteins to induce cell damage.³ The alkylation of crucial proteins and nucleic acids can also cause cell damage.⁴ Compared to non-cancerous cells, the reactive oxygen species (ROS) levels are considerably closer to the critical redox threshold at which cell death is induced.² These biochemical differences between healthy and malignant tissues are significant and may be exploited in the design of selective drugs.²

Compounds that are able to modulate the redox balance in cancer cells are potential candidates for the development of anticancer drugs.^{5–7} In general, these compounds catalyze the oxidation of redox-sensitive, thiol-containing proteins and enzymes and/or significantly increase intracellular ROS levels. These features relate to subsequent processes that lead to apoptosis.⁷ Quinones belong to this class of compounds, as they are capable of increasing intracellular ROS levels over a critical threshold and therefore may induce apoptosis in cancer cells.

Electrochemistry is the standard method for studying redox systems. Electrochemical techniques applied to biology are continuously described in the literature and provide both kinetic and thermodynamic information.⁸ Electrochemical methods are useful in the characterization and ultimately the design of redox-modulating natural products and drugs, including potential antioxidants and anticancer agents.⁹ Among these techniques, cyclic voltammetry can rapidly evaluate the redox properties of some of those compounds, including quinones. The usual parameters normally obtained and employed, especially in cyclic voltammetry, are the

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34095720; fax: +55 31 34095700.

E-mail address: eufranio@ufmg.br (E.N. da Silva Júnior).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.01.033>

0968-0896/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

potentials of the oxidation (Epa) and reduction (Epc) peaks or Eredox (Epc + Epa)/2 (for reversible systems) or Epc – Epa/2 (for irreversible ones). The potential Eredox or similar parameters give a quantitative measure of the ease of reduction of an oxidant or electron acceptor, A, since the more positive the value of the potential of the couple E(A/A⁻), the more powerful the oxidant. Similarly, the more negative the value of E(A^{+/A}), the more powerful the reductant.⁹ The Epc or the Eredox of the first peak or system, respectively, are the ones to be used in correlation of electrochemistry and biological activities.^{8a} With this approach these data may even be useful in the rational design of such compounds as part of a special chemical structure–electrochemical potential–biological activity relationship. Nonetheless, one must bear in mind that electrochemical parameters such Epa and/or Epc are only one measure and other data, like abundance, distribution, accessibility are also decisive factors in vitro or cell environments.^{8b,10}

The mechanism of action of quinonoid anti-tumor agents has been thoroughly investigated.¹⁰ Under aerobic conditions, that is, in organs with sufficient blood supply, a one-electron reduction predominates, resulting in free-radical intermediates that undergo back oxidation in the presence of oxygen, releasing reactive oxygen species (ROS).^{8,11} This may cause damage to the DNA of the tumor cell, but normal cells are also negatively affected. A two-electron reduction of the quinone function followed by its inactivation through subsequent glucuronidation and/or sulfation or by the conversion of the hydroquinone into an alkylating intermediate is an alternative pathway.¹¹ This mechanism is believed to predominate under anaerobic conditions.¹²

Recently, our research group has described the synthesis of redox modulating quinone compounds. To access substances with different redox behaviors, we have appended groups such as arylamines,¹³ 1,2,3-triazoles,¹⁴ azides,¹⁴ among others, onto the quinone moiety.¹⁵

Through our efforts to design molecular scaffolds using hybridization protocols, we report herein the extension of our approach, which includes modification of 1,4-naphthoquinones with triazoles (1–19) and sugars (20–21) to enhance the bioavailability of the compounds, the insertion of a second quinone group (22–24) to potentially increase ROS release and through the use of phenylthiolated compounds to connect chalcogens¹⁶ to the main structure. Additionally, we have synthesized compounds 28–35, isomers of substituted arylamino-nor-β-lapachones,¹³ which are widely recognized as highly active cytotoxic compounds, in order to compare the effect of the para-quinone moiety on their activity and electrochemical behavior. Among the thirty-four compounds assayed, sixteen are new and are fully characterized. Eleven of the cell lines used are cancerous, and three are non-cancerous.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

2-Bromo-1,4-naphthoquinone and 2-chloro-1,4-naphthoquinone were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lapachol (25) (2-hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl)-1,4-naphthoquinone) was extracted from the heartwood of *Tabebuia* sp. (Tecoma) and purified by a series of recrystallizations.¹⁷ Nor-lapachol (38) (2-hydroxy-3-(2'-methyl-propenyl)-1,4-naphthoquinone) was obtained as a crystalline orange solid by Hooker oxidation of quinone 25.¹⁸

As previously described, the first group of compounds was prepared using click chemistry reaction¹⁹ with the respective azide derivatives.²⁰ 4-Azido-α-lapachone and 3-azido-nor-α-lapachone were synthesized and used to prepare the 1,2,3-triazole analogues 1–6 in moderate yields, as shown in Figure 1.

The second group, 1,4-naphthoquinone-based 1,2,3-triazoles 7–19, was previously described (Fig. 2).²¹ Compounds 20–24 are herein described for the first time.

para-Naphthoquinones 7–19 were synthesized by clicking a series of N-phthalimidoalkylazides with the respective naphthoquinones. Compounds 18 and 19 were prepared by the same methodology using 1-azido-3-nitrobenzene (Fig. 2).

Unpublished compounds 20–24 were obtained by reaction of azide-substituted carbohydrate or naphthoquinone and the alkyne-substituted quinone. Compounds 20–24 were obtained in high yields using copper iodide(I) in acetonitrile as the reaction medium (Scheme 1).

The unpublished arylamino-substituted α-lapachones 28–35, were prepared from lapachol (25), as shown in Scheme 2. The first step consisted of the simple cyclization of lapachol (25) to α-lapachone (26) using HCl/HOAc. Compound 27 reacted with various anilines containing electron donating and electron withdrawing groups to prepare 28–35. The compounds were obtained in high yields, and their structures were determined by IR, ¹H and ¹³C NMR and by comparing their spectroscopic data with those of already reported similar compounds.²² Electrospray ionization mass spectra and combustion analysis data were also obtained for unpublished compounds.

The last class of compounds was obtained using similar methodology. The respective bromo derivatives were prepared and were reacted with thiophenol as shown in Scheme 3. Compounds 36 and 39 were isolated in moderate yields as yellow solids.

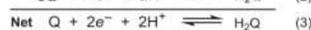
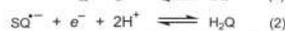
2.2. Electrochemistry

Several studies have investigated and reported on the electrochemical behavior of quinones. Some correlation has been observed between the electrochemical parameters (Epc1: potential of the first reduction peak) and biological activities.²³

The single electron reduction of quinones by enzymes such as NADH-cytochrome P450 oxidoreductase initiates redox cycling and oxidative stress and then the relative one-electron reduction potentials of quinones control the position of the equilibrium defining the electron transfer between the semiquinone and oxygen.²⁴ Also, the first reduction step of quinones can be correlated with the unoccupied molecular orbital of lower energy (LUMO).^{23b}

In the context of cancer, there is a considerable number of positive correlations.²⁴

The quinone/semiquinone/hydroquinone (Q/SQ⁻/H₂Q) triad is an important component of many redox systems in biology. It is a vital link for the transfer of electrons through cells and tissues (Eqs. 1–3).²⁵



In typical measurements, cyclic voltammograms (CV) were recorded in aprotic medium (DMF + TBAP, 0.1 mol L⁻¹), at a scan rate of 100 mV s⁻¹. This enabled determination of the electrochemical reduction behavior of each compound. Cathodic and anodic peaks for each compound are listed in Table 1.

It was not feasible to study all of the quinones in the present work. Representative compounds 20 and 21 (Scheme 1), 28 and 34 (Scheme 2) and 39 (Scheme 3) were selected to encompass each of the structural classes. The present electrochemical study complements recently published results.²¹ In Table 1, the previously reported electrochemical data of compounds 2, 3 and 10 are presented in a more complete form to allow comparison and rationalization of the electrochemical behavior. It is out of the scope of

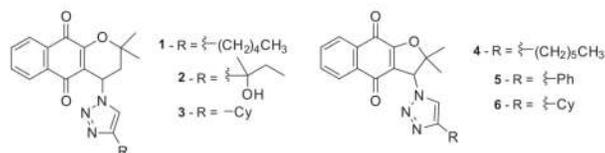
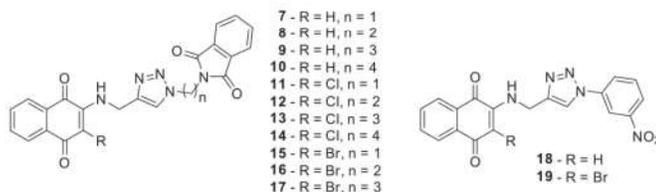
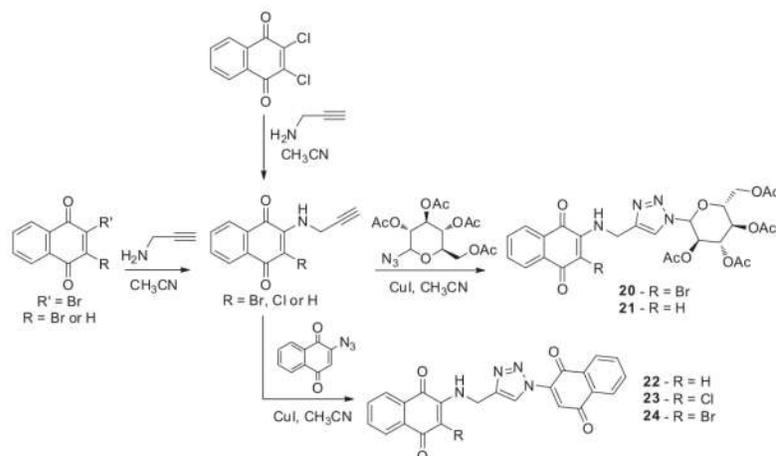
Figure 1. Nor- α -lapachone and α -lapachone-based 1,2,3-triazoles 1–6.

Figure 2. 1,4-Naphthoquinone-based 1,2,3-triazoles 7–19.



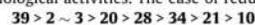
Scheme 1. 1,4-Naphthoquinone-based 1,2,3-triazoles 20–24.

the present paper, the rationalization of the electrochemical behavior.

As has been noted, the compounds described here can be divided among four structural classes: dihydropyran-*para*-naphthoquinones (**2** and **3**), *para*-naphthoquinone derivatives (**10**, **20** and **21**), nitroaniline-substituted α -lapachones (**28** and **34**) and a thiolated nor- α -lapachone (**39**). Figure 3 shows the cyclic voltammograms of the compounds **20**, **21**, **28**, **34** and **39**.

The first two quinones (**20** and **21**), similar to compounds **2** and **3**,²¹ exhibited quasi-reversible reduction behavior (Fig. 3), which is typical of simple and well-behaved quinones (Eqs. 1 and 2). The CV profiles of the other four compounds (**10**,²¹ **28**, **34** and **39**) are much more complex due to the presence of other electroactive groups.

The major electrochemical parameters for each compound are listed in Table 1. Epc1 values are most commonly used to compare biological activities. The ease of reduction is as follows:



Compounds **28** and **34** display electrochemical behavior similar to *m*-nitroaniline-substituted nor- β -lapachone.²⁶ As observed in Figure 3, four and three cathodic peaks are displayed for **28** (*para* derivative) and **34** (*meta* derivative), respectively. The first peak of the CV of **28** has a cathodic peak potential (Epc1) of -0.674 V, while for **34**, the value is -0.684 V. These cathodic peaks display two corresponding backward peaks, revealing quasi-reversible behavior.

For **34**, the first pair of peaks observed is consistent with an initial one-electron reduction of the *para*-quinone to form the semiquinone radical according to Eq. 4:

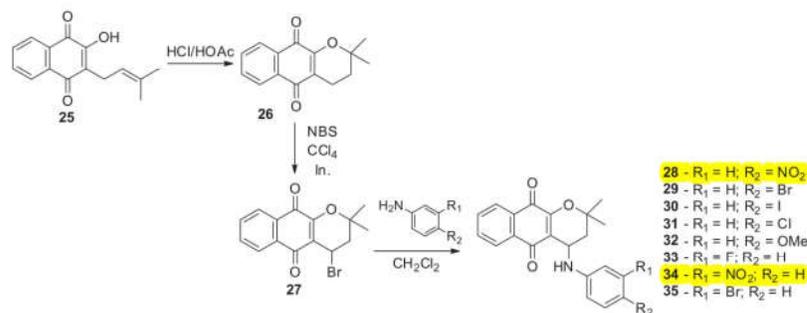
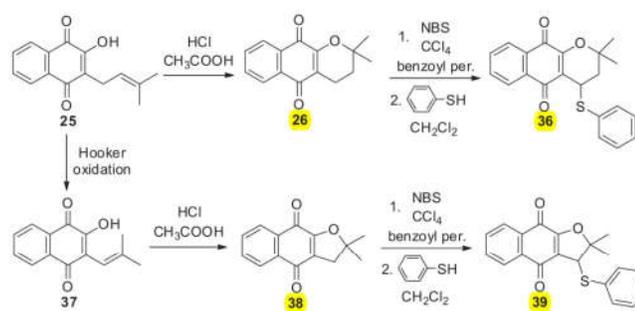
Scheme 2. Arylamino-substituted α -lapachones **28–35**.Scheme 3. Thio derivatives **36** and **39**.

Table 1

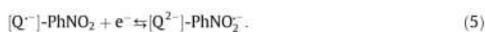
Major electrochemical parameters of the quinones ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), in DMF/TBAP, 0.1 mol L^{-1} , versus Ag/AgCl, Cl^{-} , $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Compounds	Epc1 (V)	Epc2 (V)	Epc3 (V)	Epc4 (V)	Epa1 (V)	Epa2 (V)	Epa3 (V)	Epa4 (V)
2 ^a	−0.632	−1.116	—	—	−0.940	−0.540	—	—
3 ^b	−0.630	−1.147	—	—	−0.967	−0.547	—	—
10 ^a	−0.807	−1.348	−2.085	−2.471	−1.151	−0.779	—	—
20	−0.642	−1.281	—	—	−1.098	−0.544	—	—
21	−0.797	−1.378	—	—	—	−0.709	—	—
28	−0.674	−1.177	−1.392	−2.114	−1.333	−1.045	−0.596	—
34	−0.684	−1.169	−1.842	—	−1.050	−0.811	−0.607	—
39	−0.556	−1.132	−1.500	—	−1.385	−1.139	−0.479	−0.030

Epc1: potential of the first cathodic peak; Epc2: potential of the second cathodic peak; etc; Epa1: potential of the first anodic peak; etc.

^a Ref. 21.

According to a previous article reporting the reduction of a similar compound (nor- β -lapachone derivative) on mercury,²⁷ the second cathodic pair of peaks, twice as intense as the first peak and appearing at -1.169 V , should correspond to the subsequent one-electron reduction of the electrogenerated semiquinone and to the formation of the nitroanion radical (Eq. 5), leading to a dianion quinone-nitro radical, which is further reduced, in the third peak, in a conventional nitroaromatic reduction:¹⁰



For compound **28**, the two waves are separated (Epc2 = -1.177 V and Epllc = -1.392 V) and until now, it has not been possible to determine their nature. Studies on this subject are under way.

For compound **39**, the most readily reduced in the series and, to our knowledge, a previously unreported compound, a different electrochemical profile is observed. The first two redox systems correspond to Eqs. 1 and 2, and the third one, which has an irreversible nature, suggests the occurrence of a dissociative electron transfer with cleavage of the C–S bond. Studies to elucidate the electrochemical behavior are ongoing.

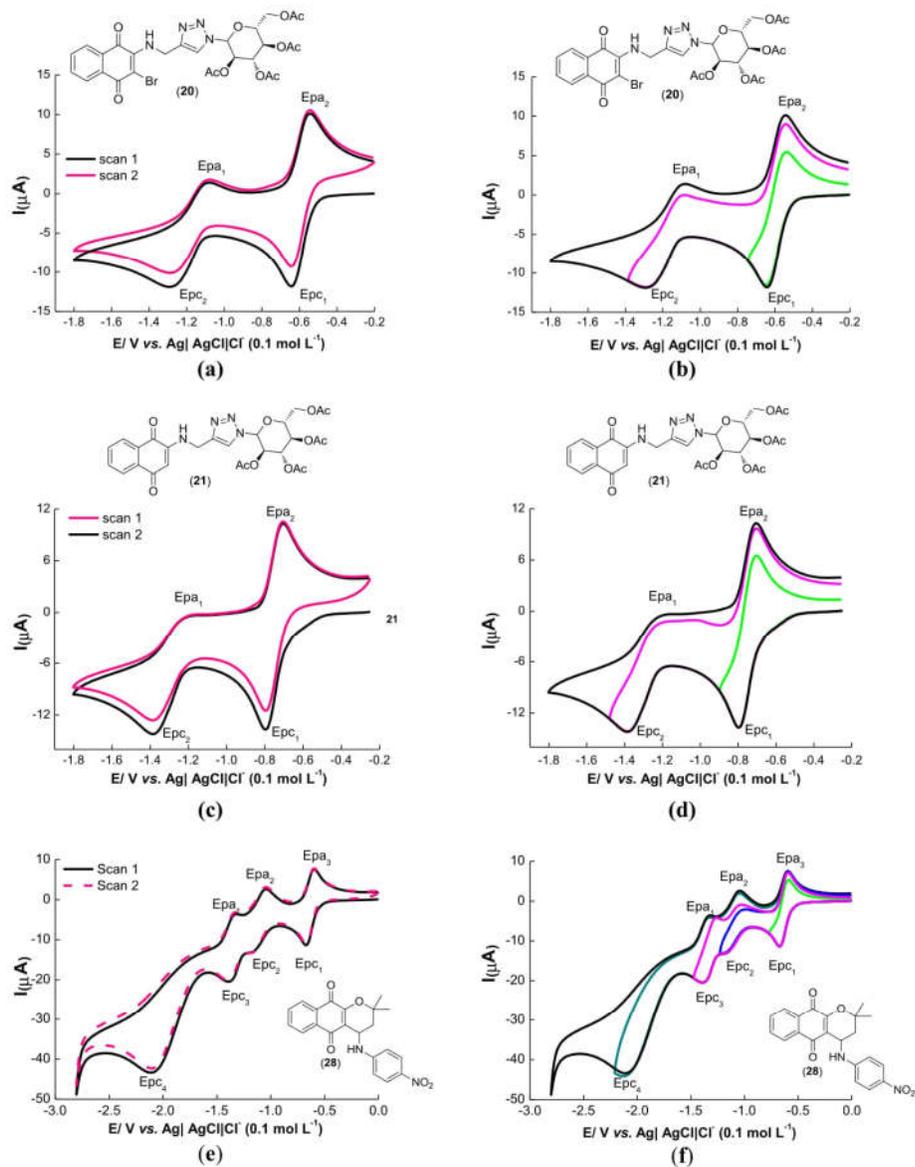


Figure 3. Cyclic voltammograms of naphthoquinones **20**, **21**, **28**, **34**, and **39** ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}), DMF/TBAP (0.1 mol L^{-1}), glassy carbon electrode, versus Ag/AgCl , Cl^- , cathodic direction, $\nu = 100$ mV s^{-1} .

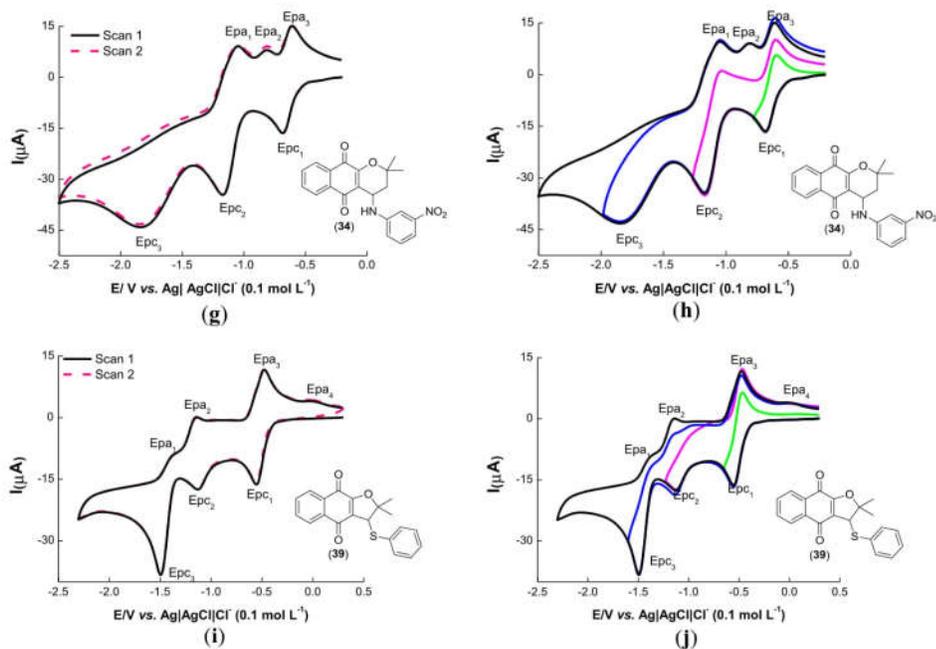


Fig. 3 (continued)

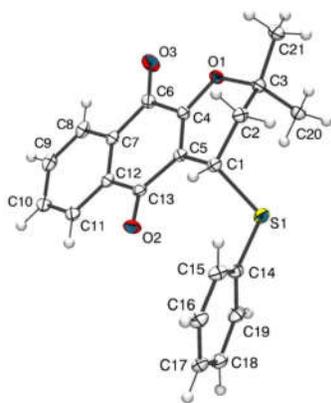


Figure 4. ORTEP-3 projection of compound **36**, showing atom labeling and displacement ellipsoids drawn at the 40% probability level.

2.3. X-ray analysis

The Ortep-3 diagram of **36** is shown in Figure 4. The crystallographic data collection and refinement parameters are shown in Table 2. Compound **36** crystallizes in the triclinic space group $P\bar{1}$,

Table 2

Crystal data and structure refinement for compound **36**

Empirical formula	$C_{21}H_{17}O_3S$	
Formula weight	349.41	
Temperature	150(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Triclinic, $P\bar{1}$	
Unit cell dimensions	$a = 9.1351(6)$ Å	$\alpha = 108.220(7)^\circ$
	$b = 9.3814(8)$ Å	$\beta = 100.266(6)^\circ$
	$c = 10.4100(8)$ Å	$\gamma = 97.646(6)^\circ$
Volume	$816.66(11)$ Å ³	
Z, calculated density	2, 1.421 mg/m ³	
Absorption coefficient	0.216 mm ⁻¹	
$F(000)$	366	
Crystal size	$0.16 \times 0.10 \times 0.07$ mm ³	
Theta range for data collection	2.12 – 29.55°	
Limiting indices	$-11 \leq h \leq 12$, $-7 \leq k \leq 12$, $-13 \leq l \leq 14$	
Reflections collected	6145	
Independent reflections	3797 [$R(\text{int}) = 0.0274$]	
Completeness to theta = 26.32°	100%	
Absorption correction	Analytical	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	
Data/restraints/parameters	3797/0/228	
Goodness-of-fit on F^2	1.037	
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0424$, $wR2 = 0.1036$	
R indices (all data)	$R1 = 0.0553$, $wR2 = 0.1128$	
Largest diff. peak and hole	0.350 and -0.379 e Å ⁻³	

with one molecule in the asymmetric unit. The bond lengths and angles are in good agreement with expected values, based on each atomic type. Two planes may be defined through the carbon skeleton of the molecule. Plane 1 is formed by the quinonoid ring

Table 3
Cytotoxic activity expressed by IC₅₀ (µg/mL) [95% CI] of compounds **1–24**, **28–36** and **39** in cancer and normal cell lines after 72 h exposure, obtained by nonlinear regression for all cell lines from three independent experiments

Compounds	IC ₅₀ (µg/mL) [95% CI]													
	HL-60	OVCA8-8	MDA-MB435	SF295	HCT-8	HCT-116	PC3	DU-145	MCF-7	MX1	HS578c	FBMC	L929	V79
1	0.52 [1.37]	2.53 [6.67]	1.05 [2.77]	1.05 [2.77]	1.69 [4.45]	1.87 [4.93]	1.39 [3.66]	0.94 [2.48]	1.20 [3.16]	0.91 [2.40]	1.17 [3.08]	2.95 [7.77]	1.89 [4.98]	2.12 [5.59]
	(0.39–0.61)	(2.37–2.70)	(0.83–1.25)	(0.83–1.25)	(1.46–1.73)	(1.51–2.06)	(1.22–1.48)	(0.73–1.16)	(1.08–1.37)	(0.82–0.98)	(1.02–1.30)	(2.66–3.20)	(1.53–2.07)	(1.74–2.41)
2	0.81 [2.12]	1.82 [4.77]	0.80 [2.10]	1.61 [4.22]	1.04 [2.73]	1.22 [3.20]	1.17 [3.07]	1.28 [3.36]	1.19 [3.12]	1.30 [3.41]	1.16 [3.04]	1.82 [4.77]	1.47 [3.85]	1.55 [4.06]
	(0.69–0.96)	(1.59–2.08)	(0.61–0.93)	(1.43–1.80)	(0.83–1.21)	(1.05–1.42)	(1.08–1.24)	(1.13–1.47)	(1.10–1.28)	(1.18–1.46)	(0.92–1.27)	(1.67–2.19)	(1.13–1.70)	(1.32–1.75)
3	4.08 [10.42]	5.91 [15.10]	4.17 [10.65]	4.42 [11.29]	4.81 [12.29]	4.1 [10.47]	4.38 [11.19]	4.57 [11.67]	>5	>5	4.25 [10.86]	>5	4.89 [12.49]	4.70 [12.00]
	(3.79–4.23)	(5.62–6.16)	(3.78–4.39)	(4.19–4.67)	(4.79–4.85)	(3.82–4.30)	(4.04–4.77)	(4.29–4.82)	>5	>5	(4.11–4.48)	>5	(4.71–4.94)	(4.61–4.87)
4	0.72 [1.90]	2.03 [5.35]	1.51 [3.98]	4.24 [11.17]	2.02 [5.32]	1.85 [4.88]	3.86 [10.17]	3.75 [9.88]	3.57 [9.41]	2.78 [7.33]	3.14 [8.28]	3.42 [9.01]	3.15 [8.30]	2.74 [7.22]
	(0.43–1.02)	(1.91–2.25)	(1.40–1.57)	(3.94–4.51)	(1.82–2.17)	(1.57–2.17)	(3.67–3.95)	(3.62–3.81)	(3.47–3.61)	(2.55–2.93)	(2.93–3.27)	(3.20–3.58)	(2.91–3.37)	(2.59–2.93)
5	1.61 [4.34]	2.68 [7.22]	1.84 [4.95]	1.28 [3.44]	3.37 [9.07]	3.07 [8.27]	2.16 [5.82]	1.74 [4.68]	2.58 [6.95]	2.20 [5.92]	2.14 [5.76]	2.98 [8.02]	3.12 [8.40]	2.83 [7.62]
	(1.45–1.84)	(2.46–2.81)	(1.69–1.93)	(0.93–1.45)	(3.20–3.48)	(2.61–3.47)	(1.98–2.31)	(1.52–1.90)	(2.32–2.76)	(2.07–2.41)	(2.09–2.25)	(2.74–3.14)	(2.71–3.38)	(2.57–3.04)
6	1.06 [2.70]	2.03 [5.38]	1.04 [2.76]	1.2 [3.18]	2.53 [6.70]	2.08 [5.51]	1.62 [4.29]	2.07 [5.48]	1.59 [4.21]	1.87 [4.95]	2.78 [7.36]	2.50 [6.62]	2.31 [6.12]	2.31 [6.12]
	(0.85–1.19)	(1.95–2.17)	(0.88–1.17)	>5	(2.28–2.82)	(1.81–2.20)	(1.48–1.85)	(1.83–2.29)	(2.06–2.31)	(1.38–1.74)	(1.56–1.91)	(2.59–2.94)	(2.37–2.71)	(2.16–2.54)
7	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
8	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
9	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
10	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
11	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
12	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
13	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
14	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
15	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
16	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
17	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
18	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
19	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
20	0.79 [1.19]	1.82 [2.80]	1.77 [2.67]	1.88 [2.83]	1.46 [2.20]	2.91 [4.39]	>5	2.7 [4.07]	1.93 [2.91]	2.38 [3.59]	2.44 [3.68]	3.16 [4.76]	2.43 [3.66]	2.38 [3.59]
	(0.43–1.36)	(1.50–2.27)	(1.42–2.01)	(1.40–2.54)	(1.14–1.82)	(2.67–3.49)	>5	(2.28–3.10)	(1.24–2.42)	(2.07–2.63)	(2.16–2.92)	(2.90–3.27)	(2.25–2.78)	(1.81–2.67)
21	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
22	0.33 [0.80]	1.18 [2.86]	1.27 [3.09]	1.57 [3.82]	1.11 [2.70]	>5	2.06 [5.02]	2.19 [5.34]	1.51 [3.67]	1.52 [3.70]	2.33 [5.68]	2.78 [6.77]	2.14 [5.21]	2.55 [6.21]
	(0.22–0.50)	(0.97–1.42)	(0.88–1.52)	(1.07–2.29)	(0.74–1.35)	>5	(1.58–2.37)	(1.80–2.34)	(1.17–1.93)	(1.10–1.83)	(2.04–2.56)	(2.41–3.07)	(1.91–2.43)	(2.24–2.79)
23	1.52 [3.42]	2.7 [6.02]	1.48 [3.33]	2.47 [5.55]	3.15 [7.08]	2.96 [6.65]	2.41 [5.42]	2.19 [4.92]	3.45 [7.76]	1.82 [4.02]	2.08 [4.68]	4.52 [10.16]	3.04 [6.83]	3.16 [7.10]
	(1.15–1.82)	(2.40–3.03)	(1.12–1.93)	(2.14–2.86)	(2.75–3.62)	(2.49–3.31)	(2.07–2.84)	(1.90–2.94)	(3.28–3.81)	(1.44–2.16)	(1.73–2.31)	(4.23–4.89)	(2.72–3.41)	(2.77–3.45)
24	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
28	1.61 [4.26]	2.52 [6.66]	2.05 [5.42]	1.88 [4.97]	2.14 [5.66]	2.19 [5.79]	2.32 [6.13]	2.71 [7.16]	2.09 [5.52]	2.25 [5.95]	2.25 [5.95]	0.76 [2.01]	0.52 [1.37]	0.61 [1.61]
	(1.34–1.82)	(2.18–2.80)	(1.83–2.17)	(2.01–2.48)	(1.52–2.16)	(1.84–2.32)	(1.88–2.85)	(2.34–3.29)	(1.76–2.45)	(1.53–2.61)	(0.60–0.97)	(0.38–0.61)	(0.47–0.73)	(0.47–0.73)

29	1.95 [4.73] (1.77–2.16)	2.28 [5.53] (2.07–2.40)	2.16 [5.24] (1.92–2.77)	2.63 [6.38] (2.60–2.84)	2.19 [5.31] (1.90–2.36)	2.41 [5.84] (2.27–2.61)	2.23 [5.41] (1.74–3.15)	2.05 [4.97] (1.52–2.64)	2.61 [6.33] (2.17–3.05)	2.64 [6.40] (2.09–3.12)	1.19 [2.89] (0.87–1.47)	0.98 [2.38] (0.65–1.14)	1.05 [2.55] (0.70–1.25)
30	3.16 [6.88] (2.98–3.34)	>5 (1.0)	4.1 [9.01] (3.75–4.47)	4.22 [9.19] (3.82–4.51)	>5 (1.0)	>5 (1.0)	4.16 [9.06] (3.81–5.08)	3.48 [7.53] (3.15–4.10)	4.31 [10.69] (4.16–5.34)	4.31 [9.17] (3.59–5.37)	1.48 [3.22] (1.34–1.62)	1.06 [2.31] (0.73–1.20)	1.17 [2.55] (0.84–1.31)
31	0.36 [0.98] (0.23–0.45)	0.34 [1.47] (0.38–0.71)	0.37 [1.00] (0.22–0.50)	0.26 [0.71] (0.21–0.32)	0.24 [0.65] (0.10–0.31)	0.20 [0.54] (0.13–0.28)	0.37 [1.00] (0.28–0.55)	0.36 [0.98] (0.22–0.51)	0.28 [0.76] (0.17–0.34)	0.22 [0.60] (0.13–0.29)	1.19 [0.52] (0.76–1.32)	0.68 (0.43–0.96)	0.55 (0.33–0.69)
32	0.07 [0.19] (0.03–0.15)	0.16 [0.44] (0.13–0.21)	0.21 [0.58] (0.10–0.22)	0.27 [0.74] (0.22–0.34)	0.17 [0.47] (0.11–0.20)	0.12 [0.33] (0.10–0.13)	0.20 [0.55] (0.11–0.25)	0.32 [0.88] (0.21–0.37)	0.19 [0.52] (0.06–0.25)	0.25 [0.69] (0.18–0.30)	0.64 [1.76] (0.41–0.80)	0.27 [0.74] (0.19–0.31)	0.35 [0.96] (0.26–0.43)
33	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.73 [7.77] (2.22–3.16)	2.43 [6.92] (2.11–2.94)	2.50 [7.11] (1.89–2.75)	2.70 [7.68] (2.46–3.07)	1.14 [3.24] (0.91–1.25)	1.06 [2.31] (0.91–1.25)	1.17 [2.55] (0.75–1.17)
34	0.57 [1.51] (0.43–0.75)	nd	0.55 [1.45] (0.40–0.78)	0.57 [1.51] (0.45–0.71)	2.43 [6.42] (2.31–2.55)	3.21 [8.48] (2.34–4.64)	nd	nd	nd	nd	1.83 [4.84] (1.62–1.95)	1.75 [4.62] (1.59–1.82)	1.46 [3.86] (1.28–1.71)
35	3.16 [7.66] (2.87–3.41)	4.28 [10.38] (3.74–4.52)	3.96 [9.60] (3.70–4.16)	3.61 [8.76] (3.43–3.88)	>5 (1.2)	>5 (1.2)	4.07 [9.87] (3.51–4.92)	3.08 [8.76] (2.75–3.45)	2.50 [7.11] (1.89–2.75)	2.70 [7.68] (2.46–3.07)	1.56 [4.44] (1.37–1.73)	1.14 [3.24] (0.91–1.25)	0.94 [2.68] (0.75–1.17)
36	1.02 [2.91] (0.77–1.35)	>5 (1.4)	nd	>5 (1.4)	>5 (1.4)	>5 (1.4)	>5 (1.4)	4.66 [13.29] (4.27–4.92)	4.13 [11.78] (3.88–4.30)	4.61 [4.61] (4.27–4.93)	>5 (1.4)	>5 (1.4)	>5 (1.4)
39	0.16 [0.47] (0.11–0.25)	2.05 [6.09] (1.82–2.30)	nd	3.08 [9.15] (2.92–3.25)	0.76 [2.25] (0.59–0.87)	1.11 [3.29] (1.77–2.21)	2.05 [6.09] (1.77–2.21)	2.50 [7.43] (2.36–2.81)	2.17 [6.45] (1.91–2.25)	3.26 [3.26] (3.09–3.41)	>5 (1.48)	4.64 [13.79] (4.26–5.10)	>5 (1.48)
Doxorubicin	0.02 [0.03] (0.01–0.02)	0.19 [0.35] (0.14–0.25)	0.48 [0.83] (0.34–0.66)	0.23 [0.40] (0.19–0.25)	0.07 [0.13] (0.03–0.12)	0.01 [0.02] (0.01–0.02)	0.24 [0.44] (0.21–0.27)	0.29 [0.53] (0.23–0.35)	0.07 [0.13] (0.17–0.24)	0.20 [0.37] (0.15–0.26)	0.23 [0.42] (0.10–0.38)	0.09 [0.16] (0.05–0.12)	0.13 [0.24] (0.10–0.17)

(atoms C4–C13), and C6 is the most distant atom from the mean plane of the ring (d(C6-plane) = 0.524(13) Å). Notably, the oxygen atom O1 [d(O1-plane) = 0.0333(19) Å] lies in the plane as well. Atoms O2 [d(O2-plane) = 0.1932(19) Å] and O3 [d(O3-plane) = 0.1631(21) Å] are close to plane 1. Plane 2 is formed by the phenyl ring (C14–C19) and includes the sulfur atom, with d(S1-plane) equal to 0.0866(23) Å. Cremer and Pople ring puckering parameters³⁸ ($Q = 0.4531(19)$ Å, $\theta = 52.7(2)^\circ$, $\phi = 97.6(3)^\circ$) suggest that the pyran ring (C1, C2, C3, O1, C4 and C5) is in approximately a half-chair conformation.

2.4. Biological activity

All the substances described (Figs. 1 and 2 and Schemes 1–3), were evaluated *in vitro* using the MTT assay against eleven cancer cell lines: HL-60 (human promyelocytic leukemia), OVCA8-8 (ovarian adenocarcinoma), MDA-MB435 (human melanoma), SF295 (human glioblastoma), HCT-8 (Human colon carcinoma), HCT-116 (human colon carcinoma), PC3 (human prostate carcinoma), DU-145 (human prostate carcinoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma), MX1 (human breast adenocarcinoma) and HS578t (human breast adenocarcinoma). Doxorubicin was used as the positive control (Table 3).⁴⁹ The selectivity of the compounds toward a normal proliferating cell line was investigated using the MTT assay with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after 72 h of drug exposure. To test with normal cells, two murine fibroblasts cell lines, L929 and V79, were used. As previously described,³⁰ the compounds were classified according to their activity as highly active ($IC_{50} < 2 \mu\text{M}$), moderately active ($2 \mu\text{M} < IC_{50} < 10 \mu\text{M}$), or inactive ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$).

In previous studies, we demonstrated that appending a 1,2,3-triazole group to nor- β -lapachone can intensify its antitumor³¹ and trypanocidal³² activities. Molecular hybridization³³ was used as a strategy to obtain new molecules by connecting a quinoxaline moiety and a 1,2,3-triazole ring via click¹⁹ chemistry reactions.

Herein, the antitumor activities of 1,4-naphthoquinone-based 1,2,3-triazoles were evaluated and ten compounds were observed to possess moderate to high activity.

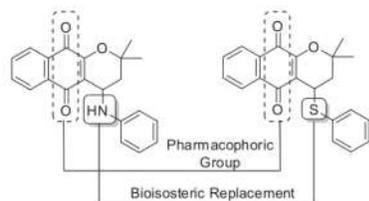
For compounds **7–19**, **21** and **24**, our approach was not successful and these compounds did not exhibit activity against any of the cancer cell lines evaluated.

For the quinone-based 1,2,3-triazoles, compounds **1–6** were considered moderately active with IC values in the range of 2.12–10.0 μM . However, high activity was observed against HL-60 with compounds **1** ($IC_{50} = 1.37 \mu\text{M}$) and **4** ($IC_{50} = 1.90 \mu\text{M}$).

For the 1,2,3-triazoles, the most significant activity was observed with compounds **1**, **4**, **21** and **22** against HL-60. They were highly active, with IC_{50} values of 1.37, 1.90, 1.19 and 0.80 μM , respectively.

Recently, our research group has described arylamino-substituted nor- β -lapachones with significant activity against cancer cell lines.³⁴ We observed that the presence of a methoxy group in the arylamino ring intensifies the antitumor activity. Herein, the evaluation of the arylamino substituted α -lapachones **28–35** was described. The compounds showed moderate to high activity against all cancer cell lines evaluated. Interestingly, compound **32**, with a methoxy group in the *para*-position, was found to be the most active, exhibiting IC_{50} values in the range of 0.19–1.76 μM . The cell line with the most sensitivity toward **32** was HL-60 ($IC_{50} = 0.19 \mu\text{M}$). Compound **31** has IC_{50} values < 2.00 μM and may also represent an important candidate for subsequent studies.

Compounds **36** and **39** were designed based on the bioisosteric replacement of the arylamino substituent in α -lapachone as shown in the Scheme 4. Our objective was to evaluate the influence of the sulfur atom (chalcogen) on activity. Compound **36** was highly



Scheme 4. Bioisosteric replacement strategy for **36** and **39**.

effective against the HL-60 cancer cell line (IC_{50} value = 2.91 μ M) with a high selective index compared with PBMC, L929 and V79. Compound **39** was highly active against HL-60 and HCT-8.

Despite the small number of compounds, there was a positive correlation between the electrochemical parameters and cytotoxicity, allowing the discrimination of compounds **20** (active and more electrophilic) and **21** and the less cytotoxic compound **10** from the more selective compound **39**.

3. Conclusion

In this paper, we synthesized and evaluated the cytotoxicity of several 1,2,3-triazole-, arylamino- and thio-substituted naphthoquinones against cancer and normal cell lines. Of the described substances, compounds **31** and **32** were considered highly active ($IC_{50} < 2 \mu$ M). Considering the selectivity index, compounds **36** and **39** have been identified as lead compounds for further investigation. As previously shown by Claus Jacob's group, employing chalcogens is a productive approach. Our strategy to append arylamino groups to the 1,4-naphthoquinone structure was also successful, and several compounds with potent antitumor activity were presented in this manuscript that will be further investigated.

4. Experimental section

4.1. Chemistry

Melting points were obtained on Thomas Hoover and are uncorrected. Analytical grade solvents were used. Column chromatography was performed on silica gel (SiliaFlash G60 UltraPure–60–200 μ m, 60 Å). Infrared spectra were recorded on an FTIR Spectrometer IR Prestige-21–Shimadzu. 1H and ^{13}C NMR were recorded at room temperature using a Bruker AVANCE DRX200, Varian Mercury 300 and Varian Mercury 400 MHz, in the solvents indicated, with TMS as internal reference. Chemical shifts (δ) are given in ppm and coupling constants (J) in Hertz. Mass spectra (electrospray ionization) were obtained using a MicroTOF–BrukerDaltonics. Elemental analysis was performed using a CE Instruments (Thermo-Fisher) EA 1110 CHNS-O elemental analyzer. All the compounds were nominated using the program CS ChemDraw Ultra version 10.0.

4.2. General procedures to prepare 1,4-naphthoquinone-based 1,2,3-triazoles

Method A: In a flask containing 3 mL acetonitrile, it was added 0.5 mmol of the appropriate azides, followed by 0.6 mmol of the appropriate alkynes and finally 11 mg (0.06 mmol) of copper(I) iodide. The reaction was left under magnetic stirring at 28 °C under argon atmosphere, for a reaction time ranging from 19 to 24 h. The end of the reaction was monitored by TLC with dichloromethane as eluent. The solvent was then removed under reduced pres-

sure and the reaction mixture was purified on a silica gel column as a gradient mixture of hexane/ethyl acetate or dichloromethane/ethyl acetate with increasing polarity. **Method B:** The same procedures described in Method A, but 2 mL DMF, one drop Et_3N were added and the reaction was left under magnetic stirring for 60 min as monitored by TLC.

4.2.1. 2-(4-(4-(((3-Chloro-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)isoindoline-1,3-dione

Using method B, compound **14** was obtained as an orange solid (100 mg, 0.20 mmol, 78%); mp 230–232 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3312 (N–H). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.99–7.74 (m, 9H), 7.55 (br s, 1H, NH), 5.02 (d, 2H $J = 6.6$ Hz), 4.35 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.58 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.83 (qt, 2H, $J = 7.0$ Hz), 1.57 (qt, 2H, $J = 6.6$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 179.8, 167.5, 144.6, 134.5, 134.0, 132.4, 131.4, 129.8, 126.2, 122.6, 122.3, 109.2, 48.6, 36.5, 26.8, 24.7. Anal. Calcd for $C_{25}H_{20}ClN_3O_4 \cdot 0.65 \times H_2O$, C, 59.86, H, 4.28, N, 13.96. Found: C, 60.24, H, 4.22, N, 13.59.

4.2.2. (2R,3R,4S,5R)-2-(Acetoxymethyl)-6-(4-(((3-bromo-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate

Using method B, compound **20** was obtained as an orange solid (150 mg, 0.23 mmol, 87% yield); mp 152–153 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3339 (NH). 1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 8.23 (s, 1H), 8.07–8.02 (m, 2H), 7.83–7.74 (m, 2H), 7.19 (br s, 1H, NH), 6.22 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 5.60 (dd, 1H, $J = 9.4$ and 9.4 Hz), 5.51 (dd, 1H, $J = 9.0$ and 9.0 Hz), 5.25–5.15 (m, 3H), 4.34–4.14 (m, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.93 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 180.8, 180.2, 170.6, 170.1, 170.0, 169.1, 146.7, 135.4, 133.4, 132.9, 127.5, 127.1, 122.1, 85.8, 75.2, 73.3, 71.2, 68.7, 62.0, 20.5, 20.4, 20.0. Anal. Calcd for $C_{27}H_{27}BrN_4O_{11} \cdot 0.45 \times H_2O$, C, 48.29, H, 4.19, N, 8.34. Found: C, 48.65, H, 4.59, N, 8.01.

4.2.3. (2S,3S,4R,5S)-2-(Acetoxymethyl)-6-(4-(((1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate

Using method A, compound **21** was obtained as an orange solid (150 mg, 0.26 mmol, 62% yield); mp 209–210 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3351 (NH). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.08 (dd, 1H, $J = 7.8$ and 0.9 Hz), 8.05 (dd, 1H, $J = 7.8$ and 0.9 Hz), 7.80 (s, 1H), 7.73 (td, 1H, $J = 7.6$ and 1.5 Hz), 7.62 (td, 1H, $J = 7.6$ and 1.5 Hz), 6.35 (br s, 1H, NH), 5.88 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 5.79 (s, 1H), 5.41 (t, 1H, $J = 4.5$ Hz), 5.24 (t, 1H, $J = 5.1$ Hz), 5.21 (t, 1H, $J = 5.1$ Hz), 4.52 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz), 4.30 (dd, 1H, $J = 12.6$ and 4.8 Hz), 4.14 (dd, 1H, $J = 12.6$ and 4.8 Hz), 4.00 (dd, 1H, $J = 9.9$ and 3.3 Hz), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.86 (s, 3H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.0, 181.5, 170.5, 169.8, 169.3, 168.9, 151.4, 134.8, 132.2, 130.4, 126.4, 126.2, 107.6, 85.8, 75.2, 72.4, 70.2, 67.6, 61.4, 38.2, 20.7, 20.5, 20.4, 20.1. Anal. Calcd for $C_{27}H_{28}N_4O_{11}$, C, 55.48, H, 4.83, N, 9.58. Found: C, 55.46, 4.52, N, 9.25.

4.2.4. 2-(((1-(1,4-Dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)naphthalene-1,4-dione

Using method A, compound **22** was obtained as an orange solid (100 mg, 0.24 mmol, 78% yield); mp 228–229 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3344 (NH). 1605, 1572 (C=C). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.65 (s, 1H), 8.13 (dd, 1H, $J = 6.0$ and 3.2 Hz), 8.06 (dd, 1H, $J = 6.0$ and 3.2 Hz), 8.00 (dd, 1H, $J = 7.6$ and 1.2 Hz), 7.96–7.93 (m, 4H), 7.82 (td, 1H, $J = 7.6$ and 1.6 Hz), 7.73 (td, 1H, $J = 7.6$ and 1.6 Hz), 7.48 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 4.64 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 183.8, 181.4, 181.3, 178.5, 148.0, 144.0, 140.0, 134.6, 134.5, 134.3, 132.8, 132.1, 131.2, 131.1, 130.1,

126.5, 126.1, 125.7, 125.6, 125.2, 125.1, 100.6, 36.9. Anal. Calcd for $C_{23}H_{14}N_4O_4$, $0.6 \times H_2O$, C, 65.98; H, 3.64; N, 13.3 Found: C, 65.98; H, 3.48; N, 12.90.

4.2.5. 2-Chloro-3-((1-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)naphthalene-1,4-dione

Using method A, compound **23** was obtained as an orange solid (100 mg, 0.23 mmol, 68% yield); mp 219–221 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3325 (NH), 1606, 1574 (C=C). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.59 (s, 1H), 8.11–7.94 (m, 7H), 7.83 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.76 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.47 (br s, 1H, NH), 5.14 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 184.0, 180.1, 178.7, 175.6, 146.4, 140.2, 134.9, 134.5, 132.9, 131.8, 131.2, 130.1, 129.0, 126.6, 125.8. Anal. Calcd for $C_{23}H_{13}ClN_4O_4$, $1.0 \times H_2O$, C, 58.87, H, 2.92, N, 12.48 Found: C, 58.52, H, 2.93, N, 12.19.

4.2.6. 2-Bromo-3-((1-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)naphthalene-1,4-dione

Using method A, compound **24** was obtained as an orange solid (100 mg, 0.20 mmol, 99% yield); mp 168–170 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3301 (NH). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.59 (s, 1H), 8.12 (dd, 1H, $J = 5.6$ and 3.2 Hz), 8.06 (dd, 1H, $J = 6.0$ and 3.2 Hz), 8.00–7.93 (m, 4H), 7.82 (td, 1H, $J = 7.6$ and 1.2 Hz), 7.75 (td, 1H, $J = 7.6$ and 1.2 Hz), 7.47 (s, 1H), 5.18 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 183.8, 179.6, 178.5, 175.2, 147.5, 146.0, 140.0, 134.6, 134.3, 132.6, 131.3, 131.1, 130.0, 126.5, 126.4, 126.1, 125.9, 125.6, 124.8. Anal. Calcd for $C_{23}H_{13}BrN_4O_4$, $1.1 \times H_2O$, C, 56.46; H, 2.68; N, 11.45 Found: C, 54.58; H, 2.69, N, 10.62.

4.2.7. General procedures to synthesis of α -lapachone arylamino derivatives

Compound **27** (321 mg, 1 mmol) was dissolved in 5 mL of CH_2Cl_2 , the respective anilines were added (1.3 mmol) and the mixture was left under stirring overnight, followed by the addition of 50 mL of water. The organic phase was extracted with dichloromethane, washed with HCl 10% (3×50 mL), dried over sodium sulfate, and filtered. The solvent from the crude product was evaporated under reduced pressure and it was purified by column chromatography in silica-gel, using eluents with an increasing polarity gradient mixture of hexane and ethyl acetate (9/1 to 7/3).

4.2.8. 2,2-Dimethyl-4-((3-nitrophenyl)amino)-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **28** was obtained as a red solid (227 mg, 0.6 mmol, 60% yield); mp 223–225 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3387 (NH), 1337 (N=O). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.13–7.92 (m, 2H), 7.78–7.59 (m, 2H), 7.23–7.02 (m, 1H), 6.60–6.32 (m, 3H), 4.64 (dd, 1H, $J = 5.3$ and 3.2 Hz), 2.28 (dd, 1H, $J = 14.4$ and 3.3 Hz), 1.99 (dd, 1H, $J = 14.3$ and 5.2 Hz), 1.55 (s, 3H), 1.53 (s, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.7, 180.0, 155.6, 148.9, 134.5, 133.4, 132.2, 131.0, 130.7, 130.5; 126.6, 126.3, 118.7, 109.7, 109.6, 100.7, 79.3, 43.4, 37.6, 29.0, 26.3. EI/MS (m/z) [$M+Na$] $^+$: 401.1. Calcd for $[C_{21}H_{18}N_2O_5Na]^+$: 401.1.

4.2.9. 4-((4-Bromophenyl)amino)-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **29** was obtained as a red solid (247 mg, 0.6 mmol, 60% yield); mp 174–176 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3386 (NH). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.22–7.99 (m, 2H), 7.82–7.65 (m, 2H), 7.29 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.60 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 4.64 (dd, 1H, $J = 4.9$ and 3.4 Hz), 2.25 (dd, 1H, $J = 14.4$ and 3.6 Hz), 2.00 (dd, 1H, $J = 14.7$ and 5.5 Hz), 1.54 (s, 3H), 1.53 (s, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.8, 183.0, 155.5, 146.1, 134.6, 133.4, 132.2, 131.0, 126.6, 126.4, 118.8, 115.5, 110.2, 96.6, 79.3, 43.4, 37.6,

29.0, 26.4. EI/MS (m/z) [$M+H$] $^+$: 413.0. Calcd. for $[C_{21}H_{18}BrNO_3H]^+$: 413.0.

4.2.10. 4-((4-Iodophenyl)amino)-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **30** was obtained as a red solid (229 mg, 0.5 mmol, 50% yield); mp 154–156 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3376 (NH). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.14–7.99 (m, 2H), 7.77–7.65 (m, 2H), 7.46 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 6.50 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 4.64 (dd, 1H, $J = 5.3$ and 3.5 Hz), 2.24 (dd, 1H, $J = 14.3$ and 3.2 Hz), 1.99 (dd, 1H, $J = 14.5$ and 5.4 Hz), 1.53 (s, 3H), 1.52 (s, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.8, 180.0, 155.6, 146.5, 138.1, 134.6, 133.4, 132.1, 131.0, 126.6, 126.4, 123.3, 118.6, 116.1, 79.5, 79.3, 43.5, 37.5, 28.8, 24.4. EI/MS (m/z) [$M+H$] $^+$: 460.0. Calcd for $[C_{21}H_{18}INO_3H]^+$: 460.0.

4.2.11. 4-((4-Chlorophenyl)amino)-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **31** was obtained as a red solid (184 mg, 0.5 mmol, 50% yield); mp 159–161 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3384 (NH). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.11–7.98 (m, 2H), 7.76–7.64 (m, 2H), 7.15 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 6.64 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 4.63 (dd, 1H, $J = 5.1$ and 2.7 Hz), 2.25 (dd, 1H, $J = 14.4$ and 3.5 Hz), 1.99 (dd, 1H, $J = 14.4$ and 5.1 Hz), 1.53 (s, 3H), 1.52 (s, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.8, 180.0, 155.6, 145.6, 134.5, 133.4, 132.2, 131.1, 129.3, 126.6, 126.4, 123.3, 118.8, 115.2, 79.3, 43.8, 28.9, 26.4. EI/MS (m/z) [$M+H$] $^+$: 368.0. Calcd for $[C_{21}H_{18}ClNO_3H]^+$: 368.0.

4.2.12. 4-((4-Methoxyphenyl)amino)-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **32** was obtained as a brown solid (137 mg, 0.37 mmol, 37% yield); mp 149–150 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3372 (NH). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.13–8.04 (m, 2H), 7.77–7.67 (m, 2H), 6.87–6.74 (m, 4H), 4.62–4.55 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.24 (dd, 1H, $J = 14.2$ and 4.0 Hz), 2.00 (dd, 1H, $J = 14.1$ and 5.6 Hz), 1.56 (s, 3H), 1.49 (s, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.8, 179.9, 155.1, 153.1, 141.0, 134.2, 133.1, 132.0, 130.8, 126.3, 119.4, 116.6, 114.8, 79.2, 55.7, 44.7, 37.5, 28.6, 26.4. EI/MS (m/z) [$M+H$] $^+$: 364.0. Calcd for $[C_{22}H_{21}NO_4H]^+$: 364.0.

4.2.13. 4-((3-Fluorophenyl)amino)-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **33** was obtained as a red solid (176 mg, 0.5 mmol, 50% yield); mp 152–154 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3382 (NH). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.15–7.99 (m, 2H), 7.77–7.64 (m, 2H), 7.19–7.06 (m, 2H), 6.55–6.40 (m, 2H), 4.67 (dd, 1H, $J = 5.5$ and 3.5 Hz), 2.27 (dd, 1H, $J = 13.8$ and 2.2 Hz), 2.02 (dd, 1H, $J = 13.8$ and 5.0 Hz), 1.54 (s, 3H), 1.53 (s, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.8, 180.0, 172.7, 155.6, 148.5 (d, $J = 10.7$ Hz), 134.6, 133.4, 132.2, 131.1, 126.5 (d, $J = 10$ Hz), 118.6, 109.8 (d, $J = 2.3$ Hz), 104.5 (d, $J = 21.8$ Hz), 100.5 (d, $J = 24.9$ Hz), 79.3, 43.6, 37.6, 28.9, 26.4. EI/MS (m/z) [$M+H$] $^+$: 352.0. Calcd for $[C_{21}H_{18}FNO_3H]^+$: 352.0.

4.2.14. 2,2-Dimethyl-4-((3-nitrophenyl)amino)-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **34** was obtained as a orange solid (189 mg, 0.5 mmol, 50% yield); mp 152–154 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3386 (NH). 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.10–7.95 (m, 2H), 7.75–7.58 (m, 2H), 7.09–6.55 (m, 4H), 4.87–4.61 (m, 1H), 2.35–2.17 (m, 1H), 2.14–1.98 (m, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.56 (s, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 183.6, 179.4, 155.5, 149.2, 134.3, 133.3, 131.8, 130.6, 130.5, 129.7, 126.5, 125.9, 125.8, 119.0, 117.8, 112.5, 79.1, 43.0, 37.1, 28.8, 26.0. EI/MS (m/z) [$M+H$] $^+$: 401.0. Calcd for $[C_{21}H_{18}N_2O_5Na]^+$: 401.0.

4.2.15. 4-((3-Bromophenyl)amino)-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **35** was obtained as a red solid (247 mg, 0.6 mmol, 60% yield); mp 182–185 °C. IR ν_{\max} (cm⁻¹, KBr): 3410 (NH). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8.10–7.95 (m, 2H); 7.75–7.58 (m, 2H), 7.09–6.55 (m, 4H), 4.17–4.59 (m, 1H), 2.26 (dd, 1H, $J = 14.4$ and 2.2 Hz), 1.99 (dd, 1H, $J = 14.1$ and 5.3 Hz), 1.54 (s, 3H), 1.52 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 183.4, 179.7, 155.3, 148.1, 134.3, 133.2, 131.9, 130.8, 130.5, 126.4, 126.1, 123.2, 121.0, 118.4, 116.0, 112.3, 79.0, 43.1, 37.3, 28.8, 26.1. EI/MS (m/z) [M+H]⁺: 413.0. Calcd for [C₂₁H₁₈BrNO₃H]⁺: 413.0.

4.2.16. General procedures to the synthesis of α -lapachone arylamino derivatives

The respective bromo derivatives (1 mmol) were dissolved in 5 mL of CH₂Cl₂ and thiophenol was added (1.3 mmol) and the mixture was left under stirring overnight, followed by the addition of 50 mL of water. The organic phase was extracted with dichloromethane, dried over sodium sulfate, and filtered. The solvent from the crude mixture was evaporated under reduced pressure and it was purified by column chromatography in silica-gel, using eluents with an increasing polarity gradient mixture of hexane and ethyl acetate (9/1 to 7/3).

4.2.17. 2,2-Dimethyl-4-(phenylthio)-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione

The compound **36** was obtained as a yellow solid (125 mg, 0.5 mmol, 50% yield); mp 182–185 °C. IR ν_{\max} (cm⁻¹, KBr): 718 (C–S) cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8.12–8.00 (m, 2H), 7.90–7.75 (m, 2H), 7.70–7.62 (m, 2H), 7.46–7.31 (m, 3H), 4.58–4.50 (m, 1H), 2.10–2.00 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.48 (s, 3H). EI/HRMS (m/z) [M+Na]⁺: 373.0905. Calcd for [C₂₁H₁₈O₃SNa]⁺: 373.0874.

4.2.18. 2,2-Dimethyl-3-(phenylthio)-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione

The compound **39** was obtained as a yellow solid (150 mg, 0.45 mmol, 45% yield); mp 148–151 °C. IR (KBr): 718 (C–S) cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8.15–8.02 (m, 2H), 7.80–7.61 (m, 2H), 7.59–6.51 (m, 2H), 7.35–7.19 (m, 3H), 4.58 (s, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.58 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 181.3, 178.2, 158.7, 135.0, 134.5, 133.4, 133.1, 132.7, 131.7, 129.3, 128.0, 126.5, 126.4, 123.6, 94.4, 59.2, 28.5, 24.3. EI/MS (m/z) [M+Na]⁺: 359.0. Calcd for [C₂₀H₁₆O₃SNa]⁺: 359.0.

4.3. Cytotoxicity against cancer and normal cell lines

Compounds (0.001–30 μ M) were tested for cytotoxic activity against several human cancer cell lines obtained from National Cancer Institute, NCI (Bethesda, MD). The L929 cells (mouse fibroblast L cells NCTC clone 929) were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA), and the Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells) were kindly provided by Dr. JAP Henriques (UFRGS). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood from healthy, non-smoker donors who had not taken any medication at least 15 days prior to sampling by a standard method of density-gradient centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). All cancer cell lines and PBMC were maintained in RPMI 1640 medium. L929 and V79 cells were cultivated under standard conditions in MEM with Earle's salts. All culture media were supplemented 20% (PBMC) or 10% (cancer, L929 and V79 cells) fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin at 37 °C with 5% CO₂. All tested compounds were dissolved with DMSO. The final concentration of DMSO in the culture medium was kept constant (0.1%, v/v). Doxorubicin (0.001–1.10 μ M) was used as the positive control. The cell viability was determined by reduction of the

yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a blue formazan product as described by Mosmann.²⁹

4.4. Electrochemical studies

Cyclic voltammetry (CV) experiments were performed with a conventional undivided three electrode cell using an Autolab PGSTAT-30 potentiostat (Echo Chemie, Utrecht, The Netherlands) coupled to a microcomputer, interfaced by GPES 4.9 software. Glassy carbon (GC) (diameter = 3 mm) as the working electrode, a Pt wire as the counter electrode and the reference electrode an Ag/AgCl, Cl⁻ (saturated) were used. The GC electrode was cleaned up by polishing with alumina on a polishing felt (BAS polishing kit). The solvent used in aprotic media studies, DMF from Acros, was used as received. In CV experiments, the scan rate varied from 10 to 500 mV s⁻¹. All experiments were conducted at room temperature (25 \pm 2 °C) and purging an inert gas (Argon). Electrochemical reduction in aprotic media (DMF + TBAP 0.1 mol L⁻¹) was performed in the absence of oxygen. Each compound (1 \times 10⁻³ mol L⁻¹) was added to the supporting electrolyte and the solution was deoxygenated with argon before the measurements by cyclic voltammetry.

4.5. X-ray analysis

X-ray data were collected at 150 K using MoK α (0.71073 Å) on an Agilent–Gemini diffractometer equipped with a CCD area detector. The CrysAlisPro software package³⁵ was used for data collection and data reduction. The data were corrected empirically for absorption using spherical harmonics using the SCALE3 ABSPACK³⁶ scaling algorithm. The structure was solved by direct methods using SHELXS-97³⁷ and refined by full-matrix least squares on F^2 using SHELXL-97.³⁸ All non-hydrogen atoms were successfully refined using anisotropic displacement parameters. Hydrogen atoms were found in the Fourier difference synthesis and fixed. Crystallographic data for the structure were deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre, with number CCDC 964308.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Project Universal–MCTI/CNPq n° 14/2012 (480719/2012-8) and Chamada MCTI/CNPq n° 16/2012, CAPES, Fundação Cearense de Pesquisa e Cultura (FUNCAP–Edital Pronex), Fundação de Apoio à pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL, PRONEX) Fundação de Apoio à pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE, PRONEX). Dr. E.N. da Silva Júnior thanks the Programa Institucional de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-Contratados (Edital PRPq–01/2013) and Universidade Federal de Minas Gerais. The authors would like to thank Dr. Janaína Versiani by the collaboration in several aspects.

References and notes

- Nogueira, V.; Hay, N. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4309.
- Shaaban, S.; Diestel, R.; Hinkelmann, B.; Muthukumar, Y.; Verma, R. P.; Sasse, F.; Jacob, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 192.
- (a) Brunmark, A.; Cadenas, E. *Free Radical Biol. Med.* **1989**, *7*, 435; (b) Monks, T. J.; Hanslik, R. P.; Cohen, G. M.; Ross, D.; Graham, D. G. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**, *112*, 2; (c) Goulart, M. O. F.; Falkowski, P.; Ossowski, T.; Liwo, A. *Bioelectrochemistry* **2003**, *59*, 85; (d) da Silva Júnior, E. N.; Cavalcanti, B. C.; Guimarães, T. T.; Pinto, M. C. F. R.; Cabral, I. O.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; de

- Moraes, M. O.; de Andrade, C. K. Z.; dos Santos, M. R.; de Simone, C. A.; Goulart, M. O. F.; Pinto, A. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 399.
4. Bolton, J. L.; Trush, M. A.; Penning, T. M.; Dryhurst, G.; Monks, T. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 135.
 5. Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2009**, *8*, 79.
 6. Shaaban, S.; Ba, L.; Abbas, M.; Burkholz, T.; Denkert, A.; Gohr, A.; Wessjohann, L.; Sasse, F.; Weber, W.; Jacob, C. *Chem. Commun.* **2009**, 4702.
 7. Schneider, T.; Muthukumar, Y.; Hinkelmann, B.; Franke, R.; Döring, M.; Jacob, C.; Sasse, F. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 784.
 8. (a) Hillard, E. A.; de Abreu, F. C.; Ferreira, D. C. M.; Jaouen, G.; Goulart, M. O. F.; Anatore, C. *Chem. Commun.* **2008**, 2612; (b) Viswanathan, U. M.; Burkholz, T.; Jacob, C. *Z. Phys. Chem.* **2013**, *227*, 691.
 9. Araújo, A. J.; de Souza, A. A.; da Silva Júnior, E. N.; Marinho-Filho, J. D. B.; de Moura, M. A. B. F.; Rocha, D. D.; Vasconcelos, M. C.; Costa, C. O.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O.; Ferreira, V. F.; de Abreu, F. C.; Pinto, A. V.; Montenegro, R. C.; Costa-Lotufo, L. V.; Goulart, M. O. F. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 585.
 10. de Abreu, F. C.; Ferraz, P. A. M.; Goulart, M. O. F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 19.
 11. Fitzpatrick, F. A. *Int. Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 1651.
 12. Fry, F. H.; Jacob, C. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4479.
 13. da Silva Júnior, E. N.; de Souza, M. C. B. V.; Pinto, M. C. F. R.; Goulart, M. O. F.; Barros, F. W. A.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; de Moraes, M. O.; Ferreira, V. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7035.
 14. da Silva Júnior, E. N.; Cavalcanti, B. C.; Guimarães, T. T.; Pinto, M. C. F. R.; Cabral, I. O.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; de Moraes, M. O.; de Andrade, C. K. Z.; dos Santos, M. R.; de Simone, C. A.; Goulart, M. O. F.; Pinto, A. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 399.
 15. Sunassee, S. N.; Veale, C. G. L.; Shunmoogam-Gounden, N.; Osoniyi, O.; Hendricks, D. T.; Cairn, M. R.; de la Mare, J. A.; Edkins, A. L.; Pinto, A. V.; da Silva Júnior, E. N.; Davies-Coleman, M. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 98.
 16. (a) Jamier, V.; Ba, L. A.; Jacob, C. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10920; (b) Fry, F. H.; Holme, A. L.; Giles, N. M.; Giles, C. I.; Collins, C.; Holt, K.; Paragh, S.; Gelbrich, T.; Hursthouse, M. B.; Gutowski, N. J.; Jacob, C. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2579.
 17. Pinto, M. C. F. R.; Pinto, A. V.; Oliveira, C. G. T. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1980**, *52*, 481.
 18. Fieser, L. F.; Fieser, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3215.
 19. Kolb, C. H.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
 20. Guimarães, T. T.; Pinto, M. C. F. R.; Lanza, J. S.; Melo, M. N.; do Monte-Neto, R. L.; de Melo, I. M. M.; Diogo, E. B. T.; Ferreira, V. F.; Camara, C. A.; Valença, W. O.; de Oliveira, R. N.; Fréard, F.; da Silva Júnior, E. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 523.
 21. Diogo, E. B. T.; Dias, G. G.; Rodrigues, B. L.; Guimarães, T. T.; Valença, W. O.; Camara, C. A.; de Oliveira, R. N.; da Silva, M. G.; Ferreira, V. F.; de Paiva, Y. G.; Goulart, M. O. F.; Menna-Barreto, R. F. S.; de Castro, S. L.; da Silva Júnior, E. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6337.
 22. da Silva Júnior, E. N.; de Souza, M. C. B. V.; Fernandes, M. C.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Lopes, F. A.; de Simone, C. A.; Andrade, C. K. Z.; Pinto, A. V.; Ferreira, V. F.; de Castro, S. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5030.
 23. (a) Goulart, M. O. F.; Freitas, L. R.; Tonholo, J.; de Abreu, F. C.; Raslan, D. S.; Starling, S.; Zani, C. L.; Oliveira, A. B.; Chiari, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2043; (b) Aguilár-Martínez, M.; Bautista-Martínez, J. A.; Macías-Ruvalcaba, N.; González, I.; Tovar, E.; Marin del Alizal, T.; Collera, O.; Cuevas, G. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8349.
 24. (a) Gutierrez, P. L.; Nguyen, B. *Electrochemistry in Cancer: Applications to Pharmacological Studies of Quinone Containing Antitumour Agents. In Redox Chemistry and Interfacial Behavior of Biological Molecules*; Dryhurst, G.; Niki, K., Eds.; Plenum Press: New York, 1988; p 369; (b) Kovacic, P.; Somarathnan, R. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 658; (c) Bouffier, L.; Gosse, L.; Demeunynck, M.; Mailley, M. *Bioelectrochemistry* **2012**, *88*, 103; (d) Moreno, E.; Pérez-Silanes, S.; Gouravaram, S.; Macharam, A.; Ancizu, S.; Torres, E.; Aldana, I.; Monge, A.; Crawford, P. W. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 3270.
 25. Song, Y.; Buettner, G. R. *Free Radical Biol. Med.* **2010**, *49*, 919.
 26. Hernández, D. M.; de Moura, M. A. B. F.; Valencia, D. P.; González, F. J.; González, I.; de Abreu, F. C.; da Silva Júnior, E. N.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. V.; Goulart, M. O. F.; Frontana, C. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3414.
 27. de Souza, A. A.; de Moura, M. A. B. F.; de Abreu, F. C.; Goulart, M. O. F.; da Silva Júnior, E. N.; Pinto, A. V.; Ferreira, V. F.; Moscoso, R.; Núñez-Vergara, L. J.; Squella, J. A. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2075.
 28. Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354.
 29. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
 30. Pérez-Sacau, E.; Díaz-Peñate, R. G.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; García-Castellano, J. M.; Pardo, L.; Campillo, M. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 696.
 31. da Silva Júnior, E. N.; de Moura, M. A. B. F.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; de Souza, M. C. B. V.; Araújo, A. J.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; de Moraes, M. O.; Ferreira, V. F.; Goulart, M. O. F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 635.
 32. da Silva Júnior, E. N.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Silva, R. S. F.; Teixeira, D. V.; de Souza, M. C. B. V.; de Simone, C. A.; de Castro, S. L.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1774.
 33. Viegas Júnior, C.; Danuello, A. C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829.
 34. da Silva Júnior, E. N.; de Deus, C. F.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; de Moraes, M. O.; Pinto, M. C. F. R.; de Simone, C. A.; Ferreira, V. F.; Goulart, M. O. F.; Andrade, C. K. Z.; Pinto, A. V. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 504.
 35. CRYSAISPRO, Agilent Technologies, Version 1.171.35.21 (release 20-01-2012 CrysAlis171.NET).
 36. SCALE3 ABSPACK scaling algorithm. CrysAlis, Agilent Technologies, Version 1.171.35.21 (release 20-01-2012 CrysAlis171.NET).
 37. Sheldrick, G. M. *SHELXS-97, Program for the Solution of Crystal Structures*; University of Göttingen: Germany, 1997.
 38. Sheldrick, G. M. *SHELXL-97, Program for the Refinement of Crystal Structures*; University of Göttingen: Germany, 1997.



Electrochemically Driven Supramolecular Interaction of Quinones and Ferrocifens: An Example of Redox Activation of Bioactive Compounds

Yen G. de Paiva¹, Fabricia da Rocha Ferreira¹, Thaissa Lucio Silva¹, Eric Labbé², Olivier Buriez², Christian Amatore^{2,*} and Marília Oliveira Fonseca Goulart^{1,*}

¹Instituto de Química e Biotecnologia, UFAL, Maceió, Al, 57072-970, Brazil; ²Ecole Normale Supérieure - PSL Research University, Département de Chimie, Sorbonne Universités - UPMC Univ. Paris 06, CNRS UMR 8640 PASTEUR, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France



Abstract: This review discusses the state of the art, challenges and perspectives in recent applications of electrochemistry in the life sciences. It deals mainly with the elucidation of molecular mechanisms of drug action, drug design and development, involving electron transfer, pharmaco-electrochemistry (the combination of electrochemical and pharmacological assays), and electrochemical studies of membrane models and drug delivery. It aims to shed light on the question: does electrochemistry really contribute to this area? It includes a general introduction for the use of electrochemistry in the life sciences, with a focus on how electrochemistry can uniquely provide both kinetic and thermodynamic information. A number of studies are reported in the literature and from the authors' laboratories, including the investigation of biooxidative/bioreductive activation of pro-drugs, DNA alkylation, electrochemically-based release of reactive oxygen and nitrogen species, with a particular emphasis on quinones, ferrocifens and compounds with mixed-functionality. Within the context of drug delivery and bioavailability, the electrochemical investigation of supramolecular interactions of the chosen classes of compounds with cyclodextrins and lipid bilayers, in relation to their solubilization and vectorization was also carried out. The updated examples herein illustrate how relevant and challenging the integration of electrochemistry, supramolecular and materials chemistry, biochemistry and medical knowledge for the design and development of redox-selective molecular approaches is. Many questions related to these fields are still unclear and the search for selectivity toward redox therapeutic agents remains of expanding interest. This review hopes to stimulate researchers to become more involved in this fruitful interface between electrochemistry and the life sciences.

Keywords: Electrochemistry, quinones, ferrocifens, oxidative stress, biooxidative/bioreductive activation, DNA, cyclodextrin, lipid bi-layers.

1. INTRODUCTION

Life on earth depends almost exclusively on the occurrence of redox reactions, which are reactions involving the exchange of electrons between two or more neighboring biochemical systems. Cells and tissues must maintain a reducing environment to survive and carry out their important physiological processes. This reducing environment provides the electrochemical gradient required for electron flow which provides the energy needed to build and maintain cellular structures and associated functions. An array of redox couples is responsible for electron transfer. Some of them are linked to each other to form sets of related couples, based largely on redox active sulfur [1, 2]. Some sets of couples can be independent from others if activation energies for reactions are high and there are no enzymatic systems to link them, kinetically. The redox environment of a cell is a reflection of the state of these couples [1-4].

Electrochemistry is the standard method for studying redox reactions, and the literature is replete with electrochemical techniques applied to biology, since it can uniquely provide both kinetic and thermodynamic information [3-5]. Electrochemical methods are extraordinarily powerful and useful in the characterization and design of redox-modulating agents [2-6].

The electrochemical literature directed to the life sciences has a long tradition and can be generally divided into the following topics:

- Advanced instrumentation such as scanning electrochemical microscopy [7-10], electrochemical luminescence [11, 12], electrochemical impedance spectroscopy [13-15], which enable, among other important contributions to the life sciences, cell biologists to watch cells grow, in real time and in a continuous manner [14] and Electron Spin Resonance (ESR)-electrochemistry [16-18];
- The study of redox enzymes, often as thin films on electrodes [19, 20];
- The investigation of molecular electronics, for understanding charge transport in synthetic as well as in biological molecular architectures at the nanoscale and disen-

*Address correspondence to these authors at the Instituto de Química e Biotecnologia, UFAL, Maceió, Al, 57072-970, Brazil; Tel: +55-82-32141393; E-mail: mariliaofg@gmail.com; mofg@qui.ufal.br and Ecole Normale Supérieure - PSL Research University, Département de Chimie, Sorbonne Universités - UPMC Univ. Paris 06, CNRS UMR 8640 PASTEUR, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France; Tel: +33 144323388; E-mail: Christian.amatore@ens.fr

- tangling the most important mechanisms of electron/energy transfer that regulate important functions in life (e.g. the respiratory chain and/or photosynthesis) [21, 22];
- d. The use of electrochemistry as an analytical tool for the quantification of biologically active molecules in samples [23-25];
 - e. Electrochemical biosensors, immunosensors, chemically and biologically modified surfaces, with the use of organelles and cells, among others, which try to mimic biological environments [26-32];
 - f. Production of bioconjugates for *in vitro* and intracellular sensing [33-35];
 - g. The study of drug reaction mechanisms and their correlation with biological activity, including computational electrochemistry [3, 4, 36-38];
 - h. Redox active drug development [5];
 - i. Electrochemically-based drug delivery [39, 40];
 - j. *In vitro* electrochemistry [41-44] and, at last but not least,
 - k. *In vivo* electrochemistry [45].

Topics g-j are the main focus of this review, which have received, over the years, increased attention, addressing the very important but difficult aspects of the energetics and kinetics of electron transfer, related to two classes of compounds: quinones and ferrocifens.

Since our last reviews [3, 4], researchers studying drug mechanisms have been attempting to model cellular conditions as closely as possible, even to the extent of using *in vitro* cell cultures for which specialized electrochemical experiments in the presence of chosen molecules have been

developed [42-44]. The importance of mimicking biological conditions in non-cellular media is a non-trivial problem due to the great diversity found in cellular and extracellular environments.

2. BIOOXIDATIVE/BIOREDUCTIVE ACTIVATION

Pro-drugs are derivatives with little or no pharmacological activity, which undergo biotransformation to a therapeutically active metabolite [46].

A successful bioreductive/biooxidative prodrug possesses the following properties: minimum toxicity to healthy cells; stability toward metabolism in aerobic cells, and suitable pharmacological and solubility properties.

From a toxicological and (bio)analytical point of view, the knowledge of metabolic pathways of a drug in the human body or animal model is found to be of utmost relevance in fields such as drug discovery and development, clinical pharmacology, toxicology, and therapeutics [46, 47].

This same relevance is now recognized for xenobiotic metabolism in, e.g., agrochemistry and food chemistry, industrial hygiene, workplace safety, and environmental welfare. Therefore, several chemical and enzymatic model systems that mimic metabolic processes *in vitro* have been developed in order to carry out a satisfactory simulation of the situation *in vivo* [48].

Electrochemical methods are considered nowadays to be useful tools for simulations of biological (i.e. metabolic) redox reactions (Fig. 1). In fact, a major bottleneck in metabolic profiling remains, regards the detection and identification of active metabolites in complex mixtures. Metabolically active sites, i.e., positions at which the drug is prone to suffer oxidation or reduction, can be rapidly elucidated through electrochemical/computational investigations and

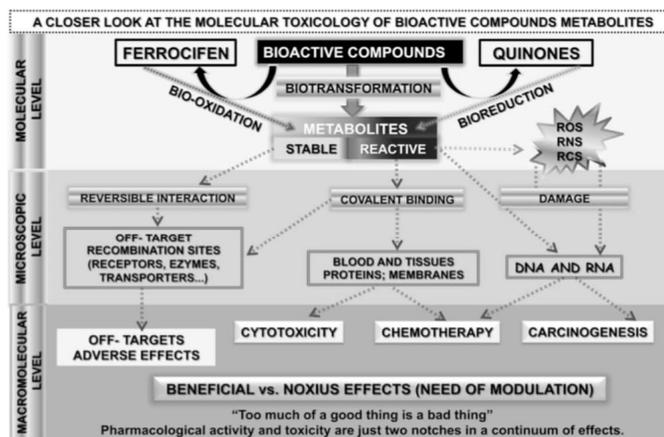


Fig. (1). A closer look at the molecular toxicology of bioactive compounds' metabolites, related mainly to quinones and ferrocifens. (Adapted [46]).

possible metabolites can be directly identified [48]. The majority of these intermediates are formed after oxidation of the parent compound or reduction followed by elimination, to generate an electrophilic intermediate, which subsequently can react with nucleophilic groups in cellular biomacromolecules such as lipids, proteins and DNA (Fig. 1) [3, 4].

In vivo, these reactive metabolites can be generated by metabolic phase-I reactions (oxidation, reduction), e.g., catalyzed by cytochrome P450 reductase (CYP450s), flavin monooxygenases (FMO), and peroxidases and also by phase-II reactions (conjugation), e.g., catalyzed by UDP glucuronyltransferases (UGT) or sulfotransferases (SULT) [49]. The short lifetimes of electrophilic reactive intermediates have boosted the development of analytical strategies mainly based on *in situ* trapping [47].

Several approaches using "on-line metabolite generation" have been described to increase throughput in early drug metabolism studies. Recently, researchers have utilized an electrochemistry-based approach to answer many questions about a compound's metabolic behavior [50-52]. Electrochemical systems take advantage of the relationship between oxidation/reduction chemistry and CYP450-mediated oxidative drug metabolism (phase I metabolism) to provide a wide variety of information on metabolic characteristics. Even though it is still not possible to simulate the complete spectrum of CYP mediated metabolic reactions adequately, and differences between the electrochemically and enzymatically generated metabolites occur, this technique has already shown its potential as a tool that is complementary to existing techniques [48].

Along these lines, the present review will focus on recent investigations on pro-drugs, as represented by quinones and ferrocifens. They will be analyzed in the context of correlations between electrochemical parameters and bioactivities, oxygen reactivity, drug delivery and bioavailability, and the electrochemical investigation of supramolecular interactions with cyclodextrins and lipid bilayers, as related to their solubilization and vectorization.

3. QUINONES

3.1. Introduction

Quinones/hydroquinones (Q/HQ) are a class of prototypical redox molecules that play a variety of vital roles in biology, particularly in electron transfer and energy conservation systems. Research on the electrochemical behavior of these compounds has been actively pursued for many decades.

Quinones have an intriguing dual behavior. Depending on the particular system, they act as an antioxidant and protect cell homeostasis against reactive oxygen species (ROS) or they can act as cytotoxic agents, generating toxic species in an unhealthy cell environment. They represent a class of toxicological intermediates which can create a variety of hazardous effects *in vivo*, including immunotoxicity, carcinogenesis and acute cytotoxicity.

The mechanisms by which quinones cause these effects can be quite complex. Under aerobic conditions, a one-electron reduction predominates, resulting in semi-quinone radicals (SQ[•]) that, in the presence of oxygen, undergo back

oxidation, releasing ROS, including superoxides, hydrogen peroxide and the hydroxyl radical [53] (Fig. 2). Production of ROS can cause severe oxidative stress within cells, through the formation of oxidized cell components (lipids, proteins, organelles and DNA), consumption of reducing equivalents, activation of many signaling pathways, including those of protein kinase C and RAS (reticular activating system) and DNA binding. One of the most important bases of DNA prone to undergo oxidative damage is guanine, which forms the 8-oxodeoxyguanosine (8-HOdG). Many studies suggest that 8-HOdG has been associated with a variety of diseases and undesirable cell events (aging and carcinogenesis) [3, 4, 54].

An alternative pathway of activation involves a two-electron reduction of the quinone function, which may be followed by its inactivation through subsequent glucuronidation and/or sulfonation or by the conversion of the hydroquinone into an alkylating intermediate, the quinone methide (QM) [3, 4]. Such a pattern is believed to predominate under anaerobic conditions.

It should also be noted that several antitumor antibiotics contain quinone groups that bind metal ions [55]. The formed complexes often play key roles in their biological activity, as shown in the case of streptonigrin, an aminoquinone, whose ability to damage DNA was shown to be dependent on the binding of transition metal ions, such as those of iron or copper [56] (Fig. 2). Quinones are great Michael acceptors for endobiotic nucleophiles, and cellular damage/detoxification can occur through alkylation of crucial cell proteins and/or DNA (Fig. 2).

The damage process that occurs to DNA has an intrinsic relationship to the chemical structure of the quinone and the alkylation site, and the cytotoxic consequences are related not only to quinone structure, but also to the cell environment [54, 58].

The versatility and functional diversity of quinones are due primarily to the diverse mid-point potentials that are sensitive to substituent effects, solvent and medium effects (hydrophilic/ lipophilic) and interactions with certain macromolecules (e.g., DNA, proteins and enzymes, e.g., topoisomerase and protein tyrosine phosphatases). The electronic properties of quinones are influenced by substituent groups, hydrogen bonding (H-bonding), hydrophobic and pi-stacking interactions and conformational effects. These factors act in tandem to stabilize or destabilize the semi-quinone radical (SQ[•]) (under aprotic conditions or during enzymatic one-electron transfer). They can be correlated to the nature of the anion radical that is formed *in vivo* or to the completely reduced hydroquinones (H₂Q) or modified derivatives, like quinone methides (QM), through solvolysis or other mechanisms [3, 4].

3.2. Electrochemistry of Naphthoquinones: Recent Advances

Naphthoquinones account for the largest number of natural naphthalenes [59], having a number of different substituents with a variety of structural motifs. They are considered privileged structures in medicinal chemistry due to their structural properties and biological activities [60], especially against tumor cells and pathogenic protozoa.

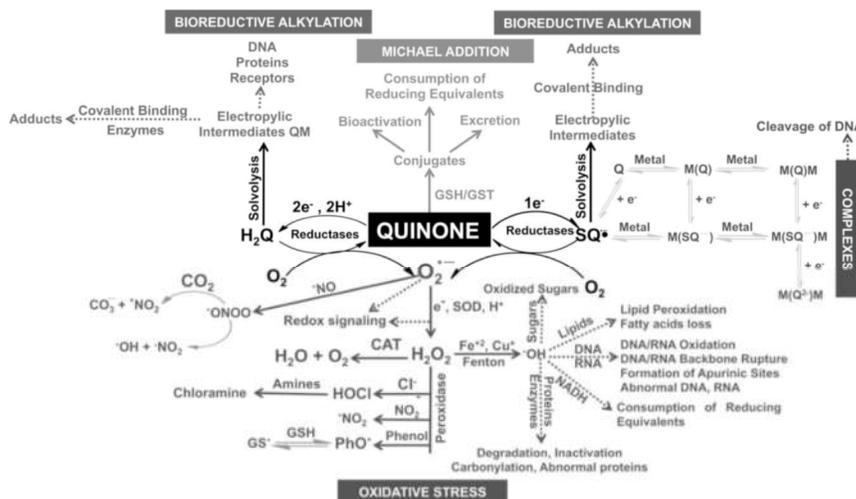


Fig. (2). Potential cytotoxic mechanisms of quinones (Q). The scheme shows the molecular pathways related to the bioactivity of quinones. It covers the generation of oxidative/nitrosative stress (OS/NS) (at the bottom of the figure), the most representative reactive species and selected routes for their generation or interconversion. Semi-quinone-like radicals (SQ•) are generated by autoxidation or by enzymatic reduction of quinone (like, for instance, cytochrome P450 or another NAD(P)H quinone reductase enzyme: quinone oxidoreductase 1 (NQO1)). Phenoxyl radicals (PhO•) are produced from tyrosine and other phenolic metabolites and xenobiotics. Carbon and nitrogen centered radicals are also shown. The enton reaction could occur, in the presence of metal ions, with consequent molecular damage. **Bioreductive alkylation occurs through the generation of electrophilic intermediates (upper part of the figure).** Complexation with metals can also produce toxic or beneficial effects, depending on the site (middle, right). The quinone itself is an electrophile, undergoing Michael addition by several nucleophilic endobiotics, with excretion or toxicity fates (middle, upper part). (Adapted from [3, 4, 57].

They act as vital links in the electron transport chains in metabolic pathways and participate in multiple biological oxidative processes [58-68]. The following sections will deal with this class of compounds, coupling bioactivities and electrochemical studies and does not intend to be exhaustive, taking only the main recent examples from the literature.

3.2.1. Correlation Electrochemistry/Biological Activity

Various human diseases, including different types of cancer, are associated with a disturbed intracellular redox balance and oxidative stress (OS) [69]. ROS (Figs. 1 and 2) are important in regulating normal cellular processes, but deregulated ROS contribute to the development of various human diseases, including cancers [2-5].

Several types of cancer cells exhibit disturbed intracellular redox balance, differentiating them from their non-cancerous counterparts [70, 71]. They have increased ROS levels compared with normal cells, because of their accelerated metabolism. ROS may act directly on DNA, lipids, and proteins to induce cell damage. The alkylation of crucial proteins and nucleic acids can also cause cell damage. Compared to non-cancerous cells, ROS levels are considerably closer to the critical redox threshold at which cell death is induced [5, 72]. These biochemical differences between healthy and malignant tissues are significant and may be used in the design of selective drugs [72].

Redox modulating compounds are able to use such pre-existing redox conditions of sick cells, organelles, parasites and microorganisms for therapeutic advantage as anticancer drugs [72-75] or parasiticidal and microbial agents.

In general, these compounds catalyze the oxidation of redox-sensitive thiol-containing proteins and enzymes and/or significantly increase intracellular ROS levels. These features relate to subsequent processes that lead to apoptosis. Quinones belong to this class of compounds, as they are capable of increasing intracellular ROS levels over a critical threshold and therefore may induce apoptosis in cancer cells. The high ROS content in cancer cells, due to their accelerated metabolism renders them more susceptible to oxidative stress-induced cell death, and can be exploited for selective cancer therapy.

This mechanism explains the high selectivity of nor- β -lapachone (**1**) toward cancer cell lines (Fig. 3), the inferior homolog of β -lapachone that has been recognized as an important prototype with activity against cancer [76]. Subsequently, this substance has been studied by some of the present authors against several cancer cell lines with activity at concentrations in the range of 0.3-1.75 μ M (IC₅₀) [77].

The cytotoxicity and genetic toxicology of nor- β -lapachone (**1**) in human lymphocytes, murine V79 cells, and leukemia HL-60 cells was analyzed, in order to shed some

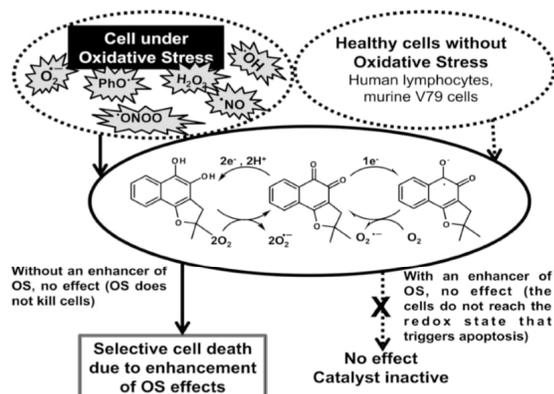


Fig. (3). Proposed mechanism by which nor- β -lapachone (**1**), as a representative of the class of naphthoquinones, causes selective cell death. Oxidative stress (OS) enhancers favor cell death via the apoptotic process.

light on its selectivity toward cancer cells [78]. As measured by the MTT test, exposure of V79 cells to nor- β -lapachone (**1**) resulted in a weak cytotoxicity (IC_{50} 13.41 μ M), and at concentrations up to 21.9 μ M no cytotoxic effect was observed in lymphocytes, while for HL-60 cells, it elicited a significant cytotoxic response (IC_{50} 1.89 μ M).

Evidence of an OS-based mechanism was acquired through the analysis of OS biomarkers (TBARS, nitrite/nitrate and quantification of thiols), use of antioxidants (cultures co-exposed with GSH-OEt showed an increased viability; *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) pre-exposure restored the redox imbalance of the cells and the concentration levels of thiols to the control values) and pro-oxidants (GSH depleting agent, 1-bromoheptane). Nor- β -lapachone (**1**) (2.5 and 5 μ M) failed to induce DNA damage in non-tumor cells, but at higher concentrations, it induced single and double DNA strand breaks and increased the frequency of chromosomal aberrations. Interestingly, these damages were prevented by NAC pre-treatment or exacerbated by early exposure to a GSH depleting agent, 1-bromoheptane.

In our electrochemical experiments, nor- β -lapachone (**1**) at concentrations similar to those used in genotoxic tests did not damage DNA directly, except at the highest tested concentration (200 μ M), where a very weak DNA interaction was observed.

Corroborating the electrochemical data, oxidative modifications of DNA bases, as checked by DNA repair enzymes EndoIII and FPG were observed, reinforcing the indirect actions promoted by nor- β -lapachone (**1**) through ROS generation and not via DNA intercalation. The DNA repair capacities were higher for non-tumor cells than for leukemia cells, which may be related to this compound's selective cytotoxicity towards cancer cells (Fig. 3).

Our data suggest that ROS plays an important role in nor- β -lapachone toxicity and its DNA damaging effects appear only in concentrations several times higher than needed to exert its anti-proliferative effects on cancer cells (Fig. 3).

Additional examples from our research group came from the investigation of multifunctional redox catalysts, enhancers of OS [64] (Fig. 4), synthesized from nor-lapachol [77].

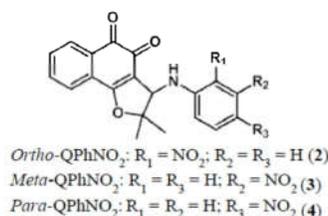


Fig. (4). Structures of 2,2-dimethyl-3-(*N*-nitrophenylamino)naphtho[1,2-*b*]furan-4,5-dione, with the nitro group in different positions (compounds **2** - **4**).

Quinones and nitroaromatics carry out many key reactions of biomedical importance, where the underlying and essential process is electron transfer, coupled with prior or following chemical reactions.

Relatively simple parameters such as redox potentials vary. These variations highlight the power of the structural surroundings of the molecules, and can provide insights into the modulation of their biological activity.

In this paper [64], the cytotoxicity, genotoxicity and early generation of ROS of 2,2-dimethyl-3-(*N*-3'-nitrophenylamino)naphtho[1,2-*b*]furan-4,5-dione (Fig. 4, *meta*-QPhNO₂, **3**) was investigated and compared with those of its precursor, nor-beta-lapachone (**1**) (Fig. 3), with the main goal of proposing its mechanism for antitumor action. The results were correlated with those obtained from electrochemical experiments held in protic (acetate buffer pH 4.5) and aprotic (DMF/TBABF₄) media, in the presence and absence of oxygen, with results from ssDNA and dsDNA bio-

sensors, in solution, which provided evidence of positive interaction with DNA in the case of *meta*-QPhNO₂ (3). Compound 3 caused DNA fragmentation, mitochondrial depolarization and induced apoptosis/necrosis in HL-60 cells.

Pre-treatment with NAC partially abolished the observed effects related to *meta*-QPhNO₂ treatment, including those involving apoptosis induction, indicating a partially redox-dependent mechanism (Fig. 5).

In the same family of compounds, *ortho*- and *para*-QPhNO₂ (2 and 4, respectively) (Fig. 4) were also assayed and showed higher cytotoxicity against tumor cell lines [64] as well as activity as trypanocidal agents [64, 65].

The selectivity of these compounds towards cancer cells in comparison to normal cells is dependent on the presence of the nitro group. In particular, *ortho*- (2) and *para*-QPhNO₂ (4) (Fig. 4) showed higher selectivity indexes than doxorubicin [67], despite being less selective than their precursor, nor-β-lapachone (1) (Fig. 3).

On the other hand and concerning trypanocidal activity, *ortho*-PhNO₂ (2) is significantly active (compared with benzimidazole as a reference), which is different than its *meta*-isomer (3), which is inactive [65, 66]. These results suggest that for the latter bioactivity result, the position of the nitro function becomes very relevant. Molecular electrochemistry, through non-destructive techniques such as cyclic voltammetry (Fig. 6), has proved to be very useful in characterizing electron transfers and deciphering mechanisms in which chemical reactions are associated with electron transfer.

Together with spectroelectrochemical and computational analyses of these derivatives, this has allowed the molecular-based understanding of the electrochemical process with consequences in their above commented specific biological activities [17, 18, 79].

Due to the presence of both the electro-active quinone and nitro-aromatic groups in nor-β-lapachone derivatives (Fig. 4) (represented by [Q]PhNO₂), it is not possible to directly assign the observed signals to a given reaction in the second electron transfer process, as two possible electrogenerated radicals can be formed from the original structure.

In order to discriminate between both possibilities: [Q^{•-}]PhNO₂ or [Q]Ph[NO₂]^{•-}, ESR-electrochemical experiments and theoretical descriptions of the corresponding Fukui functions $f_{\alpha\alpha}^+$ and $f_{\beta\beta}^+(\mathbf{r})$ and LUMO densities considering Finite Differences and Frozen Core Approximations for describing the changes in electron and spin densities of the system, were performed. The results pointed to the formation of a dianion-biradical in the second process (Fig. 7).

The comparison electrochemistry-selectivity index (related to different biological activities) suggests that both the formation of the stable dianion-biradical species and the stability of the semi-quinone intermediates during further reduction are determining factors in the description of their biological activity.

A description of the potential relationships in the results obtained with the experimental selectivity indexes in cytotoxicity assays and in trypanocidal activities, suggest that in the former case, anticancer activities are related to the formation of stable dianion-biradical species, whereas in the latter, stability of the semi-quinone intermediates might be the determining factor.

Recent studies correlating electrochemical parameters and biological activities were published. (Fig. 8A and B) displays the structures of some of the naphthoquinones subjected to both approaches. In several cases, a positive correlation was obtained [62, 80-87], reinforcing the importance of joint efforts.

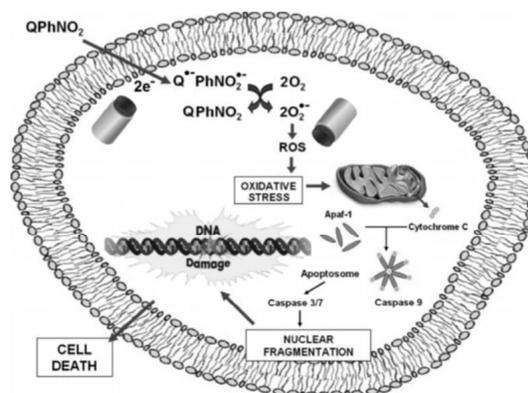


Fig. (5). Proposed mechanism for the molecular action of *meta*-QPhNO₂ (3). After crossing the cell membrane, the quinone is reduced, with ROS generation and redox signaling, leading to apoptosis. DNA damage was also seen. Electrochemical techniques, using aprotic medium, in an attempt to mimic the cellular environment, were useful for the analysis of the nature of the electrogenerated intermediate, and for the measurement of reactivity with oxygen. Adapted from [64].

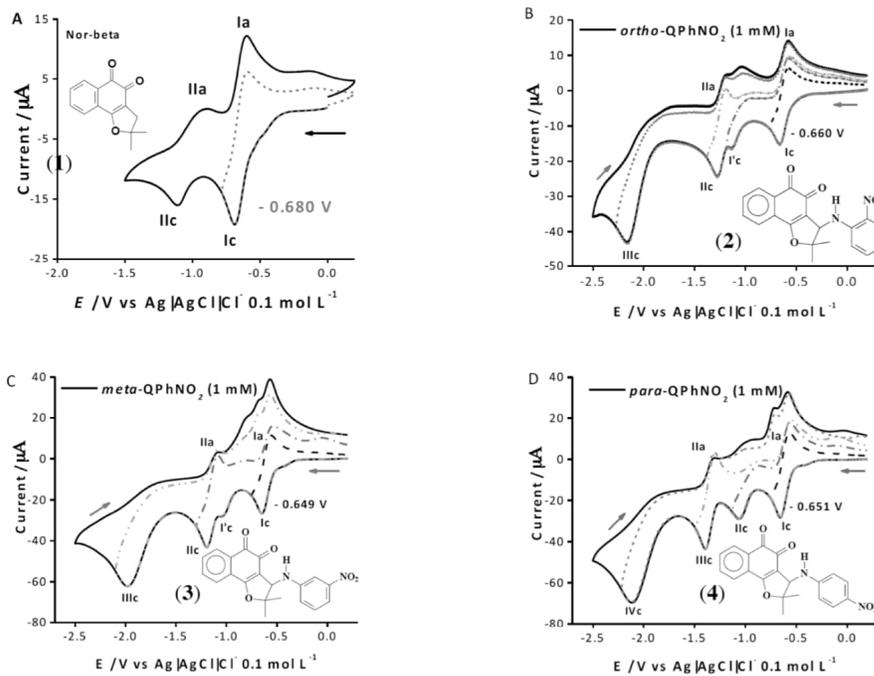


Fig. (6). (A) Cyclic Voltammetry (CV) of nor-beta-lapachone (1) (1 mM); (B) CV of ortho-QPhNO₂ (2) (1 mM); (C) CV of meta-QPhNO₂ (3) (1 mM); (D) CV of para-QPhNO₂ (4) (1 mM), on glassy carbon electrode (3 mm diameter), in DMF + TBABF₄, 0.1 M at 0.100 V s⁻¹ [79].

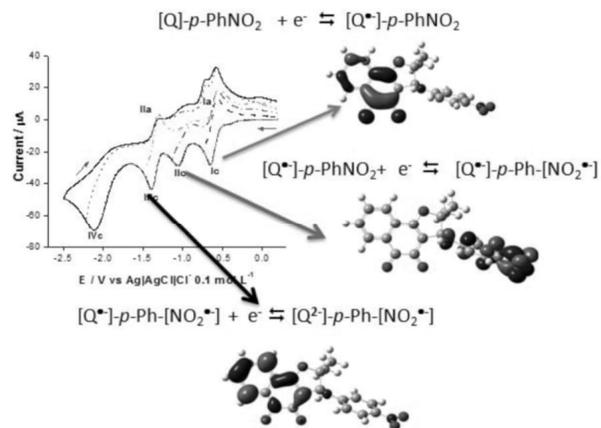


Fig. (7). CV of para-QPhNO₂ (4) and corresponding equations for each redox system (Ic/Ia; IIc/IIa; IIIc/IIIa) and isosurfaces obtained for the LUMO density of the neutral, radical anion and dianion-biradical species. Adapted from [18].

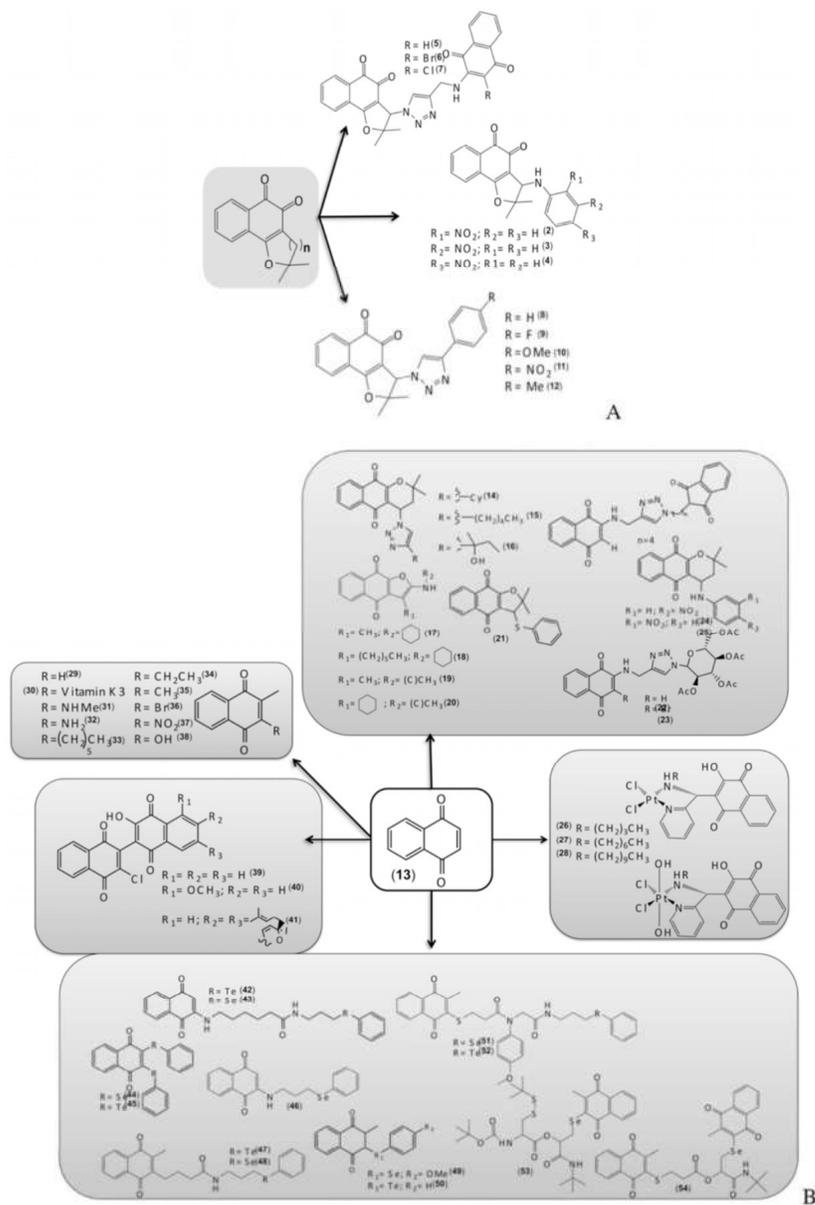


Fig. (8). Naphthoquinones subjected to electrochemical and biological studies. **A:** Derivatives of β -lapachone ($n = 2$) and nor- β -lapachone ($n = 1$) (*ortho*-naphthoquinones). **B:** Derivatives of 1,4-naphthoquinone (**13**) (*para*-naphthoquinones).

1,2,3-Triazole- (compounds **5-12**, **14-16**, **22-23**), arylamino- (**2-4**, **17-20**, **24-25**) and thio-substituted (**21**) naphthoquinones (Fig. **8B**) were evaluated against several human cancer cell lines (blood, ovarian, breast, central nervous system, colon, prostate cancers and melanoma), showing, for some of them, IC_{50} values below 2 μ M. The cytotoxic potential of the tested naphthoquinones was also assayed in non-tumor cells such as human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and two murine fibroblast lines (L929 and V79 cells) [82, 83].

The electrochemical properties of the selected compounds were evaluated in an attempt to correlate them with antitumor activity. The majority of quinones exhibited quasi-reversible reduction behavior, which is typical of simple and well-behaved quinones.

The CV profiles of the other compounds are much more complex due to the presence of other electroactive groups, as is the case of compound **24**, a *para*-nitrophenylamine- α -lapachone (Fig. **9A**), with a behavior close to isomeric nitroquinones, as shown in (Figs. **6** and **7**).

For the thiocompound **21** (Fig. **9B**), the most readily reduced in the series, and the most selective (IC_{50} for HL-60 cancer cell line = 2.91 μ M), a different electrochemical profile was observed. Besides the first two redox systems typical of quinones (Ic/Ia, IIc), in aprotic medium, a third one (IIIc) was observed, which had an irreversible nature, suggestive of a cleavage of the C-S bond (Fig. **9A**) [82]. Considering the selectivity index, this compound has been identified as a lead compound for further investigation. As previously shown by Claus Jacob's group, the use of chalcogens is a productive approach regards cancer chemotherapy [70, 72, 74] (see thiolates and selenates, compounds **42-52**, in Fig. **8B**).

Selenium- and tellurium-based agents turn the oxidizing redox environment present in certain cancer cells into a lethal cocktail of reactive species that push these cells over a critical redox threshold and ultimately kill them through apoptosis, as already described in the present review.

Through cyclic voltammetric studies, in buffered medium, pH 7.4, it was possible to investigate the two redox centers

(quinones and thiolate/selenate), obtaining valuable information about the oxidation and reduction processes such compounds might participate in, both *in vitro* and *in vivo* [74]. The CV confirmed the presence of the two individual redox centers, both of which, under pH control (figure not shown). While the centers influenced each other, via electron withdrawing effects, no specific interference was evident between them, explained by the substantial difference between the chalcogen and quinone redox potentials [74].

Continuing the search for novel trypanocidal compounds, using assays performed against the infective bloodstream form of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, several quinones were synthesized and some of them were investigated through electrochemical techniques (Fig. **8**), in an attempt to correlate them with trypanocidal activity. A trend was seen once more: the more electrophilic quinones showed higher trypanocidal activity [83], as reported earlier [61].

An interesting example involving platinum complexes of aminonaphthoquinones was recently reported [87] (compounds **26-28**) (Fig. **8B**). Three novel platinum (IV) complexes *cis,cis,trans*-[Pt(**HL1-3**)Cl(OH)] (**HL** = 2-hydroxy-3-[(R₁-amino)(pyridin-2-yl)methyl]-1,4-naphthoquinone, R₁ = *n*-butyl, **HL1** (**26**); *n*-heptyl, **HL2** (**27**) and *n*-decyl, **HL3** (**28**)) were obtained from the oxidation of the respective precursors *cis*-[Pt(**HL1-3**)Cl].

Cyclic voltammetry studies of the complexes in MeCN showed the *quasi*-reversible naphthoquinone (NQO, i.e., L) redox process and irreversible process attributed to the reduction of the Pt/Pt pair, at potentials about 400 mV less negative than for the cisplatin precursor *cis,cis,trans*-[Pt(NH₃)Cl(OH)]. Hydrogen bond interaction between the naphthoquinone 2-hydroxyl group and an axially coordinated hydroxide ligand has been proposed to favor the Pt/Pt reduction. The cytotoxicity studies against four human cancer cell lines have shown that in general platinum (IV) and platinum (II) derivatives exhibit the same cytotoxic profile and are all more active than cisplatin [87].

Contributions along this line of thought appear systematically in the literature.

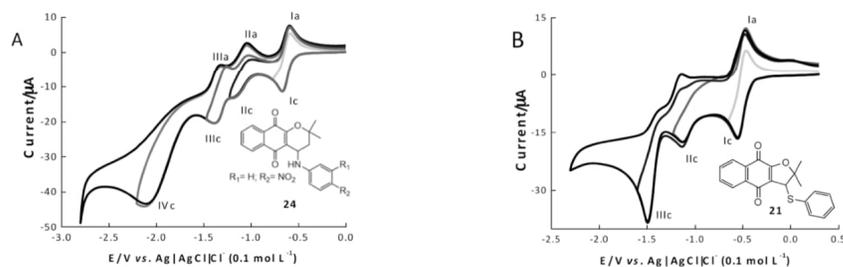


Fig. (9). CV of chosen naphthoquinones **21** and **24** ($c = 1$ mM), DMF/TBAP (0.1 M), glassy carbon electrode, vs. Ag/AgCl, Cl⁻, cathodic direction, $v = 100$ mV s⁻¹. Adapted from [82].

3.2.2. Quinones and Oxygen Reactivity

Cyclic voltammetry investigations of quinones in the presence of oxygen, in aprotic media, have been considered as a useful tool for studying the interaction of oxygen and the superoxide anion radical with quinones and their radical anions [3, 4].

Non-aqueous solvents should provide better models of a membrane environment in which peroxidation processes take place, because both the superoxide anion radical and its conjugated acid, the hydroperoxyl radical, are unstable in water and other protic solvents, owing to their fast disproportionation [3, 4].

Several arylated α - and β -dihydrofuran naphthoquinones (*o*-Qfu-Ph and *p*-Qfu-Ph) (compounds **56-60**) were assayed against 4 human tumor cells lines, HL-60 (leukemia), SF-295 (CNS), HCT-8 (colon) and MDAMB-435 (melanoma), and their electrochemical parameters, obtained by cyclic voltammetry (Figs. **10A** and **B**), in the absence and presence of oxygen, in comparison with their non-substituted precursors, were obtained [62].

The β -dihydrofuran naphthoquinones (compounds **56-60**), whose structures are displayed in (Fig. **10**), were shown to be highly cytotoxic (Fig. **10**), while their positional α -

isomers were considered less active. The level of intracellular ROS release and first wave redox potentials were also analyzed and compared with the kinetic constants of the reactivity of quinones with oxygen (k_{app}), obtained through cyclic voltammetry (Figs. **10D** and **E**).

Significantly positive correlations between ROS release and oxygen reactivity were obtained, while IC_{50} vs. ROS release; the value of $-E_{p1c}$ vs. k_{app} or ROS values correlated in an inverse manner, i.e. the less negative the potential, the higher the activity levels (Fig. **10E**).

3.2.3. In Vitro Electrochemistry of Quinones

β -Lapachone (compound **1**, $n = 2$, Fig. **8A**) has been widely used for its pharmacological activities, particularly against cancer. However, its mechanism of action at the cellular level remains unclear. A common major hypothesis deals with its pro-oxidant properties.

The application of a direct detection method for an oxidative burst at single living cells is interesting because it allows the stimuli caused by the chosen substances on different cells to be known, after mechanical depolarization of the membrane.

The exact nature of the electroactive ROS and RNS released by macrophages under the effect of β -lapachone was

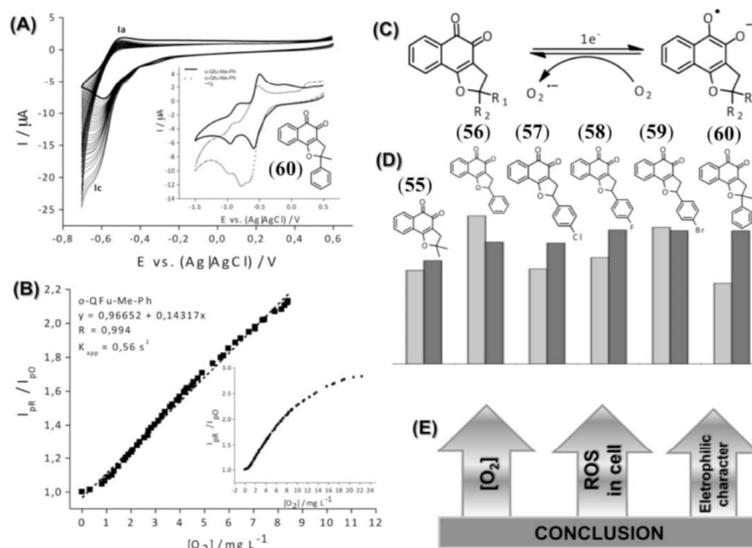


Fig. (10). (A) Cyclic voltammogram for *p*-methylphenyl- β -dihydrofuran-1,2-naphthoquinone (compound **60**) in DMF/TBAP (0.1 M), glassy carbon electrode, in presence of different concentrations of O_2 ; $v = 0.05 \text{ V s}^{-1}$. Inset: cyclic voltammogram of compound **60**, same conditions, in the presence of O_2 (5.0 mg L^{-1}), from 0.5 up to -1.5 V . (B) Linear part of the graph I_{pR} / I_{p0} vs. O_2 concentration to obtain the apparent constants of reactivity, k_{app} . Inset: Saturation graph for I_{pR} / I_{p0} depending on O_2 concentration. (C) Proposed redox cycling process for substituted β -dihydrofuran naphthoquinones. (D) Comparison between the electrochemically measured quinone reactivity toward oxygen (light grey) and ROS release in HL-60 cells (dark grey). (E) Correlation between electrochemical reactivity with oxygen, ROS release in cells and electrophilic character of the quinones, measured by the first reduction potential in aprotic solvent. Adapted from [62].

characterized, and their fluxes quantitatively measured in terms of the primary $O_2^{\cdot-}$ and NO produced by the cells. In the first hour, at 10 μ M, the decrease of the oxidative burst mainly involved RNS species while the amount of H_2O_2 was shown to be higher than for the controls. After longer time incubation, i.e., 4 hours, at 1 μ M, the total amount of ROS/RNS increased, with significant enhancements of H_2O_2 and NO.

At the opposite end, α -lapachone, the pharmacologically inactive *para*-quinone isomer, was unable to significantly increase the RONS production by macrophages.

All these effects were rationalized by considering two different mechanisms featuring opposite of quinone activity in living cells [43] (Fig. 11).

Thus, amperometry at platinized carbon fiber electrodes have unraveled the complexity of β -lapachone effects on cellular oxidative stress nature and intensity [43] (Fig. 11).

The advantages of electrochemical analysis over the usual biophysical methods include the possible direct detection of the initial setting up of oxidative stress conditions, the fast response-time and selectivity of the detection, the possibility of characterizing species that, quickly decay such as peroxynitrite and NO and, above all, it allows single cell analysis.

Taking advantage of the artificial synapse configuration involving a platinized carbon fiber ultramicroelectrode, it was possible to investigate quantitatively and kinetically the

effect of β -lapachone on the nature and strength of cellular oxidative bursts produced by model RAW 264.7 macrophages. These fine and minute amperometric measurements performed on single cells confirmed that β -lapachone affects cellular behavior through two main processes (Fig. 11). In short time periods, the ability of *ortho*-quinones to chelate calcium ions decreases the mechanisms of calcium dependent enzymes with the overall result being that an anti-oxidant effect is observed. Contrastingly, after long periods of incubation, a pro-oxidant effect becomes apparent, most presumably due to the outcome of redox cycling through which β -lapachone mediates electron transfer to dioxygen with the result that lethal quantities of hydrogen peroxide are produced within the cell. This second mechanism eventually leads to cell death, as observed previously by several authors.

In both cases, the *ortho* configuration provides β -lapachone a higher efficiency compared to its *para* isomer. This was ascribed to a lesser ability to chelate calcium ions on the one hand, and to a more negative reduction potential on the other hand, for the *para*-quinone (Fig. 11A).

4. FERROCIFENS

4.1. Introduction

The standard reference for endocrine therapy related to hormone-dependent breast cancer is Tamoxifen (compound 61), a Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) which was introduced during the early 70's (Fig. 12).

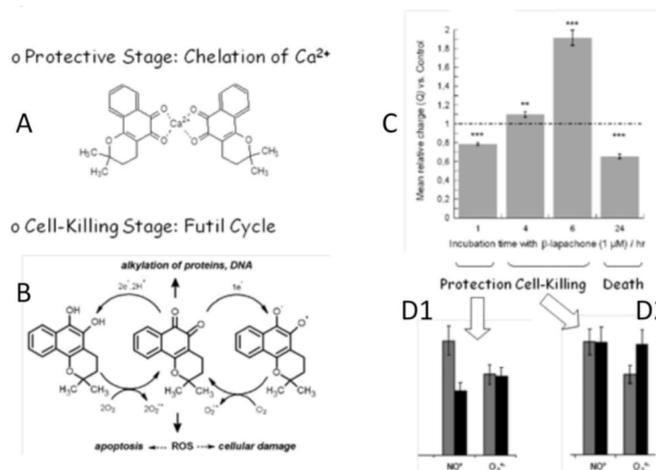


Fig. 11. General scheme explaining the dual nature of β -lapachone, evidenced through amperometry at platinized carbon fiber electrodes. β -lapachone affects cellular behavior through two main processes (Fig. 11A and B). In short time periods, the ability of *ortho*-quinones to chelate calcium ions decreases the mechanisms of calcium dependent enzymes with the overall result that an anti-oxidant effect is observed (Fig. 11A, C and D1). Contrastingly, after long times of incubation, a pro-oxidant effect becomes apparent, most presumably due to the outcome of redox cycling through which β -lapachone mediates electron transfer to dioxygen with the result that lethal quantities of hydrogen peroxide are produced within the cell (Fig. 11B, C and D2). This second mechanism eventually leads to cell death, as observed previously by several authors. Adapted from [43].

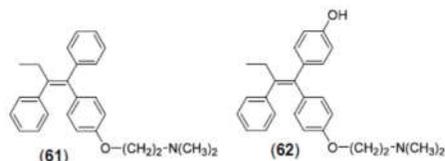


Fig. (12). Structures of tamoxifen (**61**) and 4-hydroxytamoxifen (**62**).

Actually, tamoxifen (**61**) is effective through its hydroxylated form (compound **62**, in Fig. 12) which competitively binds to the estrogen receptor (ER), therefore repressing estradiol-mediated DNA transcription [88-90]. However, tamoxifen remains ineffective against 40% of breast cancers either because some cancer cells do not express ER (classified as ER(-)) or because they develop resistance following prolonged exposure to the drug. Moreover, some worrisome side-effects of tamoxifen have been established, including a higher risk of inducing endometrial cancer as well as a risk of developing blood clots in the lungs [91]. Considering that breast cancer remains a predominant form of cancer among western women [92], the quest for efficient drugs exhibiting anti-estrogenicity and cytotoxicity is of high interest [93, 94].

In this context of drug design/improvement, organometallic compounds have re-gained attention as potent anticancer precursors [95]. Accordingly, G. Jaouen's group devel-

oped a new family of molecules displaying both a ferrocenyl unit and a tamoxifen-inspired diphenyl methylene skeleton, called "ferrocifens" [96-98] (Fig. 13). These compounds were found to be cytotoxic on both hormone-dependent and -independent breast cancer cell lines, at a significantly higher level than tamoxifen [99-102]. The key structural modification lays in the replacement of the phenyl ring by a ferrocene group [98, 103]. Ferrocene by itself is not particularly toxic nor plays a significant biological role. However, the ferricenium cation generated upon mono-electronic oxidation of ferrocene, displayed an anti-proliferative effect on certain cancer cells [104]. Besides, quinone methides, formed by oxidation of the 4-hydroxytamoxifen are known to form adducts with glutathione and nucleobases, inducing severe cell damages [105]. As previously cited, the molecules currently used in chemotherapy are known to generate an oxidizing environment in cells (oxidative stress) and are related to the excess production of ROS and/or RNS. Accordingly, ferrocifens, possessing both a ferrocene group and oxidizable functions on the diphenyl ethylene backbone, are prone to undergo oxidation within cancer cells. Therefore, the redox activation of these molecules is a central issue regards their metabolism.

Electrochemical techniques appear well-adapted to explore the oxidation pathway of ferrocifens *in vitro*. We report here a general overview of the electrochemical behavior of ferrocifens, with particular emphasis on a model compound which allowed the characterization of stable and transient intermediates along the oxidation sequence. Finally, some

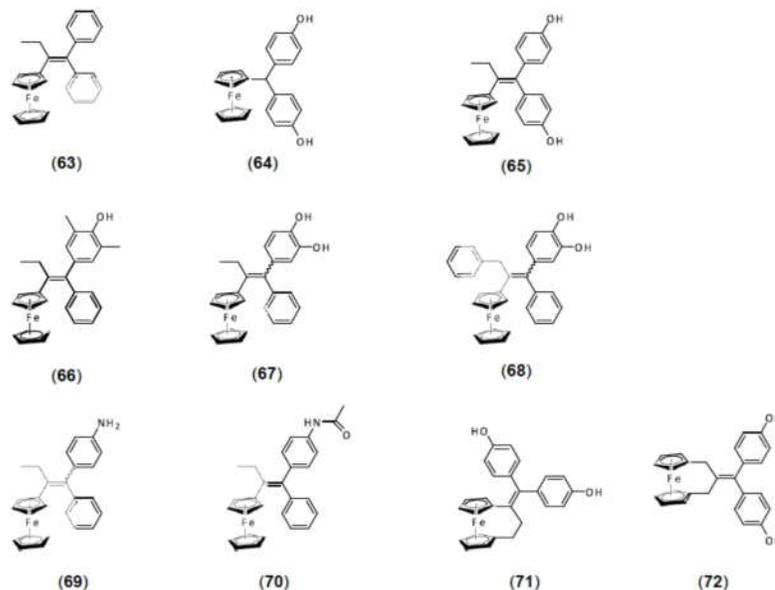


Fig. (13). Structures of the complexes discussed in the Ferrocifens.

redox properties observed in hydrophobic environments (cyclodextrins, lipid layers) are discussed with respect to their administration and vectorization.

4.2. Electrochemical Behavior of Ferrocifens

4.2.1. Ferrociphenols

Ferrociphenols are ferrocifens substituted by one or more hydroxy groups on their phenyl rings, which display both anti-estrogenic and cytotoxic activities [106]. The ferrocenyl analogue of hydroxytamoxifen was found 60 times more cytotoxic than the parent phenyl hydroxytamoxifen (**62** in Fig. 12), emphasizing the crucial role of the conjugated ferrocene group in its cytotoxicity. The oxidative chemistry of ferrociphenols was first investigated by cyclic voltammetry in model environments featuring biologically-relevant bases such as pyridine and imidazole, which have pKa values similar to those of peptides, or DNA nitrogen intracellular bases. A seminal work on ferrociphenols highlighted the close relationship between the cytotoxicity of a given ferrociphenol and its ability to form a quinone methide (QM) upon oxidation [107]. Accordingly, (Fig. 14) shows the cyclic voltammograms (CVs) obtained from typical cytotoxic and non-cytotoxic ferrociphenols.

When no base is present, the CVs only display the ferrocene reversible oxidation wave at 0.35 V/SCE (peaks O_1/R_1). Upon addition of pyridine, the CVs of the non-phenolic complex **63** and the C-sp³ complex **64** remain unchanged. The addition of pyridine to the solution of complex **65** dramatically affected the CV. First, the intensity of the ferrocene oxidation wave increased (wave O_1'), featuring the passage from a mono-electronic to an apparent bi-electronic oxidation process upon addition of pyridine. A new oxidation wave is observed on the same CV at 0.5 V/SCE (wave O_2). A comparison of the behavior of the three complexes suggests that the over-oxidation of **65** observed in the pres-

ence of pyridine was related to both the presence of the phenol function and to the π -conjugated position of the ferrocene in the molecule (not conjugated in complex **64**). Hence, a reaction structurally favored in **65** while impossible in **63** and **64** may be the intramolecular electron transfer between the phenol (donor) and the ferricenium center (acceptor), through a slight coupling over the conjugated π system. This hypothesis was supported by the CVs recorded in a methanol solution containing ferrocene, 1,1-di-*p*-hydroxyphenyl- 2-phenylbut-1-ene and pyridine. Under these conditions, the Fe/Fc⁺⁺ couple remained reversible, while an additional wave was observed at ca. 1V/SCE and ascribed to the direct electrochemical oxidation of the phenol moiety of 1,1-di-*p*-hydroxyphenyl- 2-phenylbut-1-ene. That first series of experiments allowed us to envision an intramolecular electron transfer between the phenol and the ferricenium for cytotoxic ferrociphenols, which led us to propose the oxidation sequence displayed in (Fig. 15).

Mechanistically, the oxidation sequence features a base-promoted electron transfer between the phenol and the ferricenium over the delocalized π system of the molecule, made possible by the increased acidity of the hydroxy group (which could structurally be represented by a hydroxyl radical cation as the species resulting from the intramolecular electron transfer) [108]. A phenoxy radical is formed which then evolves to a more stable carbon-centered radical. In the presence of a base, the oxidation of this radical at O_1' yields a quinone methide (QM), which reversibly oxidizes at O_2 (verified with an authentic QM).

Hence, the cytotoxicity of ferrociphenols originates from the possibility to produce quinone methides in oxidizing environments, QM being electrophilic which could damage cells by adduct formation with DNA, GSH (glutathione), or proteins [105]. Recently, it was also shown that extension of electronic communication in the generated radical cation might be of significant relevance for bioactivity [109].

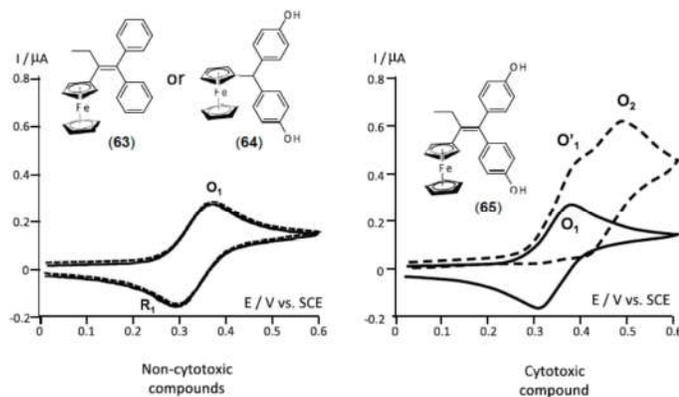


Fig. 14. Cyclic voltammograms (CVs) of non-cytotoxic (**63** and **64**) and cytotoxic (**65**) ferrocifens (2 mM in 0.1 M Bu₄NBF₄/MeOH) in the absence (straight line) and the presence (dashed line) of 2 M pyridine. Scan rate: 0.5 V.s⁻¹. Working electrode: Pt, 0.5 mm diameter. Adapted from [107].

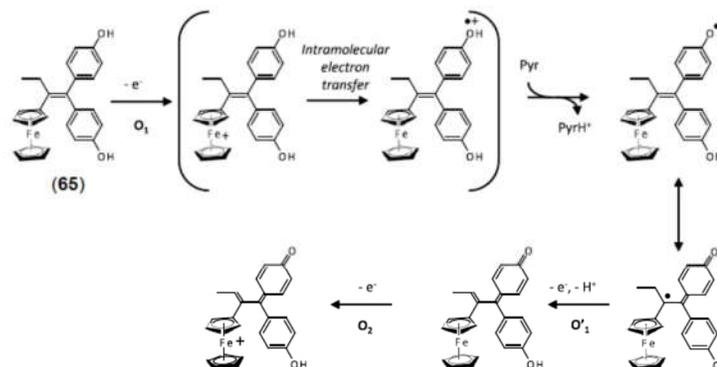


Fig. (15). Oxidation sequence of complex **65** to the corresponding quinone methide. Adapted from [107].

Thermodynamically, the presence of ferrocene allows the oxidation of the phenol group to proceed at less positive potential values than that of hydroxytamoxifen, i.e. in biologically-relevant oxidizing conditions [110].

4.2.2. Ferrocenyl Catechols

Ferrocenyl catechols **67** and **68** were found strongly cytotoxic on MDA-MB-231 breast cancer cell lines, with IC_{50} values in the 0.48-1.21 μM range [111].

The CVs of **67** and **68** are shown in (Fig. 16). In acetonitrile, the CVs of **67** exhibited a reversible oxidation wave at 0.42 V/SCE ascribed to the Fe/Fc^+ couple. In the presence of imidazole as a base, two oxidation steps appeared, i.e. a nearly 2-electron irreversible oxidation peak appeared, at a potential strongly dependent on imidazole concentration. At 0.52 V one could observe a 1-electron reversible oxidation wave, its potential being independent of base concentration. The same general behavior is observed with **68**.

The changes observed on the CVs upon addition of imidazole as a base appear more dramatic than those obtained with phenols (complex **65**, Fig. 14). At high imidazole excesses, the bi-electronic oxidation of the catechols produces

a species which oxidizes at 0.52 V/SCE. The chemical oxidation of **67** and **68** by Ag_2O led to the formation of the corresponding *ortho*-quinones (OQ) [111]. Since the base-dependent electrochemical behavior of ferrocenyl catechols is very similar to that observed with ferrocenophenols and especially to the one observed with model compound **66** (see paragraph 3), the formation of *ortho*-quinones from catechols most likely follows the sequence depicted in (Fig. 17):

In the absence of imidazole, **67** and **68** undergo a reversible mono-electronic oxidation (step (A)). In the presence of imidazole, a 2-electron oxidation sequence is triggered (steps (A) + (B) + (C)). One can notice that the full (A) + (B) + (C) sequence was fast enough to be seen within the same scan in the presence of imidazole. Finally, ferrocenyl catechols appear as potent anti-cancer drug precursors through their favored OQ conversion under biological conditions [112].

4.2.3. Ferrocenyl Aniline and Acetanilide

Ferrocenyl aniline or acetanilide (compounds **69** and **70**) also exhibit strong cytotoxic activity against hormone-dependant MCF-7 and hormone independent MDA-MB-231 breast cancer cell lines [113]. Actually, the electrochemical

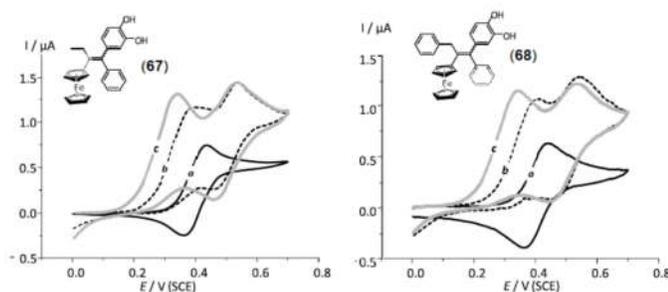


Fig. (16). CVs of **67** and **68**, 1 mM in acetonitrile/ Bu_4NBF_4 (0.1M). Platinum electrode (0.5 mm diameter), scan rate 0.2 V s^{-1} . CVs recorded in the absence (a) and in the presence of 1 molar equivalent (b) and 10 molar equivalents (c) of imidazole. Adapted from [111].

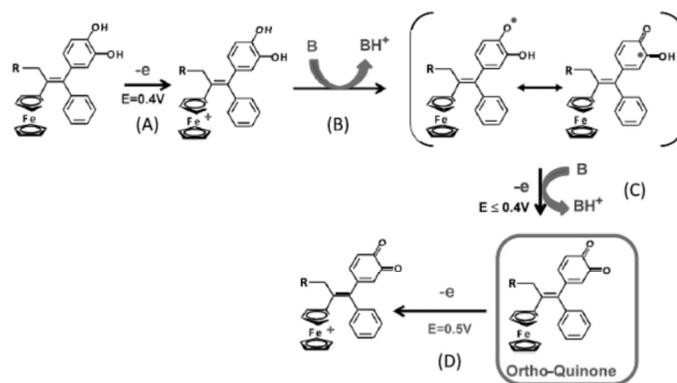


Fig. (17). Proposed oxidation sequence of catechols **67** (R=CH₃) and **68** (R=Ph). Adapted from [111].

behavior of **69** and **70** showed only a slight dependence on base concentration, the base being either imidazole (Fig. 18), or collidine [114, 115].

Complex **69** exhibited two successive oxidation waves ascribed to the oxidation of the ferrocene and the amino centers, respectively. We established that the wave corresponding to the oxidation of the amino group gradually decreased upon repeated scans, suggesting that the amine moiety was involved in the formation of a film at the electrode surface. Electrolysis performed at the potential value of the second wave led to the covalent grafting of **69** onto the electrode surface.

As already reported, the electrochemical oxidation of the amino groups produces a cation radical which deprotonates to form an aminyl radical that reacts with the electrode surface [116-118]. Actually, the grafting of **69** also occurred when electrolysis was carried out at the potential value of the first wave (corresponding to ferrocene oxidation). Therefore, over a relatively large timescale, an intra-molecular electron transfer from the amino group to the ferrocenyl center took place (Fig. 19) just like for the ferrociphenols.

Considering the similar oxidation routes for ferrociphenols and ferrocenyl amines/amides, the cytotoxicity of compounds **69** and **70** may be ascribed to the intermediate formation of imino methides (IM) (Fig. 19), a family of molecules involved in several cytotoxic processes [119-124]. Contrary to acetylated quinone imines which are important toxic compounds (e.g. tolcapone in Parkinson's disease [125]), acetylated imino methides, which could be envisioned as the ultimate oxidized species for **70**, have been identified as transient intermediates species [126]. The instability of these compounds is probably due to the electron withdrawing effect of the acetyl group, which favors the quinoid form over the aromatic form [127].

4.2.4. Ferrocenophanes

A family of complexes possessing a constrained ring structure including the ferrocene moiety were prepared, considering that more rigid structures could enhance the cytotoxicity of ferrociphenols. In this series, two ferrocenophanes (**71** and **72**) were investigated electrochemically [128].

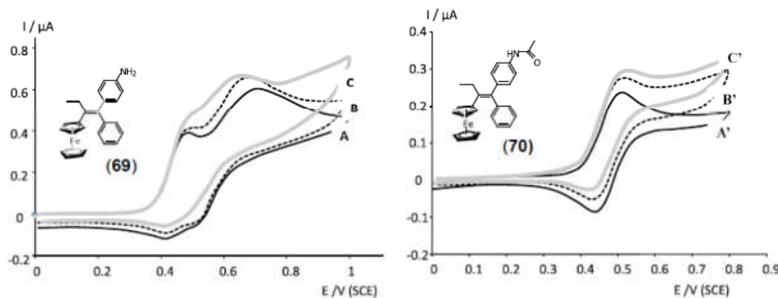


Fig. (18). CVs for **69** and **70**, at 1 mM and 0.5 mM respectively in DMF. Working electrode: Pt (0.5 mm diameter), scan rate = 0.1 V.s⁻¹. A, A': CVs recorded without imidazole; B: 10 molar equivalents of imidazole added; B': 50 molar equivalents of imidazole added; C: > 500 molar equivalents of imidazole added; C': 25 molar equivalents of imidazole added. Adapted from [113].

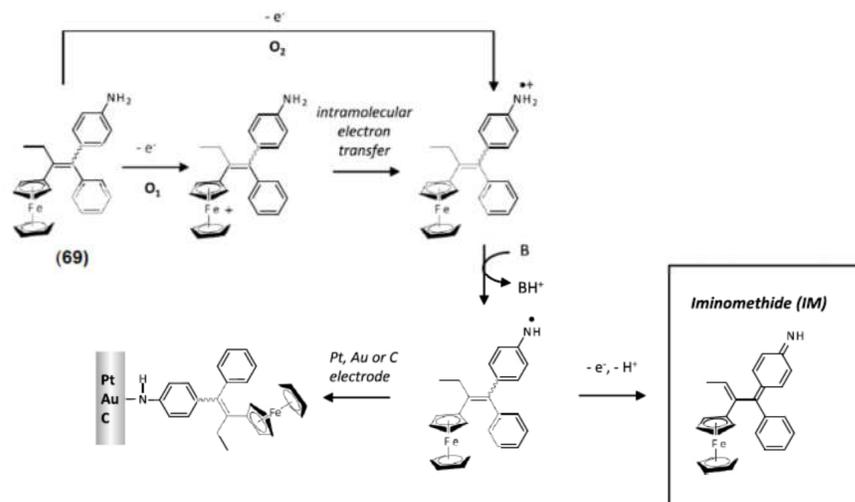


Fig. (19). Oxidation pathways of complex 69. Adapted from [114].

The classical mono-electronic oxidation of the ferrocene group was observed at 0.46 V (**71**) and 0.48 V (**72**) on the CVs (Fig. 20). Upon addition of large excesses of imidazole, the current intensity of these oxidation processes increased, suggesting that the oxidation sequence depicted for ferrociphenols still applies to these complexes.

However, larger base excesses (with respect to ferrociphenols) are required to trigger the oxidation sequence. For **71**, an intra-molecular electron transfer from the phenol to the ferricenium may still be envisioned, since the conjugated structure allows a delocalization of electrons. For unconjugated **72**, an intermediate α -methylene radical (such α -methylene ferricenium molecules which possess acidic protons) is most likely involved [129], which may undergo an additional oxidation step to form the quinone methide. Com-

plex **72** exhibited an IC_{50} of 0.96 μ M, a value comparable to that of **65**. Surprisingly, compound **71** possessed an IC_{50} value of 0.09 μ M, far the lowest value of all ferrociphenols presented in this article [128]. Such an exceptional cytotoxicity does not directly correlate with the energetics of the oxidation sequence, considering that easier-to-oxidize ferrociphenols like **65** are less cytotoxic. Therefore, if an oxidizable group is necessary to induce an anti-proliferative effect, it cannot be anticipated from the kinetics and thermodynamics of the oxidation sequence.

4.3. Oxidative Metabolism of a Model Ferrociphenol

In order to further explore the oxidation mechanism of ferrociphenols, we focused on the electrochemical behavior of ferrociphenol of complex **66** [130]. We expected the inductive effect of the

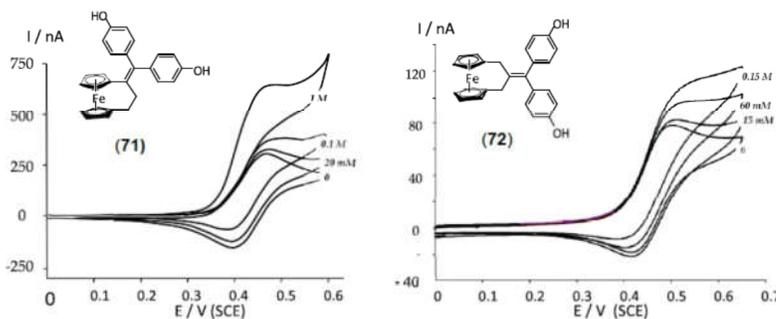


Fig. (20). CVs of **71** (1 mM, scan rate 100 $mV s^{-1}$, left) and **72** (0.3 mM, scan rate 50 $mV s^{-1}$, right) in the presence of increasing concentrations of imidazole. Adapted from [128].

ortho-methyl substituents to stabilize the radical intermediates. Accordingly, the phenoxyl radicals of cresols and resorcinols are known to form at enthalpies ca. $40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ more negative than that of unsubstituted phenoxyl radicals [131]. The base-dependent electrochemical behavior of **66** is shown in (Fig. 21).

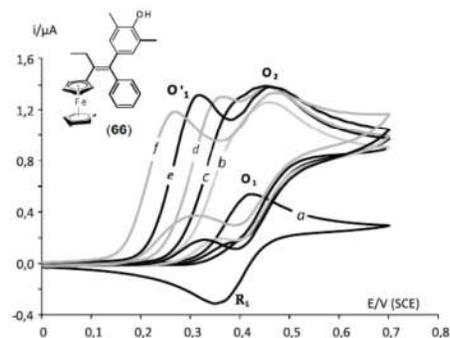


Fig. (21). CVs of **66** (0.9 mM) in acetonitrile/TBAPF₄ (0.1 M) with increasing concentrations of imidazole: a) 0, b) 0.9, c) 4.5, d) 18, e) 90, and f) 560 mM. Electrode: Pt, 0.5 mm diameter; scan rate $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Adapted from [130].

In the absence of base, complex **66** exhibited the reversible one-electron ferrocene oxidation wave (O_1). The addition of imidazole gave rise to several changes on the CVs: the intensity of the oxidation wave dramatically increased and shifted to more negative potential values (O_1'), the CVs finally displaying two distinct peaks at large imidazole excesses (O_1' and O_2). O_1' was ascribed to the direct bi-electronic formation of the QM noted as **66d**, while O_2 corresponded to the mono-electronic ferrocene oxidation of the QM (producing **66d'**), an hypothesis supported by the determination of the absolute number of electrons involved at O_2 (found to involve a total of ca. 3 electrons), compared to the same determination in the absence of imidazole at O_1 (found to involve 1 electron).

Preparative electrolyses monitored by stationary voltammetry allowed the characterization of the intermediate paramagnetic species by EPR (i.e. the Fe(III) intermediates and the organic radical species). The stationary voltammograms are shown in (Fig. 22).

The electrolysis of **66** carried out in the absence of imidazole generates a stable ferricenium species **66⁺** which reduces at 0.38 V (curve II, ferricenium species detected by EPR at the end of the electrolysis). The addition of imidazole to that ferricenium species triggers a chemical sequence leading to a solution corresponding to curve III, i.e. a globally bi-electronic oxidation wave. Actually, the addition of imidazole generates a transient EPR signal ascribed to a carbon-centered organic radical **66b'**, which decomposes upon heating and/or with time.

We have recorded CVs at higher scan rates in order to track the signature of transient redox species formed during the oxidation of **66** to its QM (Fig. 23).

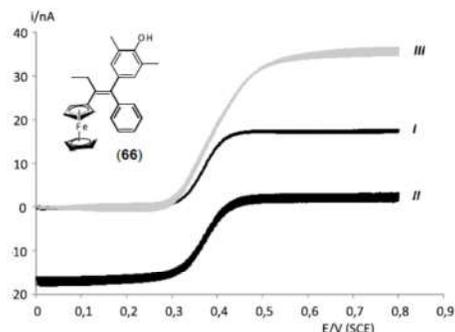


Fig. (22). Linear sweep voltammetry in acetonitrile + TBAPF₄ 0.1 M solutions containing (I) a solution of **66** at 5 mM. (II) after a 0.95 Faraday/mole electrolysis of solution I at 0.7 V/SCE. (III), after addition of 10 molar equivalents to solution II. Electrode: Pt, 25 μm diameter; scan rate $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Adapted from [130].

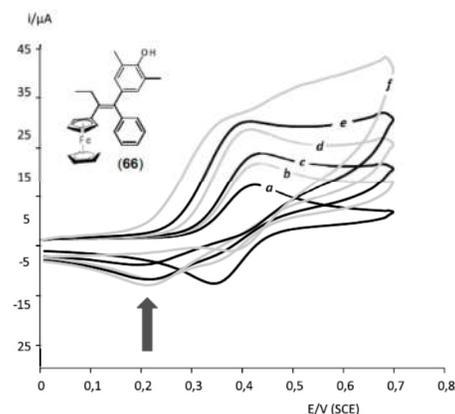


Fig. (23). CVs of **66** (0.9 mM) in acetonitrile/TBAPF₄ (0.1 M) with increasing concentrations of imidazole: a) 0, b) 0.9, c) 4.5, d) 18, e) 90, and f) 760 mM. Electrode: Pt, 0.5 mm diameter; scan rate $75 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Adapted from [130].

At $75 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, the CVs of **66** exhibited the evolution already described at low scan rates in (Fig. 21), except that a new reduction wave appears at 0.22V during the backward scans. This new wave was only observed between 5 and 100 molar equivalents of base. This behavior was consistent with the reduction of a transient intermediate whose concentration was both time- and base-dependent. This result suggested that the new reduction wave corresponded to the reduction of the carbocation **66c⁺** obtained after the one-electron oxidation of the organic carbon-centered radical **66b'**. At large base excesses and/or large time frames, this cation is fully deprotonated to yield the quinone methide although its reduction may not be observed. Conversely, at fast scan rates (short time frames) and/or a low base concentration range, it

is not yet produced by the oxidation of **66**. Intermediate base concentrations and/or time-frames allowed its observation during the backward voltammetric scan. The overall oxidation sequence of **66** is shown in (Fig. 24).

The formation of quinone methide **66d** was achieved under biological conditions by rat liver microsomes [132]. Furthermore, the biologically-synthesized QM was found toxic against MDA-MB-231 cells, making quinone methides the active metabolites responsible for the anti-proliferative effect observed. Finally, thorough mechanistic exploration we were allowed to determine the species found along the oxidation pathway of ferrociphenols. Quinone methides appear to be the stable metabolites obtained *in vivo*, in agreement with the oxidizing environment encountered in many cancer cells [133].

4.4. An Electrochemical Contribution to the Study of Drug Delivery

4.4.1. Solubilization

Several strategies have been envisioned for the administration of ferrocifens, including nanoparticles, lipid nanocapsules, or cyclodextrins [134-137]. In this context, electrochemistry has been used to monitor the behaviors of the electroactive species formed along the oxidative metabolism pathway of ferrocifens in the presence of cyclodextrins (CDs) or lipid bilayers as well as the possible modifications of the oxidation sequence in the presence of supramolecular interactions between ferrocifens and their host. This allowed

an interesting perspective regards the general question linked to vectorization of ferrocifen drugs.

The electrochemical behavior of ferrociphenol **65** in the presence of CDs (Me- β -CD and β -CD) was first investigated in a MeOH/H₂O (*v/v* = 1/1) mixture (Fig. 25). Comparison of the CVs obtained in the absence and the presence of CDs, indicated the inclusion of complex **65** in the Me- β -CD cavity very likely via its apolar ferrocene moiety.

The addition of CDs leads to a potential shift of wave O₁ (Fig. 25 (A)) towards more positive values as well as a decrease in the peak current of wave O₁ which tended to adopt a sigmoidal shape. These concomitant behaviors indicate the involvement of a consecutive chemical-electrochemical (CE) mechanism in which the oxidation process is limited by the dissociation step of the complex formed between the CD and the ferrocifen. Indeed, an electroactive species cannot undergo any direct electrochemical reactions if it forms a stable host-guest inclusion complex with a CD [138-142]. Under these conditions, the complex must dissociate and release the electroactive species. The thermodynamic stability of the [65.Me- β -CD] complex was evaluated in MeOH and MeOH/H₂O (1:1) by plotting the variation of the half-wave potential of O₁ in the presence of CD with respect to the half-wave potential in the absence of CD as a function of the total concentration of Me- β -CD [137]. The inclusion constant of the [65.Me- β -CD] complex was found equal to 80 M⁻¹ (in MeOH) and 825 M⁻¹ (in MeOH/H₂O (1:1)) in agreement with the polarity medium. Interestingly, the inclusion of **65** in the CD cavity also depends on the CD polarity.

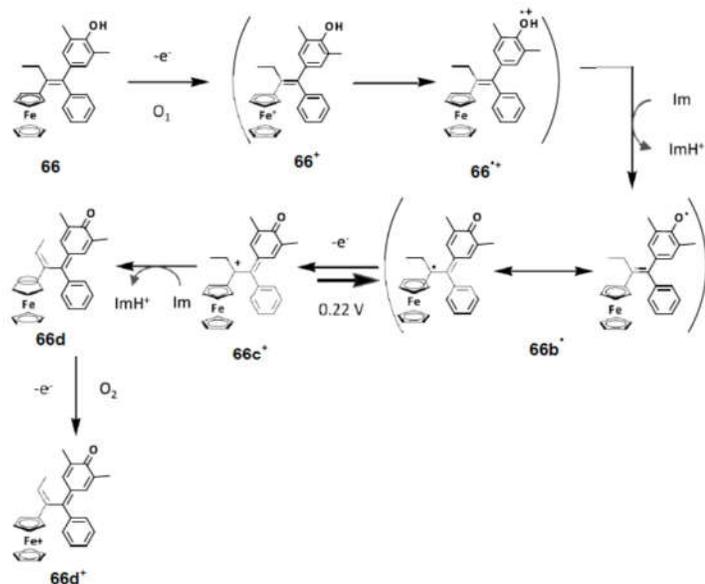


Fig. (24). Detailed oxidation sequence of ferrociphenol **66**. Adapted from [130].

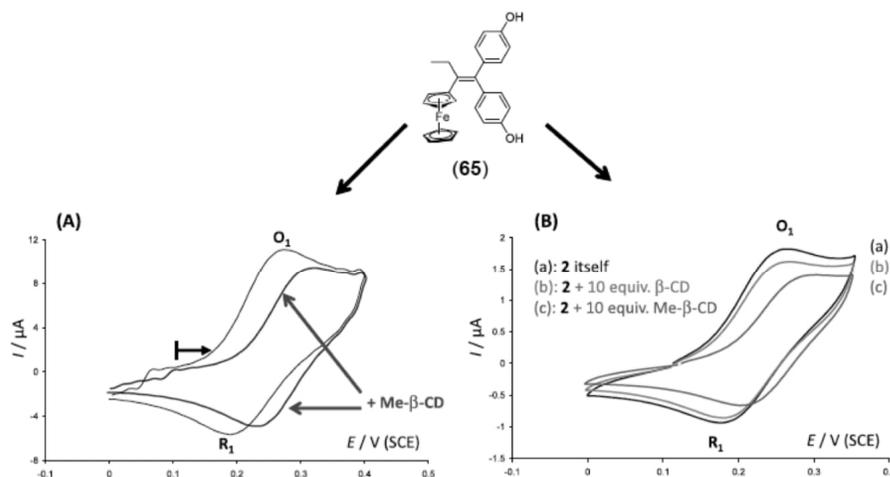


Fig. (25). **A**) CVs of **65** (1 mM) in the absence of and presence of Me- β -CD (5 equiv). $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$. **B**) CVs of **59** (1 mM) at a scan rate of 50 mV s^{-1} . (a) in the absence of CD or (b), (c) in the presence of 10 eqs. of β -CD and Me- β -CD, respectively. Conditions: MeOH/H₂O (1:1) + TBABF₄ (0.1 M) at a glassy carbon electrode (3 mm diameter). Adapted from [137].

Comparison of the cyclic voltammograms obtained for the same concentration of **65** in MeOH/H₂O (1:1) in the absence of and the presence of 10 molar equivalents of either Me- β -CD or native β -CD shows that both the decrease in I_{O1} and the shift in E_{O1} are greater in the presence of Me- β -CD than of β -CD, indicating a stronger complexation in the former case. This can be explained by strong hydrophobic interactions between the cyclopentadienyl and/or the aromatic rings and the methoxy groups of the partially methylated CD.

Importantly, the inclusion complexes formed between either Me- β -CD or β -CD and ferrocifens are soluble in pure water without the adjunction of any organic solvent demonstrating that CDs can be used to deliver these biologically active molecules. In (Fig. 26), the CVs obtained after complete solubilization of ferrocifen **65** in the presence of either β -CD or Me- β -CD, are displayed.

In both cases, the oxidation of **65** occurred at a more positive potential, with respect to the studies performed in less polar media such as MeOH and MeOH / H₂O, in agreement with the high polarity of water. Under these conditions, the oxidation wave also exhibited a pronounced plateau shape in accordance with a fully developed CE process proceeding under pure kinetic control. Conversely, the reduction wave, observed on the backward scan, exhibited a peak rather than a plateau shape, demonstrating that the electro-generated charged and polar ferricenium species was not complexed by the cyclodextrin. As observed in the presence of alcohol, the shift in E_{O1} is greater in the presence of Me- β -CD than of β -CD, showing, here again, a stronger complexation of **65** with Me- β -CD than with β -CD. However, the peak current of the oxidation wave was higher in the presence of Me- β -CD, a larger amount of **65** being solubilized in that case.

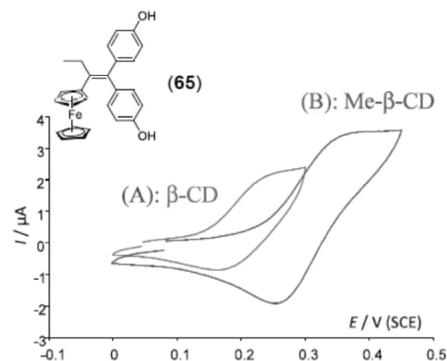


Fig. (26). Cyclic voltammograms of **65** (1 mM) in H₂O + Na₂SO₄ (0.1 M), recorded at a glassy carbon electrode (3 mm diameter) and in the presence (A) of β -CD or (B) Me- β -CD (20 eqs.). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Adapted from [137].

Moreover, it was shown that the structure of ferrocifens affects both their solubility and their complexation dynamics [137]. For instance, the presence of phenol groups is of great importance for solubilizing the ferrocifen-CD adducts. Similarly, the absence of the apolar ethyl-vinyl fragment in **64** increases the solubility of the complex in water and the complexation dynamics becomes faster.

The use of CDs clearly appeared to be a possible way to overcome the poor water-solubility of ferrocifens. In such a context, it was of great interest to investigate the reactivity of oxidized ferrocifens, in water and in the presence of CDs, to

examine whether or not the presence of CD affected the reactivity of the initially formed ferricenium cations. This was performed in a model environment in the presence of pyridine.

The addition of an excess of pyridine to a **65**/ Me- β -CD solution led to an approximately threefold increase of the peak current of O_1 and a pronounced change in the wave shape, with a loss of reversibility suggesting an EC sequence (Fig. 27).

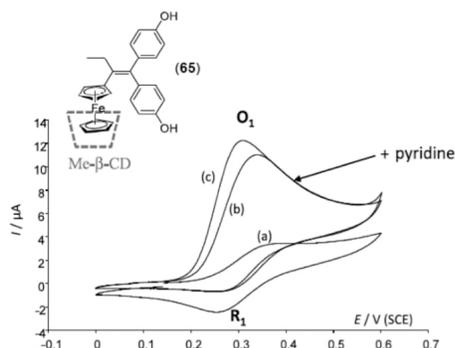


Fig. (27). CVs of **65** (1 mM) in $H_2O + Na_2SO_4$ (0.1 M), recorded at a glassy carbon electrode (3 mm diameter) in the presence of Me- β -CD (20 equivs.) and a) in the absence of or b) c) in the presence of 0.1 and 0.2 M, respectively, of pyridine. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Adapted from [137].

Considering the initial sluggish one-electron CE process current, it was inferred that the maximum current value ob-

tained in the presence of pyridine corresponded roughly to a three electron process. This behavior showed that the presence of pyridine kinetically favored the dissociation of the **65**/CD complex and opened a subsequent two-electron pathway after the initial formation of the ferricenium derivative. This appeared fully consistent with the former investigation of pyridine-induced effects on the voltammetry of **65** in apolar medium [107]. This also indicates that the overall mechanism previously depicted for oxidation of **65** in the presence of a base (see Fig. 15) still prevails when **65** is initially complexed by CD. This implies that oxidation of [**65**, CD] produces an uncomplexed 65^{+} (EC mechanism) or that **65** is oxidized after decomplexation (a CEC mechanism). Under these conditions, a three electron oxidation sequence is most likely triggered in the presence of pyridine, irrespective of the fact that **65** is borne initially by CD. The corresponding mechanism is displayed in (Fig. 28).

In this mechanism the third electron transfer most likely corresponds to a further oxidation of the ferrocene moiety in the quinone methide structure. Also, the passage from a one-electron plateau shape to a three-electron peak-shape for wave O_1 observed in the presence of both CD and pyridine (Fig. 27) shows that the base kinetically favors the dissociation of the ferrocifen-CD complex (by interaction with the phenolic group), but does not affect the follow-up reactivity of the electrogenerated ferricenium cation which leads to the corresponding quinone methide as reported in the absence of CD.

The *in-vitro* effect of organometallic complexes **64** and **65**, alone or encapsulated in Me- β -CD, was then investigated in the presence of hormone-independent breast cancer cell lines (MDA-MB-231) to evaluate whether or not the presence of CD affects the bio-availability of ferrocifens. In (Fig. 29), the anti-proliferative effects obtained after culturing the mixtures for four days are summarized [137].

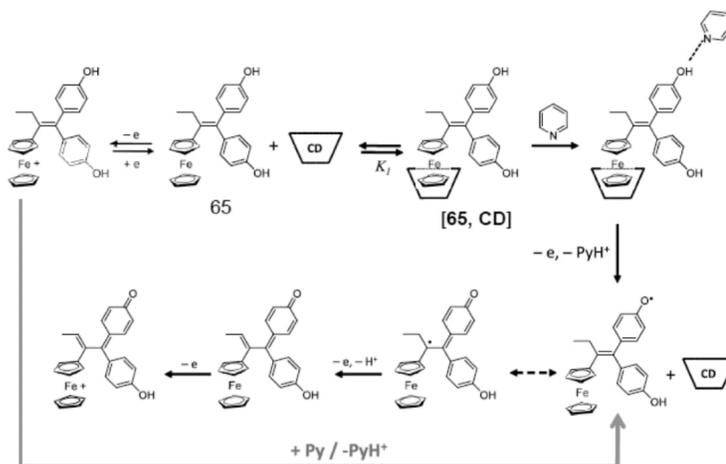


Fig. (28). Proposed mechanism for the oxidation of **65** in the presence of CD and pyridine. Adapted from [137].

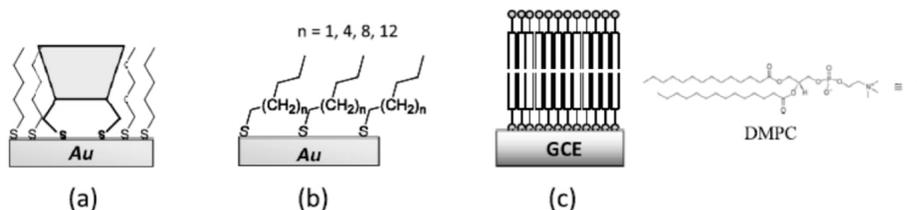


Fig. (30). Electrode modifications to investigate the interactions of ferrocifens with various hydrophobic molecular architectures: cyclodextrins (a), alkyl chains (b), and a planar bilayer of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) (c). Adapted from [145] and [146].

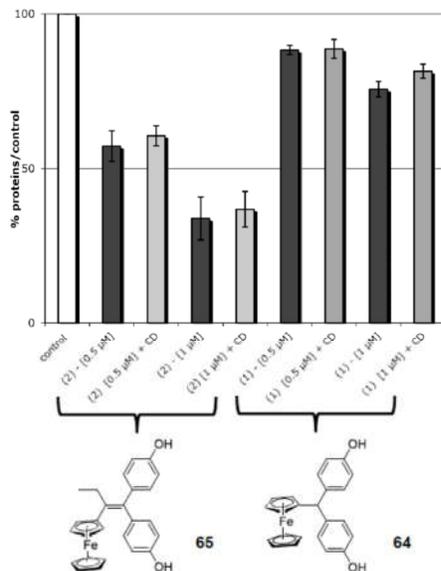


Fig. (29). Comparison of the anti-proliferative effect of ferrocenyl complexes **65** and **64** (0.5 or 1 μM) alone or encapsulated in Me-β-cyclodextrin (20 μM) on hormone-independent breast-cancer cell lines (MDA-MB231) after culturing for 96 h. Results are the average value of two independent experiments. Adapted from [137].

No significant difference could be observed between the free and CD-complexed ferrocifens, with their anti-proliferative activities being identical within the precision of their determinations [106, 143]. A similar result was also observed with tamoxifen citrate β-cyclodextrin nanoparticles [144]. It is worth noting that with respect to the association constant determined in MeOH / H₂O, one may also consider that complexes are most likely dissociated at such low concentrations although the polarity (and therefore the association constant) is much higher in pure water. However, since ferrocifens may be delivered intravenously at much more significant doses thanks to the higher solubility of their inclusion complexes compared to the uncomplexed com-

pounds, this opens encouraging routes for more effective formulas of ferrocifens as anti-carcinogenic therapies.

3.2. Interaction with Lipid Bilayers

Our knowledge of the ferrocifen oxidation sequence and the research done on their solubility in aqueous media prompted us to tackle the question of their transportation. Although it is now known that cytotoxic species (quinone methide, quinone imine, ortho-quinone) are formed inside the tumor cell, how do ferrocifens cross the bilipidic cellular membrane? In this context, we started to investigate the interactions of ferrocifens with various hydrophobic molecular architectures (CD cavities, unsubstituted *n*-alkane chains, and lipid bilayers) according to three different approaches (Fig. 30).

The first one consisted of preparing a self-assembled monolayer of a mixture of synthesized *per*-6-thio-β-CD and pentanethiol chains at a gold electrode. In the second one, the gold electrode surface was modified only with alkane thiol monolayers having various lengths. In the third approach, a glassy carbon electrode was modified with a lipid bilayer film (Fig. 30).

The first two approaches clearly showed that ferrocifens strongly interact with non-polar molecular architectures such as the cavity of a cyclodextrin or alkane chains [145]. In the latter case, it was notably shown that the presence of two aromatic rings in the ferrocenyl structure favored its facile penetration through short alkyl chains (C_{*n*}H_{2*n*+1}, *n* ≤ 5).

In the presence of DMPC, it was clearly established that the affinity of the starting neutral ferrocifen derivatives towards the lipid bilayer depends on both their size and their polarity [146]. Conversely, the electrogenerated ferricenium derivatives were expelled reversibly from the bilayer owing to their positive charge. This led to an unsymmetrical redox processes reflecting a different partition of the species between the lipid film and the solution. This typical behavior is illustrated in (Fig. 31) for complex **66**. This figure also displays the accumulation of **66** in the DMPC-modified glassy carbon electrode as a function of time. The corresponding apparent coverage of the electrode was investigated by monitoring the oxidation peak growth as a function of time. As observed in (Fig. 31), compounds **63** and **66** exhibited extremely distinct kinetic features towards their incorporation within the lipid film. Possible favorable interactions between the phenolic hydroxyl group in compound **66** and the polar

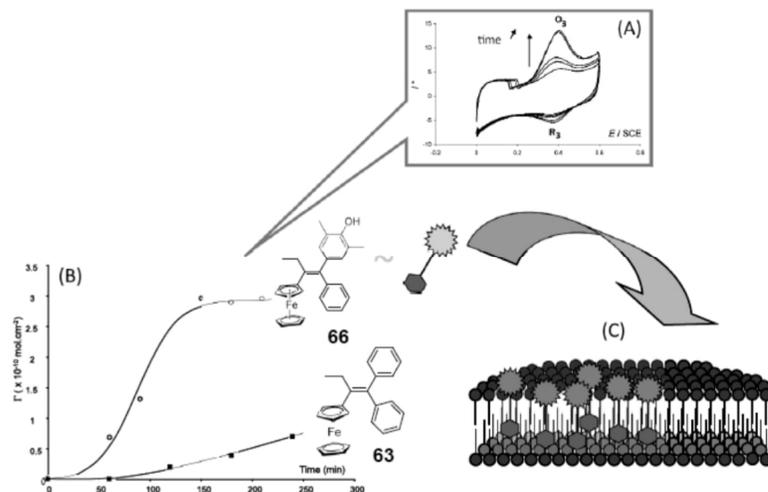


Fig. (31). (A) Cyclic voltammograms of **66** (0.2 mM) recorded at a glassy carbon electrode (3 mm diameter) modified with DMPC film as a function of the equilibration time (0, 45, 90, 150, and 210 minutes) in $\text{H}_2\text{O} + \text{EtOH}$ (20 %) + KCl (0.1 M); $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Evolution of the apparent coverage of the DMPC modified GCE electrode for **66** and **63** (0.2 mM each in EtOH (8/2) + KCl (0.1 M)) as a function of the time of incubation in the corresponding ferrocifen solution. I^* : normalized current, $I^* = I(\mu\text{A}) / C$ (mM). (C) Schematic representation of the lipid bilayer disorganization. Adapted from [146].

extremities of the lipid molecules may explain the faster incorporation of **66** with respect to **63**.

On the other hand, considering the $5.10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ coverage of a surface as a reference for a close-packed layer of comparable ferrocene molecules in SAMs [147], the saturation observed at ca. $3.10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ for compound **66** shows that the loading of **66** in the bilipid film is certainly large enough to drastically disorganize the original bilayer structure. The presence of small molecules such as anesthetics (chloroform for instance) is well known to induce a strong re-organization, *viz.* typically by swelling of membranes [148]. This swelling is in fact at the origin of the anesthetic effect, through increased pressure created on ion-channels crossing the nerves outer membrane. So, a similar behavior cannot be ruled out with ferrocifens.

Interestingly, these results established that within limit, DMPC is a sufficiently correct model of a cell membrane, where large delivery fluxes of ferrocifens are expected to disrupt cell membranes. This may be an important factor to consider in view of side-toxicity of these species at sufficiently high concentrations.

5. FINAL CONSIDERATIONS

Analytical and preparative electrochemical methods appear to provide both qualitatively and quantitatively powerful information (such as thermodynamic and kinetic parameters) that are extremely useful to address the mechanisms involved in biological electron-transfer processes and may be used to help drug design as well as for screen-

ing natural biologically active compounds. The high versatility of electrochemical methodologies allows the mimicking of a large spectrum of biological environments, since the experimental conditions can be widely varied in the attempt to resemble them. The recent advances of *in vitro* and *in vivo* electrochemistry will provide a strong background for the mimicking processes, allowing the design of better models.

In electrochemistry, considerable progress has recently been made in the development of new and rather sophisticated techniques. For instance, the patch-clamp principle was very recently combined with amperometric detection for monitoring fluxes of redox-tagged molecular species across suspended real and model cell membranes [149].

The interface between Electrochemistry and the Life Sciences, naturally, is taking advantage of this progress. The examples herein confirm the potentialities of this interfaced work. However, despite the fact that some interesting concepts have been developed and tried in recent years, most of these approaches and applications are still under consideration and may face some difficulties or limitations in the future. This creates a stimulus to keep working on this interface, and we expect that this review furnished enough information to congregate researchers of different areas to work together on these fascinating topics.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Brazilian agencies CNPq, CAPES, RENORBIO, FAPESP and the Agence Nationale de la Recherche (N° ANR-06-BLAN-0384-01, "FerVect") are greatly acknowledged for research grants and CAPES/COFECUB for initial cooperation between the French and Brazilian groups. Authors also thank CNRS (UMR 8640 & 7576), École Normale Supérieure, École Nationale Supérieure de Chimie Paris, Université Pierre et Marie Curie and the French Ministry of Research for positions and support. Also, the authors wish to acknowledge the important involvement of many of their present and past collaborators, whose names will be found among the following references. The authors thank Prof. Gérard Jaouen and Prof. Anne Vessières (UMR CNRS 7223, Paris) for supplying the ferrocifen complexes synthesized in their laboratory and for this fruitful collaboration. This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMRs 8640 and 7223), the Ministère de la Recherche (MESR), the Ecole Normale Supérieure, Université P. et M. Curie. The authors thank MSc. Leonardo da Silva Vieira for help with the figures.

REFERENCES

- Schafer, F.Q.; Buettner, G.R.; Redox Environment of the Cell as Viewed Through the Redox State of the Glutathione Disulfide/Glutathione Couple. *Free Radical Biol. Med.*, 2001, 30(11), 1191-1212.
- Kovacic, P. Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: Clinical implications. *Medical Hypotheses*, 2007, 69, 510-516.
- de Abreu, F.C.; Ferraz, P.A. de L.; Goulart, M.O.F. Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2002, 13(1), 19-35.
- Hillard, E.A.; De Abreu, F.C.; Ferreira, D.C.M.; Jaouen, G.; Goulart, M.O.F.; Amatore, C. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. *Chem. Commun.*, 2008, 23, 2612-2628.
- Viswanathan, U.M.; Burkholz, T.; Jacob, C. Electrochemistry at the edge of reason: Chalcogen-based Redox Systems in Biochemistry and Drug Design. *Z. Phys. Chem.*, 2013, 227(5), 691-706.
- Kovacic, P.; Somanathan, R. Recent Developments in the Mechanism of Anticancer Agents Based on Electron Transfer, Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2011, 11(7), 658-668.
- Etienne, M.; Moulin, J.-P.; Gourhand, S. Accurate control of the electrode shape for high resolution shear force regulated SECM. *Electrochim. Acta*, 2013, 110, 16-21.
- Bergner, S.; Vatsyayan, P.; Matsysik, F.-M. Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells - A review. *Anal. Chim. Acta*, 2013, 775, 1-13.
- Bard, A.J.; Li, X.; Zhan, W. Chemically imaging living cells by scanning electrochemical microscopy. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 22, 461-472.
- Sun, P.; Laforge, F.O.; Mirkin, M.V. Scanning electrochemical microscopy in the 21st century. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, 9, 802-823.
- Guo, Z.; Yang, F.; Zhang, L.; Zheng, X. Electrogenerated chemiluminescence energy transfer for the label-free detection of DNA. *Sensors Actuat. B*, 2013, 177, 316-321.
- Wei, H.; Wang, E. Electrochemiluminescent Sensors: fabrications and applications. In: *Biosensors: Properties, Materials and Applications*, Nova Science Pub Inc, Ed. Comeaux, R and Novotny, P.; 2009, pp 161-190. ISBN: 978-1-60741-617-3.
- Wang, Y.; Feng, J.; Tan, Z.; Wang, H. Electrochemical impedance spectroscopy aptasensor for ultrasensitive detection of adenosine with dual back filters. *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 60, 218-223.
- Zhu, A.W.; Liu, Y.; Rui, Q.; Tian, Y. Selective and sensitive determination of hydroxyl radicals generated from living cells through an electrochemical impedance method. *Chem. Commun.*, 2011, 47, 4279-4281.
- Ribaut, C.; Reybier, K.; Reynes, O.; Launay, J.; Valentin, A.; Fabre, P.L.; Nepveu, F. Electrochemical impedance spectroscopy to study physiological changes affecting the red blood cell after invasion by malaria parasites. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24(8), 2721-2725.
- Ma, W.; Zhou, H.; Ying, Y.-L.; Li, D.-W.; Chen, G.-R.; Long, Y.-T.; Chen, H.-Y. In situ spectroelectrochemistry and cytotoxic activities of natural ubiquinone Analogues. *Tetrahedron*, 2011, 67(33), 5990-6000.
- Hernández, D. M.; de Moura, M. A. B. F.; Valencia, D. P.; González, F. J.; González, I.; de Abreu, F. C.; da Silva Júnior, E. N.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. V.; Goulart, M. O. F.; Frontana, C. Inner reorganization during the radical biradical transition in a nor-beta-lapachone derivative possessing two redox centers. *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6, 3414-3420.
- Georgina Armendáriz-Vidales, Lindsay S. Hernández-Muñoz, Felipe J. González, Antonio A. De Souza, Fabiane C. De Abreu, Guilherme A. M. Jardim, Eufrânio N. Da Silva Júnior, Marília O. F. Goulart, Carlos Frontana. On the Nature of Electrogenerated Intermediates in Nitro-substituted Nor-beta-lapachones: Unveiling the Structure of Radical Species during Successive Electron Transfer in Multiredox Centers. *J. Org. Chem.*, 2014, 79, 5201-5208.
- Ruan, C.; Shi, W.; Jiang, H.; Sun, Y.; Liu, X.; Zhang, X.; Sun, Z.; Daia, L.; Ge, D. One-pot preparation of glucose biosensor based on polydopamine-graphene composite film modified enzyme electrode. *Sensors Actuat. B*, 2013, 177, 826-832.
- Ispas, C. R.; Crivat, G.; Andreescu, S. Recent Developments In Enzyme-Based Biosensors For Biomedical Analysis. *Anal. Letters*, 2012, 45, 168-186.
- Darwish, N.; Díez-Pérez, I.; Guo, S.; Tao, N. J.; Gooding, J. J.; Paddon-Row, M.N. Single molecule switches: electrochemical gating of a single anthraquinone-based norbornylous bridge molecule. *J. Phys. Chem. C*, 2012, 116, 21093-21097.
- Guoc, S.; Artés, J. M.; Díez-Pérez, I. Electrochemically-gated single-molecule electrical devices. *Electrochimica Acta* 2013, 110, 741-753.
- Raouf, J.B.; Ojani, R.; Golabi, S.M.; Hamidi-Asl, E.; Hejazi, M.S. Preparation of an electrochemical PNA biosensor for detection of target DNA sequence and single nucleotide mutation on p53 tumor suppressor gene corresponding oligonucleotide. *Sensors Actuat. B*, 2011, 157(1), 195-201.
- Silva, F.A.S.; Lopes, C.B.; Kubota, L.T.; Lima, P.R.; Goulart, M.O.F. Poly-xanthurenic acid modified electrodes: An amperometric sensor for the simultaneous determination of ascorbic and uric acids. *Sensors Actuat. B*, 2012, 168, 289-296.
- Barroso, M. F. de-los-Santos-Álvarez, N.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, T.M.B.P.P. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: Electrochemical (bio)sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 30, 1-12.
- Zhang, Y.; Wang, X.; Wang, L.; Yu, M.; Han, X. Interactions of the baicalin and baicalein with bilayer lipid membranes investigated by cyclic voltammetry and UV-Vis spectroscopy. *Bioelectrochem.*, 2014, 95, 29-33.
- Vezvaie, M.; Brosseau, C.L.; Lipkowski, J. Electrochemical SERS study of a biomimetic membrane supported at a nanocavity patterned Ag electrode. *Electrochim. Acta*, 2013, 110, 120-132.
- Ma, W.; Li, D.-W.; Sutherland, T.C.; Li, Y.; Long, Y.-T.; Chen, H.-Y. Reversible Redox of NADH and NAD⁺ at a Hybrid Lipid Bilayer Membrane Using Ubiquinone. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 12366-12369.
- Ma, W.; Long, Y.-T. Quinone/hydroquinone-functionalized bio-interfaces for biological applications from the macro- to nano-scale. *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, 30-41.
- El-Ali, J.; Sorger, P.K.; Jensen, K.F. Cells on chips. *Nature*, 2006, 442, 403-411.
- Chikkaveeriah, B. V.; Soldá, A.; Choudhary, D.; Maran, F.; Rusling, J. F.; Ultrasensitive Nanostructured Immunosensor for Stem and Carcinoma Cell Pluripotency Gatekeeper Protein NANOG. *Nanomedicine*, 2012, 7, 957-965.
- Arechederra, R.L.; Waheed, A.; Sly, W.S.; Minter, S.D. Electrically wired mitochondrial electrodes for measuring mitochondrial function for drug screening. *Analyst* 2011, 136 (18), 3747-3752.
- Ma, W.; Qin L.X.; Liu, F.T.; Gu, Z.; Wang, J.; Pan, Z.G.; James, T.D.; Long, Y.T. Ubiquinone-quantum dot bioconjugates for *in vi-*

- tro and intracellular complex I sensing. *Sci. Rep.*, 2013, 3, Article n. 1537.
- [34] Qin, L. X.; Ma, W.; Li D.W.; Li, Y.; Chen, X. Y.; Kraatz, H. B.; James, T. D. and Long, Y.-T. (): Coenzyme Q Functionalized CdTe/ZnS Quantum Dots for ROS Imaging. *Chemistry - A European Journal*, 2011, 17, 5262-5271.
- [35] Wang, C.; Li, J.; Amatore, C.; Chen, Y.; Jiang, H.; Wang, X.-M. Gold nanoclusters and graphene nanocomposites for drug delivery and imaging of cancer cells. *Angewandte Chemie - Internat. Ed.*, 2011, 50 (49), 11644-11648.
- [36] Almeida, M.O.; Maltarollo, V.G.; De Toledo, R.A.; Shim, H.; Santos, M.C.; Honorio, K.M. Medicinal electrochemistry: Integration of electrochemistry, medicinal chemistry and computational chemistry. *Curr. Med. Chem.*, 2014, 21(20), 2266-2275.
- [37] Calle-Vallejo, F.; Koper, M.T.M. First-principles computational electrochemistry: Achievements and challenges. *Electrochim. Acta*, 2012, 1, 3-11.
- [38] Garrido, E.M.P.J.; Garrido, J.M.P.J.; Esteves, M.; Santos-Silva, A.; Marques, M.P.M.; Borges, F. Voltammetric and DFT studies on vinoxazine: analytical application to pharmaceuticals and biological fluids. *Electroanalysis*, 2008, 20, 1454-1462.
- [39] Otero, T.F.; Martinez, J.G.; Arias-Pardilla, J. Biomimetic electrochemistry from conducting polymers. A review: Artificial muscles, smart membranes, smart drug delivery and computer/neuron interfaces. *Electrochim. Acta*, 2012, 84, 112-128.
- [40] Svirskis, D.; Travas-Sejdic, J.; Rodgers, A.; Garg, S. Electrochemically controlled drug delivery based on intrinsically conducting polymers. *J. Controlled Release*, 2010, 146(1), 6-15.
- [41] Adams, K.L.; Puchades, M.; Ewing, A.G. *In vitro* Electrochemistry of Biological Systems. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2008, 1, 329-355.
- [42] Amatore, C.; Arbault, S.; Bouton, C.; Coffi, K.; Drapier, J.C.; Ghandour, H.; Tong, Y.H. Monitoring in real time with a micro-electrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization. *ChemBiochem.*, 2006, 7(4), 653-661.
- [43] Ferreira, D. C. M.; Tapsoba, I.; Arbault, S.; Bouret, Y.; Alexandre Moreira, M. S.; Ventura Pinto, A.; Goulart, M. O. F.; Amatore, C. Ex vivo Activities of alpha-Lapachone and beta-Lapachone on Macrophages: A Quantitative Pharmacological Analysis Based on Amperometric Monitoring of Oxidative Bursts by Single Cells. *ChemBioChem.*, 2009, 10, 528-538.
- [44] Lu, C.; Heldt, J.-M.; Guille-Collignon, M.; Lemaire, F.; Jaouen, G.; Vessieres, A.; Amatore, C. Quantitative Analyses of ROS and RNS Production in Breast Cancer Cell Lines Incubated with Ferrocenes. *ChemMedChem.*, 2014, 9, 1286-1293.
- [45] Wilson, George S.; Johnson, Michael A. In-vivo electrochemistry: What can we learn about living systems? *Chem. Rev.*, 2008, 108(7), 2462-2481.
- [46] Testa, B.; Kramer, S.D. The Biochemistry of Drug Metabolism- An Introduction Part 5. Metabolism and Bioactivity. *Chem. Biodivers.*, 2009, 6(5), 591-684
- [47] Garrido, J.M.P.J.; Garrido, E.M.P.J.; Oliveira-Brett, A.N.; Borges, F. An Electrochemical Outlook on Tamoxifen Biotransformation: Current and Future Prospects. *Curr Drug Metab.*, 2011, 12(4), 372-82.
- [48] Kalgutkar, A.S.; Gardner, I.; Obach, R.S.; Shaffer, C.L.; Callegari, E.; Henne, K.R.; Mutlib, A.E.; Dalvie, D.K.; Lee, J.S.; Nakai, Y.; O'Donnell, J.P.; Boer, J.; Harriman, S.P. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug Metab.*, 2005, 6, 161-225.
- [49] Lohmann, W.; Karst, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. Strategies, advantages and limitations. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, 79-96.
- [50] Vogel, Martin; Karst, Uwe. Electrochemistry-mass spectrometry: an emerging hyphenated technique for bioanalysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 403(2), 333-334.
- [51] Odiijk, M.; Baumann, A.; Lohmann, W.; van den Brink, F.T.G.; Olthuis, W.; Karst, U.; van den Berg, A. A microfluidic chip for electrochemical conversions in drug metabolism studies. *Lab Chip*, 2009, 9, 1687-1693.
- [52] Lohmann, W.; Baumann, A.; Karst, U. Electrochemistry and LC-MS for metabolite generation and identification: tools, technologies and trends. *LC GC Eur.*, 2010, 23(1), 8-16.
- [53] Brunmark, A.; Cadenas, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Rad. Biol. Med.*, 1989, 7(4), 435-477.
- [54] Reichstein, A.; Vortherms, S.; Bannwitz, S.; Tentrop, J.; Prinz, H.; Müller, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Lapacho Analogues. 1. Suppression of Human Keratinocyte Hyperproliferation by 2-Substituted Naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. Activation by Enzymatic One- and Two-Electron Reduction, and Intracellular Generation of Superoxide. *J. Med. Chem.*, 2012, 55(16), 7273-7284.
- [55] Fitzpatrick, F.A. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int. Immunopharmacol.*, 2001, 1, 1651-1667.
- [56] Anderberg, P.I.; Harding, M.M.; Lay, P.A. The effect of metal ions on the electrochemistry of the antitumor antibiotic streptonigrin. *J. Inorg Biochem.*, 2004, 98(5), 720-726.
- [57] Winterbourn, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.*, 2008, 4(5), 278-286.
- [58] Valderrama, J.A.; Ibañeta, A.; Rodríguez, J.A.; Theoduloz, C.; Benites, J. Studies on quinones. Part 47. Synthesis of novel phenylaminophenanthridinequinones as potential antitumor agent. *Eur J Med Chem.*, 2011, 46(8), 3398-3409.
- [59] Salas, C. O.; Faúndez, M.; Morello, A.; Maya, J. D.; Tapia R. A. Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: an initial step towards new drugs for Chagas disease. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18, 144-161.
- [60] Constantino, L.; Barlocco, D. Privileged structures as leads in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.*, 2006, 13, 65-85.
- [61] Goulart, M. O. F.; Freitas, L. R.; Tonholo, J.; Abreu, F. C.; Raslan, D. S.; Starling, S.; Zani, C. L.; Oliveira, A. B.; Chiari, E. Trypanocidal activity and redox potentials of heterocyclic and 2-hydroxynaphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 1997, 7, 2043-2048.
- [62] Ferreira, F.R.; Ferreira, S.B.; Araújo, A.J.; Marinho Filho, J.D.B.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Costa-Lotuf, L.V.; Montenegro, R. C.; Silva, F.C.; Ferreira, V.F.; da Costa, J.G.; de Abreu, F.C.; Goulart, M.O.F. Arylated α - and β -dihydrofuran naphthoquinones: electrochemical parameters, evaluation of antitumor activity and their correlation. *Electrochim. Acta*, 2013, 110, 634-640.
- [63] Pieretti, S.; Haanstra, J. R.; Mazet, M.; Perozzo, R.; Bergamini, C.; Prati, F.; Fato, R.; Lenaz, G.; Capranico, G.; Brun, R.; Bakker, B. M.; Michels, P. A. M.; Scapozza, L.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A. Naphthoquinone derivatives exert their antitrypanosomal activity via a multi-target mechanism. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013, 7, e2012. 10.1371/journal.pntd.0002012
- [64] Araújo, A. J.; de Souza, A. A.; da Silva Júnior, E. N.; Marinho-Filho, J. B. D.; de Moura, M. A. B. F.; Rocha, D. D.; Vasconcellos, M. C.; Costa, C. O.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O.; Ferreira, V. F.; de Abreu, F. C.; Pinto, A. V.; Montenegro, R. C.; Costa-Lotuf, L. V.; Goulart, M. O. F. Growth inhibitory effects of 3-nitro-3-phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: a redox-dependent mechanism. *Toxicol. in vitro*, 2012, 26, 585-594.
- [65] da Silva Júnior, E. N.; Guimaraes, T. T.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Simone, C. A.; Pessoa, C.; Cavalcanti, B. C.; Sabino, J. R.; Andrade, C. K. Z.; Goulart, M. O. F.; Castro, S. L.; Pinto, A. V. The evaluation of quinoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: synthesis of imidazolic anthraquinones, nor- β -lapachone derivatives and β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18, 3224-3230.
- [66] da Silva Júnior, E. N.; Souza, M. C. B. V.; Fernandes, M. C.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Lopes, F. A.; Simone, C. A.; Andrade, C. K. Z.; Pinto, A. V.; Ferreira, V. F.; Castro, S. L. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 5030-5038.
- [67] da Silva Júnior, E. N.; de Deus, C. F.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; Costa-Lotuf, L. V.; Montenegro, R. C.; de Moraes, M. O.; Pinto, M. C. F. R.; de Simone, C. A.; Ferreira, V. F.; Goulart, M. O. F.; Andrade, C. K. Z.; Pinto, A. V. 3-Arylamino and 3-alkoxy-nor- β -lapachone derivatives: synthesis and cytotoxicity against cancer cell lines. *J. Med. Chem.*, 2010, 53, 504-508.
- [68] Da Silva Júnior, E. N.; De Moura, M.A.B.F.; Pinto, A. V.; Pinto, M.C.F.R.; Souza, M. C. B. V.; Araújo A. J.; Pessoa, C.; Costa-Lotuf, L. V.; Montenegro, R.; De Moraes, M.O.; Goulart, M.O.F.; Ferreira, V.F. Cytotoxic, Trypanocidal Activities and Physicochemical Parameters of nor-beta-Lapachone-based 1,2,3-Triazoles. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2009, 20, 635-643.
- [69] Valko, M.; Leibfriz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazura, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological

- functions and human disease. *The Internat. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, 39, 44-84.
- [70] Shaaban, S.; Diestel, R.; Hinkelmann, B.; Muthukumar, Y.; Verma, R. P.; Sasse, F.; Jacob, C. Novel peptidomimetic compounds containing redox active chalcogens and quinones as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 58, 192-205.
- [71] Pelicano, H.; Carney, D.; Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updates*, 2004, 7, 97-110.
- [72] Jamier, V.; Ba, L. A.; Jacob, C. Selenium- and Tellurium-Containing Multifunctional Redox Agents as Biochemical Redox Modulators with Selective Cytotoxicity. *Chem Eur. J.*, 2010, 16, 10920-10928.
- [73] Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2009, 8, 579-591.
- [74] Fry, F.H.; Holme, A. L.; Giles, N.M.; Giles, G. I.; Collins, C.; Holt, K.; Pariagh, S.; Gelbrich, T.; Hursthouse, M. B.; Gutowski, N.J.; Jacob, C. Multifunctional redox catalysts as selective enhancers of oxidative stress. *Org. Biomol. Chem.* 2005, 3, 2579-2587.
- [75] Nogueira V., Hay N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res.*, 2013, 19(16), 4309-4314.
- [76] Kongkathip, N., Kongkathip, B., Siripong, P., Sangma, C., Luangkamin, S., Niyomdechana, M., Pattanapa, S., Piyaviriyagul, S., and Kongsaree, P. Potent Antitumor Activity of Synthetic 1,2-Naphthoquinones and 1,4-Naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11, 3179-3191.
- [77] da Silva Júnior, E. N., de Souza, M. C. B. V., Pinto, A. V., Pinto, M. C. F. R., Goulart, M. O. F., Barros, F. W. A., Pessoa, C., Costa-Lotuf, L. V., Montenegro, R. C., de Moraes, M. O., and Ferreira, V. F. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor- β -lapachone and nor- α -lapachone. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 7035-7041.
- [78] Cavalcanti, B.C.; Barros, F. W. A.; Cabral, I.; Ferreira, J.; Magalhães, H.; Hélio Júnior, H.; da Silva Júnior, E.N.; de Abreu, F.C.; Costa, C. O.; Goulart, M.O.F.; Moraes, M.O.; Pessoa, C. Preclinical genotoxicology of nor-beta-lapachone in human cultured lymphocytes and Chinese hamster lung fibroblasts. *Chem. Res. Toxicol.*, 2011, 24, 1560-1574.
- [79] De Souza, A. A. Estudos bioeletroquímicos de nitroquinonas derivadas da Nor- β -Lapachona. PhD Thesis, Federal University of A-lagoas: Maceió, August 2012.
- [80] Koyama, J.; Morita I.; Yamori T. Correlation between cytotoxic activities and reduction potentials of heterocyclic quinones. *Molecules*, 2010, 15(9), 6559-6569.
- [81] De Paiva, Y. G.; Pinho Jr., W.; De Souza, A. A. Silva, F. P. L. Lima-Junior, C. G.; Vasconcellos, M.L.L.A.; Goulart, M. O. F. Electrochemical and computational studies, in protic medium, of Morita-Baylis-Hillman adducts and correlation with leishmanicidal activity. *Electrochim. Acta.* 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.05.066>
- [82] Guimarães, E.; Hussene, C.; Dias, G. G.; Diogo, E. B. T.; De Melo, I. M. M.; Rodrigues, B. L.; Valença; W. O.; Camara, C. A.; Da Silva, M. G.; de Oliveira, R. N.; de Paiva, Y. G.; Goulart, M. O. F.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; Da Silva Junior, E. N. 1,2,3-Triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: Potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones. *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, 22, 1608-1619.
- [83] Diogo, E. B. T.; Dias, G. G.; Rodrigues, B. L.; Guimarães, T. T.; Valença, W. O.; Camara, C. A.; de Oliveira, R. N.; da Silva, M. G.; Ferreira, V. F.; de Paiva, Y.G.; Goulart, M. O. F.; Menna-Barreto, R.F. S.; de Castro, S. L.; da Silva Júnior, E.N. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Naphthoquinone-containing Triazoles: Electrochemical studies on the effects of the quinoidal moiety. *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21, 6337 - 6348.
- [84] Costa, C.O.; Costa, E.O.; Ferreira, F.R.; Viana, L.S.; Silva, F.S.S.; de Abreu, F.C.; Figueiredo, I.M.; Pinho Jr., W.; Benito, E. S.; Lemos, T.L.G.; Pessoa, O.D.L.; Aguilera-Venegas, B.; Norambuena, E.; Olea-Azar, C.; Goulart, M.O.F. Oncocalyxone A: Electrochemical, Spectroscopic Investigation and Studies of its Interaction with DNA, nucleobases and N-acetylcysteine. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, 23, 1174-1185.
- [85] De Paiva, Y.G.; Souza, A. A.; Lima-Junior, C.G.; Silva, F.P.L.; Filho, E. B. A.; Vasconcelos, C.C.; de Abreu, F.C.; Goulart, M. O. F.; Vasconcellos, M.L.L.A. Correlation between electrochemical and theoretical studies on the leishmanicidal activity of two Morita-Baylis-Hillman adducts. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, 23, 894-904.
- [86] Jimenez-Alonso, S.; Guasch, J.; Estevez-Braun, A.; Ratera, I.; Veciana J.; Ravelo, Angel G. Electronic and Cytotoxic Properties of 2-Amino-naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. *J. Org. Chem.*, 2011, 76, 1634-1643.
- [87] da Silva, G.B.; Amanda P. Neves, A.P.; Vargas, M.D.; Alves, W.A.; Marinho-Filho, J. D. B.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotuf, L. V. Novel 3-(Aminomethyl)naphthoquinone Mannich Base-Platinum(IV) Complexes: Synthesis, Characterization, Electrochemical and Cytotoxic Studies. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2013, 24, 675-684.
- [88] Bardon, S.; Vignon, F.; Derocq, D.; Rochefort, H. The antiproliferative effect of tamoxifen in breast-cancer cells - mediation by the estrogen-receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1984, 35, 89-96.
- [89] Jordan, V.C. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. Receptor interactions. *J. Med. Chem.*, 2003, 46(6), 883-908
- [90] Jordan, V.C. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. *J. Med. Chem.*, 2003, 46(7), 1081-1111.
- [91] Marshall, E. Tamoxifen- 'A big deal', but a complex hand to play. *Science*, 1998, 280, 196-196.
- [92] Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2012, 62, 10-29.
- [93] Jakupec, M.A.; Galanski, M.; Arion, V.B.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K. Antitumor metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.*, 2008, 2, 183-194.
- [94] Dyson, P.J.; Sava, G. Metal-based antitumor drugs in the post genomic era. *Dalton Trans.*, 2006, 1929-1933 and references therein.
- [95] Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. Organometallic Anticancer Compounds. *J. Med. Chem.*, 2011, 54, 3-25.
- [96] (a) Top, S.; Tang, J.; Vessières, A.; Carrez, D.; Provot, C.; Jaouen, G. Ferrocenyl hydroxytamoxifen: A prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. *Chem. Commun.*, 1996, 955-956. (b) Top, S.; Vessières, A.; Cabestaing, C.; Laios, I.; Leclercq, G.; Provot, C.; Jaouen, G. Studies on organometallic selective estrogen receptor modulators. (SERMs) Dual activity in the hydroxy-ferrocifen series. *J. Organomet. Chem.*, 2001, 637, 500-506.
- [97] Jaouen, G.; Top, S.; Vessières, A.; Leclercq, G.; Quivy, J.; Jin, L.; Croisy, A. The first organometallic antioestrogens and their antiproliferative effects. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série IIc, Chimie/Chemistry* 3, 2000, 3(2), 89-93.
- [98] Jaouen, G.; Top, S.; Vessières, A.; Leclercq, G.; McGlinchey, M.J. The first organometallic selective estrogen receptor modulators (SERMs) and their relevance to breast cancer. *Curr. Med. Chem.*, 2004, 11, 2505-2517.
- [99] Zanellato, I.; Heldt, J.M.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Osella, D. Antiproliferative effect of ferrocifen drug candidates on malignant pleural mesothelioma cell lines. *Inorg. Chim. Acta.*, 2009, 362, 4037-4042.
- [100] Michard, Q.; Jaouen, G.; Vessières, A.; Bernard, B.A. Evaluation of cytotoxic properties of organometallic ferrocifens on melanocytes, primary and metastatic melanoma cell lines. *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102, 1980-1985.
- [101] Heilmann, J.B.; Hillard, E.A.; Plamont, M.-A.; Pigeon, P.; Bolte, M.; Jaouen, G.; Vessières, A. Ferrocenyl compounds possessing protected phenol and thiophenol groups: Synthesis, X-ray structure, and *in vitro* biological effects against breast cancer. *J. Organomet. Chem.*, 2008, 693, 1716-1722.
- [102] (a) Nguyen, A.; Vessières, A.; Hillard, E.A.; Top, S.; Pigeon, P.; Jaouen, G. Ferrocifens and ferrocifenols as new potential weapons against breast cancer. *Chimia*, 2007, 61, 716-724; (b) Nguyen, A.; Top, S.; Pigeon, P.; Vessières, A.; Hillard, E.A.; Plamont, M.-A.; Huché, M.; Rigamonti, C.; Jaouen, G. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Ferrocenyl Tamoxifen Derivatives with Modified Side Chains. *Chem. Eur. J.*, 2009, 15, 684-696.
- [103] Yao, D.; Zhang, F.G.; Yu, L.N.; Yang, Y.N.; van Breemen, R.B.; Bolton, J.L. Synthesis and reactivity of potential toxic metabolites of tamoxifen analogues: Drololixifene and toremifene o-quinones. *Chem. Res. Toxicol.*, 2001, 14, 1643-1653.

- [104] Köpf-Maier, P.; Köpf, H.; Neuse, E.W. Ferrocenium salts- the 1st antineoplastic iron compounds. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1984, 23, 456-457.
- [105] (a) Fan, P.W.; Zhang, F.; Bolton, J.L. 4-hydroxylated metabolites of the antiestrogens tamoxifen and toremifene are metabolized to unusually stable quinone methides. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, 13(1), 45-52; b) Zhang, F.; Fan, P.W.; Liu, X.; Shen, L.; van Breeman, R.B.; Bolton, J.L. Synthesis and reactivity of a potential carcinogenic metabolite of tamoxifen: 3,4-dihydroxytamoxifen-o-quinone. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, 13(1), 53-62; c) Dehal, S.S.; Kupfer, D. CYP2D6 catalyzes tamoxifen 4-hydroxylation in human liver. *Cancer Res.*, 1997, 57(16), 3402-3406; d) Hardcastle, I.R.; Horton, M.N.; Osborne, M.R.; Hewer, A.; Jarman, M.; Phillips, D.H. Synthesis and DNA reactivity of alpha-hydroxylated metabolites of nonsteroidal antiestrogens. *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, 11(4), 369-374; e) Shibutani, S.; Desaradhi, L.; Terashima, I.; Banoglu, E.; Duffel, M.W. Alpha-hydroxytamoxifen is a substrate of hydroxysteroid (alcohol) sulfotransferase, resulting in tamoxifen DNA adducts. *Cancer Res.*, 1998, 58(4), 647-653; f) Dasaradhi, L.; Shibutani, S. Identification of tamoxifen-DNA adducts formed by alpha-sulfate tamoxifen and alpha-acetoxytamoxifen. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, 10(2), 189-196.
- [106] Vessières, A.; Top, S.; Pigeon, P.; Hillard, E.A.; Boubeker, L.; Spera, D.; Jaouen, G. Modification of the estrogenic properties of diphenols by the incorporation of ferrocene. Generation of antiproliferative effects *in vitro*. *J. Med. Chem.*, 2005, 48(12), 3937-3940.
- [107] Hillard, E.A.; Vessières, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006, 45(2), 285-290.
- [108] Schlesener, C.J.; Amatore, C.; Kochi, J.K. Rates and mechanism of proton-transfer from transient carbon acids - the acidities of methylbenzene cations. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 7472-7482.
- [109] (a) Ott, I.; Kowalski, K.; Gust, R.; Maurer, J.; Mücke, P.; Winter, R.F. Comparative biological evaluation of two ethylene linked mixed binuclear ferrocene/ruthenium organometallic species. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20, 866-869; b) Kowalski, K.; Linsies, M.; Winter, R.F.; Zabel, M.; Zališ, S.; Kelm, H.; Krüger, H.-J.; Sarkar, B.; Kaim, W. Charge delocalization in a heterobimetallic ferrocene-(vinyl)Ru(CO)-Cl(PPr₃)₂ system. *Organometallics.*, 2009, 28(14), 4196-4209.
- [110] Amatore, C.; Bayachou, M.; Boutejougout, F.; Verpeaux, J.N. Evidence for the generation of alpha-alkoxy and alpha-alkylthioalkyl radicals upon reduction of alpha-functionalized alkyl phenyl sulfones - investigation of the reduction-mechanism by electrochemistry. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1993, 130, 371-381.
- [111] Tan, Y.L.K.; Pigeon, P.; Top, S.; Labbé, E.; Buriez, O.; Hillard, E.A.; Vessières, A.; Amatore, C.; Leong, W.K.; Jaouen, G. Ferrocenyl catechols: synthesis, oxidation chemistry and antiproliferative effects on MDA-MB-231 breast cancer cells. *Dalton Trans.*, 2012, 41, 7537-7549.
- [112] Ferreira, D.C.M.; Tapsoba, I.; Arbault, S.; Bouret, Y.; Moreira, M.S.A.; Pinto, A.V.; Goulart, M.O.F.; Amatore, C. Ex vivo Activities of beta-Lapachone and alpha-Lapachone on Macrophages: A Quantitative Pharmacological Analysis Based on Amperometric Monitoring of Oxidative Bursts by Single Cells. *Chembiochem.*, 2009, 10(3), 528-538.
- [113] Pigeon, P.; Top, S.; Zekri, O.; Hillard, E.A.; Vessières, A.; Plamont, M.-A.; Buriez, O.; Labbé, E.; Huché, M.; Boutamine, S.; Amatore, C.; Jaouen, G. The replacement of a phenol group by an aniline or acetanilide group enhances the cytotoxicity of 2-ferrocenyl-1,1-diphenyl-but-1-ene compounds against breast cancer cells. *J. Organomet. Chem.*, 2009, 694, 895-901.
- [114] Buriez, O.; Labbé, E.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; Amatore, C. Electrochemical attachment of a conjugated amino-ferrocifen complex onto carbon and metal surfaces. *J. Electroanal. Chem.*, 2008, 169-175.
- [115] Buriez, O.; Podvorica, F.I.; Galtayries, A.; Labbé, E.; Top, S.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Combellas, C.; Amatore, C. Surface grafting of a pi-conjugated amino-ferrocifen drug. *J. Electroanal. Chem.*, 2013, 699, 21-27.
- [116] Barbier, B.; Pinson, J.; Désarmot, G.; Sanchez, M. Electrochemical bonding of amines to carbon- fiber surfaces toward improved carbon- epoxy composites. *J. Electrochem. Soc.*, 1990, 137(6), 1757-1764.
- [117] Holm, A.H.; Vase, K.H.; Winther-Jensen, B.; Pedersen, S.U.; Daasbjerg, K. Evaluation of various strategies to formation of pH responsive hydroquinone-terminated films on carbon electrodes. *Electrochim. Acta*, 2007, 53(4), 1680-1688.
- [118] Liu, J.; Cheng, L.; Liu, B.; Dong, S. Covalent modification of a glassy carbon surface by 4-aminobenzoic acid and its application in fabrication of a polyoxometalates-consisting monolayer and multilayer films. *Langmuir*, 2000, 16(19), 7471-7476.
- [119] Huijzer, J.C.; Adams, D.; Yost, G.S. Decreased pneumotoxicity of deuterated 3-methylindole- bioactivation requires methyl c-h bond breakage. *Tox. Appl. Pharm.*, 1987, 90(1), 60-68.
- [120] Nocerini, M.R.; Yost, G.S.; Carlson, J.R.; Liberato, D.J.; Breeze, R.G. Structure of the glutathione adduct of activated 3-methylindole indicates that an imine methide is the electrophilic intermediate. *Drug Metab. Dispos.*, 1985, 13(6), 690-694.
- [121] Charmantray, F.; Duflos, A.; Lhommea, J.; Demeunynck, M. Synthesis and study of 4-hydroxymethyl-3-(alkylamino) acridines as models of a new class of DNA-intercalating-alkylating agents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 2962-2968.
- [122] Powers, J.C.; Oleksyszyn, J.; Narasimhan, S.L.; Kam, C.-M.; Radhakrishnan, R.; Meyer, J.E.F. Reaction of porcine pancreatic elastase with 7-substituted 3-alkoxy-4-chloroisocoumarins - design of potent inhibitors using the crystal-structure of the complex formed with 4-chloro-3-ethoxy-7-guanidinoisocoumarin. *Biochemistry*, 1990, 29(12), 3108-3118.
- [123] Chow, M.M.; Meyer, E. F.; Bode, W.; Kam, C.-M.; Radhakrishnan, R.; Vijayalakshmi, J.; Powers, J.C. The 2.2-Å resolution x-ray crystal-structure of the complex of trypsin inhibited by 4-chloro-3-ethoxy-7-guanidinoisocoumarin - a proposed model of the thrombin inhibitor complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112(21), 7783-7789.
- [124] Powers, J.C.; Kam, C.-M.; Narasimhan, L.; Oleksyszyn, J.; Hernandez, M.A.; Ueda, T. Mechanism-based isocoumarin inhibitors for serine proteases: Use of active site structure and substrate specificity in inhibitor design. *J. Cell Biochem.*, 1989, 39(1), 33-46.
- [125] Smith, K.S.; Smith, P.L.; Heady, T.N.; Trugman, J.M.; Harman, W.D.; Macdonald, T.L. *In vitro* metabolism of tolecapone to reactive intermediates: Relevance to tolecapone liver toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 2003, 16(2), 123.
- [126] Bose, R.; Ahmad, A.R.; Dicks, A.P.; Novak, M.; Kayser, K.J.; McClelland, R.A. Spectroscopic characterization by laser flash photolysis of electrophilic intermediates derived from 4-aminostilbenes. Stilbene "nitrenium" ions and quinone methide imines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1999, 1591-1599.
- [127] Morao, I.A.; Hillier, I.H. Magnetic analysis (NICS) of monoarlic cations. Linear relationship between aromaticity and Hammett constants (sigma(+)(p)). *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42, 4429-4431.
- [128] Plazuk, D.; Vessières, A.; Hillard, E.A.; Buriez, O.; Labbé, E.; Pigeon, P.; Plamont, M.-A.; Amatore, C.; Zakrzewski, J.; Jaouen, G. A [3]Ferrocenophane Polyphenol Showing a Remarkable Antiproliferative Activity on Breast and Prostate Cancer Cell Lines. *J. Med. Chem.*, 2009, 52(15), 4964-4967.
- [129] Hisatome, M.; Watanabe, J.; Yamakawa, K. Selective oxidation of the alpha-methylene of the bridge in ferrocenophanes with silver-oxide or silver perchlorate sodium methoxide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1994, 67, 280-283.
- [130] Messina, P.; Labbé, E.; Buriez, O.; Hillard, E.A.; Vessières, A.; Hamels, D.; Top, S.; Jaouen, G.; Frapart, Y.M.; Mansuy, D.; Amatore, C. Deciphering the Activation Sequence of Ferrocenyl Anticancer Drug Candidates. *Chem. Eur. J.*, 2012, 18, 6581-6587.
- [131] Richard, L.S.; Bernardes, C.E.S.; Diogo, H.P.; Leal, J.P.; da Piedade, M.E.M. Energetics of cresols and of methylphenoxy radicals. *J. Phys. Chem. A*, 2007, 111, 8741-8748.
- [132] Hamels, D.; Dansette, P.M.; Hillard, E.A.; Top, S.; Vessières, A.; Herson, P.; Jaouen, G.; Mansuy, D. Ferrocenyl Quinone Methides as Strong Antiproliferative Agents: Formation by Metabolic and Chemical Oxidation of Ferrocenyl Phenols. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 9124-9126.
- [133] Amatore, C.; Arbault, S.; Guille, M.; Lemaitre, F. Electrochemical monitoring of single cell secretion: Vesicular exocytosis and oxidative stress. *Chem. Rev.*, 2008, 108, 2585-2621.
- [134] Nguyen, A.; Marsaud, V.; Bouclier, C.; Top, S.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Gref, R.; Legrand, P.; Jaouen, G.; Renoir, J.-M. Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment. *Int. J. Pharm.*, 2008, 347, 128-135.

*Redox Activation of Quinones and Ferrocifens**Current Topics in Medicinal Chemistry, 2015, Vol. 15, No. 2 27*

- [135] Allard, E.; Huynh, N. T.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; Benoit, J. P.; Passirani, C. Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model. *Int. J. Pharm.*, 2009, 379, 317-323.
- [136] Allard, E.; Passirani, C.; Garcion, E.; Pigeon, P.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J. Controlled Release*, 2008, 130, 146-153.
- [137] Buriez, O.; Heldt, J. M.; Labbé, E.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Amatore, C. Reactivity and Antiproliferative Activity of Ferrocenyl-Tamoxifen Adducts with Cyclodextrins against Hormone-Independent Breast-Cancer Cell Lines. *Chem. Eur. J.*, 2008, 14, 8195-8203.
- [138] Matsue, T.; Evans, D.H.; Osa, T.; Kobayashi, N. Electron-transfer reactions associated with host guest complexation- oxidation of ferrocenecarboxylic acid in the presence of beta-cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 3411-3417.
- [139] Lewis, E.A.; Hansen, L.D. Thermodynamics of binding of guest molecules to alpha-cyclodextrins and beta-cyclodextrins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1973, 2, 2081-2085.
- [140] Cardona, C.M.; Mendoza, S.; Kaifer, A.E. Electrochemistry of encapsulated redox centers *Chem. Soc. Rev.*, 2000, 29, 37-42, and references cited therein.
- [141] Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.*, 1998, 98, 1743-1753.
- [142] Guitet, M.; Zhang, P.L.; Marcelo, F.; Tugny, C.; Jimenez-Barbero, J.; Buriez, O.; Amatore, C.; Mouries-Mansuy, V.; Goddard, J.P.; Fensterbank, L.; Zhang, Y.M.; Roland, S.; Menand, M.; Sollogoub, M. NHC-Capped Cyclodextrins (ICyDs): Insulated Metal Complexes, Commutable Multicoordination Sphere, and Cavity-Dependent Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 7213-7218.
- [143] Hillard, E.A.; Vessières, A.; Le Bideau, F.; Plazuk, D.; Spera, D.; Huché, M.; Jaouen, G. A series of unconjugated ferrocenyl phenols: Prospects as anticancer agents. *Chem. Med. Chem.*, 2006, 1, 551-559.
- [144] Memisoglu-Bilensoy, E.; Vural, I.; Bochot, A.; Renoir, J.M.; Duchene, D.; Hincal, A.A. Tamoxifen citrate loaded amphiphilic beta-cyclodextrin nanoparticles: *In vitro* characterization and cytotoxicity. *J. Controlled Release*, 2005, 104, 489-496.
- [145] Mertins, O.; Buriez, O.; Labbé, E.; Fang, P.-P.; Hillard, E.A.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Tian, Z.Q.; Amatore, C. Further insights into hydrophobic interactions between ferrocenyl-tamoxifen drugs and non-polar molecular architectures at electrode surfaces. *J. Electroanal. Chem.*, 2009, 635, 13-19.
- [146] Mertins, O.; Messina, P.; Labbé, E.; Vivier, V.; Arbault, S.; Lemaître, F.; Buriez, O.; Amatore, C. Electrochemical analysis of the interactions and reactivity of ferrocene-based drugs with a lipid environment: A qualitative overview. *Inorg. Chim. Acta*, 2011, 374, 59-68.
- [147] Kondo, T.; Kanai, T.; Uosaki, K. Control of the charge-transfer rate at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer containing ferrocene and azobenzene by electro- and photochemical structural conversion of cis and trans forms of the azobenzene moiety. *Langmuir*, 2001, 17, 6317-6324.
- [148] Inoue, T.; Kamaya, H.; Ueda, I. Stopped-flow study of anesthetic effect on water-transport kinetics through phospholipid-membranes - interfacial versus lipid core ligands. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 812, 393-401.
- [149] Messina, P.; Lemaître, F.; Huet, F.; Ngo, K.A.; Vivier, V.; Labbé, E.; Buriez, O.; Amatore, C. Monitoring and quantifying the passive transport of molecules through patch-clamp suspended real and model cell membranes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 3192-3196.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of naphthoquinone-containing triazoles: Electrochemical studies on the effects of the quinoidal moiety



Emilay B. T. Diogo^a, Gleiston G. Dias^a, Bernardo L. Rodrigues^a, Tiago T. Guimarães^b, Wagner O. Valença^c, Celso A. Camara^c, Ronaldo N. de Oliveira^c, Mauro G. da Silva^d, Vitor F. Ferreira^e, Yen Galdino de Paiva^f, Marília O. F. Goulart^f, Rubem F. S. Menna-Barreto^g, Solange L. de Castro^g, Eufrânio N. da Silva Júnior^{a,*}

^aInstituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^bNúcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ, 21941-971 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cDepartamento de Ciências Moleculares, UFRPE, 52171-900 Recife, PE, Brazil

^dUniversidade Federal de Pernambuco, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^eInstituto de Química, UFF, 24020-150 Niterói, RJ, Brazil

^fInstituto de Química e Biotecnologia, UFAL, Tabuleiro do Martins, 57072-970 Maceió, AL, Brazil

^gLaboratório de Biologia Celular, IOC, FIOCRUZ, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2013

Revised 18 August 2013

Accepted 26 August 2013

Available online 6 September 2013

Keywords:

Lapachol

β -Lapachone

Quinone

Chagas disease

Trypomastigote

Click chemistry

Electrochemical parameters

ABSTRACT

In our continued search for novel trypanocidal compounds, twenty-six derivatives of *para*- and *ortho*-naphthoquinones coupled to 1,2,3-triazoles were synthesized. These compounds were evaluated against the infective bloodstream form of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. Compounds **17–24**, **28–30** and **36–38** are described herein for the first time. Three of these novel compounds (**28–30**) were found to be more potent than the standard drug benznidazole, with $IC_{50}/24\text{ h}$ values between 6.8 and 80.8 μM . Analysis of the toxicity to heart muscle cells led to $LC_{50}/24\text{ h}$ of <125, 63.1 and 281.6 μM for **28**, **29** and **30**, respectively. Displaying a selectivity index of 34.3, compound **30** will be further evaluated *in vivo*. The electrochemical properties of selected compounds were evaluated in an attempt to find correlations with trypanocidal activity, and it was observed that more electrophilic quinones were generally more potent.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease (CD) is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects approximately eight million individuals in Latin America. Approximately 30–40% of these patients have, or will develop, cardiomyopathy, digestive mega-syndromes, or both.¹ Although vectorial (*Triatoma infestans*) and transfusional transmission of CD have declined steadily as a result of multinational initiatives,² this disease can also be orally transmitted through the ingestion of food or liquid contaminated with *T. cruzi*. This route of transmission is the cause of regional outbreaks of acute infection in areas devoid of domiciled insect vectors.³ Several outbreaks of severe acute CD, each numbering in the hundreds of cases, have been reported in the Amazon Region in recent decades.⁴ Most of these outbreaks were the result of oral transmission. The emer-

gence of CD in non-endemic areas, such as North America and Europe, is another major concern. This development is due to the immigration of infected individuals and subsequent transmission via the blood, organ transplantation and congenital routes.^{5,6} Other challenges remaining to be overcome in the fight against CD include the development of sustainable public health policies, vector control strategies and educational approaches.^{7,8}

CD is characterized by a short acute phase defined by patent parasitemia followed by a long and progressive chronic phase. Up to 40–50% of chronically infected patients develop progressive cardiomyopathy, motility disturbances of the esophagus and colon, or all of these symptoms. CD is the most severe parasitic infection of the heart, which is the organ most often affected in chronic patients.¹ The available chemotherapy for CD is not satisfactory and depends on two nitroheterocyclic agents: the 5-nitrofurantoin nifurtimox and the 2-nitroimidazole benznidazole. These compounds are effective against acute infections, but they show poor activity in the later chronic phase. These drugs also cause severe off-target

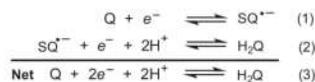
* Corresponding author. Tel.: +55 31 34095720; fax: +55 31 34095700.
E-mail address: eufranio@ufmg.br (E.N. da Silva Júnior).

effects, have limited efficacy against different parasite isolates and must be applied in long-term therapy. These drawbacks justify the urgent effort to identify better drugs for the treatment of CD.^{9,10} Nearly all current drug development efforts for CD are in the pre-clinical research phase, although Phase II clinical trials with the antifungal drug posaconazole are underway in Latin America and Spain. A ravuconazole prodrug is also undergoing Phase II studies in Bolivia.¹¹

Plants represent a vast reservoir of phytoconstituents and secondary metabolites that can be used as templates for the design of semi-synthetic or synthetic compounds. This approach can lead to the discovery of new candidates for the treatment of neglected tropical diseases with high therapeutic indices. Naphthoquinones account for the majority of naturally occurring naphthalenes,¹² displaying an assortment of substituents over a variety of structural motifs. They act as vital links in the electron transport chains of metabolic pathways and participate in multiple biologically relevant oxidative processes.¹³

Naphthoquinones are considered privileged scaffolds in medicinal chemistry due to their structural properties and biological activities,¹⁴ especially against tumor cells and pathogenic protozoa.¹⁵ We have recently described the synthesis and trypanocidal and leishmanicidal activities of 1,2,3-triazoles based on the lapachone scaffold.^{16,17a} Modification of the prototype β -lapachone, as shown in Scheme 1, is a relevant strategy for the development of novel bioactive compounds. The C-ring was modified to afford nor- β -lapachone and β -lapachone derivatives with pronounced activity against trypanostigote forms of *T. cruzi*.¹⁶ Other derivatives can be prepared by modification of the redox centre and the C-ring, as described in Scheme 1: arylamino derivatives of nor- β -lapachone, imidazoles and oxiranes are important examples of this strategy.^{16–18} Recently, nor- α -lapachone and α -lapachone derivatives were also prepared and shown to have potent activity against promastigote forms of antimony-sensitive and -resistant strains of *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) and *L. amazonensis*.^{17a}

Several studies have investigated and reported the electrochemical behavior of quinones. Some correlation has been demonstrated between electrochemical parameters and disease states.¹⁹ The quinone/semiquinone/hydroquinone (Q/SQ⁻/H₂Q) triad is an important component of many redox systems in biology. It is a vital link in the transfer of electrons through cells and tissues (Eqs. 1–3).²⁰

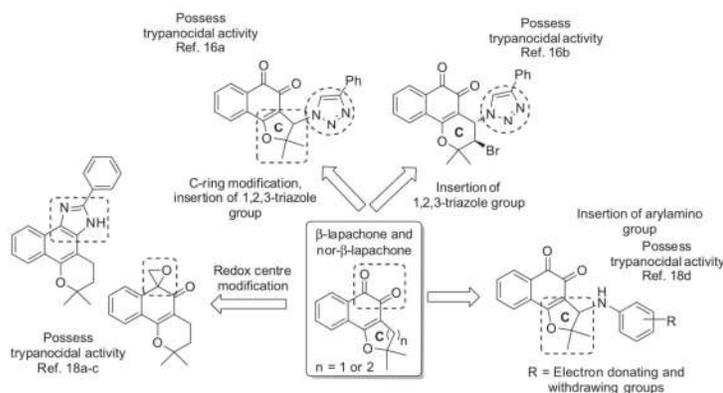


Electrochemical techniques have been used extensively to provide excellent insights into the modes of action of various drugs, and these results can inspire the design of next-generation therapeutics. This approach is particularly suitable for diseases associated with cellular oxidative stress, which is a hallmark of cancer.^{19–21} Electrochemistry experiments can provide data on the fundamental thermodynamic and kinetic properties associated with the reactions of quinones and reduced intermediates.

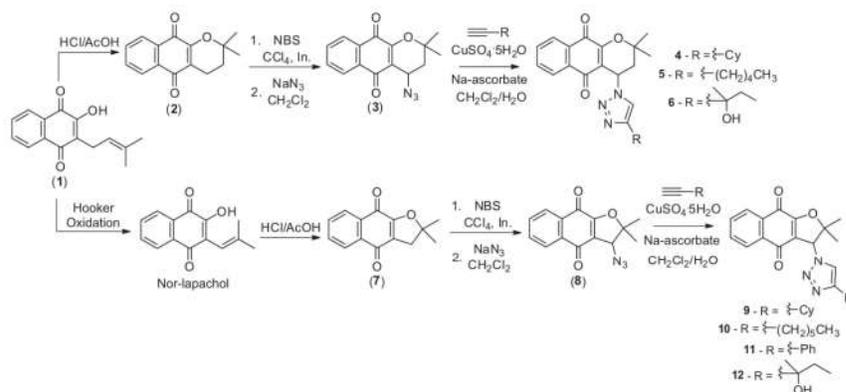
The versatility and functional diversity of quinones are due primarily to the diverse mid-point potentials that are sensitive to substituent effects, solvent and medium effects (hydrophilic/lipophilic) and interactions with certain macromolecules (e.g., DNA and proteins). The electronic properties of quinones are influenced by substituent groups, hydrogen bonding (H-bonding), hydrophobic and π -stacking interactions and conformational effects. These factors act in tandem to stabilize or destabilize the semiquinone radical (under aprotic conditions or during enzymatic one-electron transfer). They can be correlated to the nature of the anion radical that is formed in vivo or to the completely reduced species (hydroquinones or modified derivatives).^{19b,21}

In this context, we herein describe the synthesis of *para*- and *ortho*-naphthoquinones bearing 1,2,3-triazole substituents, as well as 1,2,3-triazoles derived from α -lapachone and nor- α -lapachone. These compounds were evaluated for activity against trypanostigote forms of *T. cruzi*. Electrochemical studies of selected compounds are also presented.

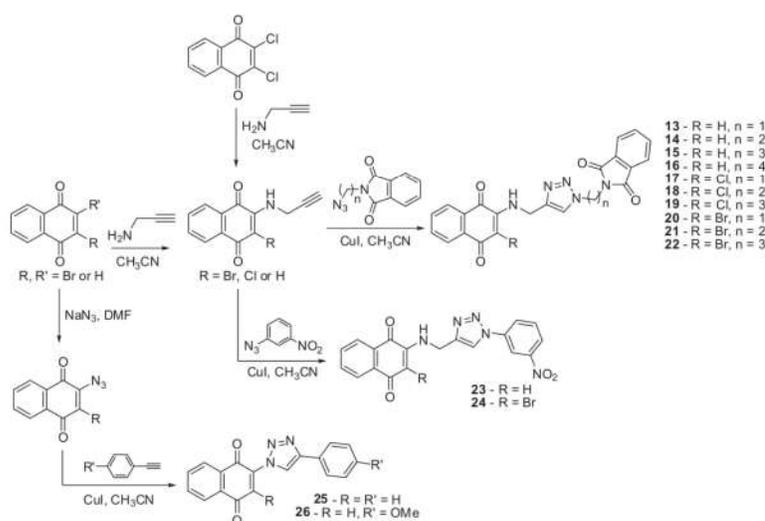
Our synthetic rationale was to combine *para* and *ortho* quinoidal moieties with heterocycles (Schemes 2–4). Derivatives of *N*-phthalimide have been shown to have biological significance, including antibacterial,²² antiviral,²³ anticancer²⁴ and anti-hepatitis activity.²⁵ Based on the pharmacological importance of phthalimide analogues, we synthesized hybrids of 1,4-naphthoquinone and *N*-phthalimide conjugated through an aminomethyl-triazole linkage. The introduction of a second quinoidal moiety was also accomplished (Scheme 4) in a hybrid approach to duplicate the effect of the quinone. Finally, the importance of the redox centre was analyzed by modifying the structure of



Scheme 1. Structural modification of the prototype β -lapachone and nor- β -lapachone.



Scheme 2. α -Lapachone- and nor- α -lapachone-derived 1,2,3-triazoles 4–6 and 9–12.



Scheme 3. 1,4-Naphthoquinone-derived 1,2,3-triazoles 13–26.

nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazole to generate compounds similar to phenazine derivatives (Scheme 5).

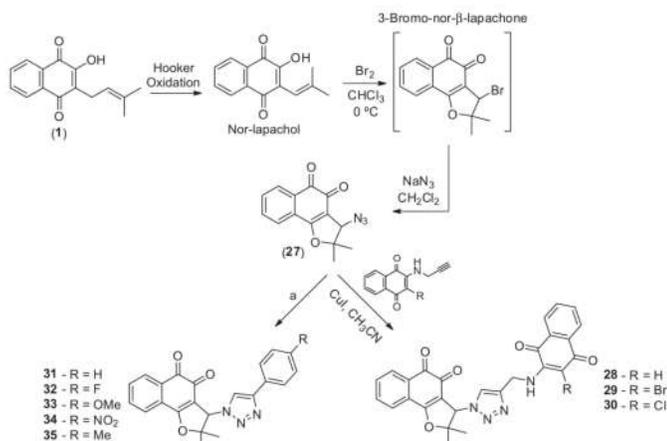
2. Results and discussion

2.1. Chemistry

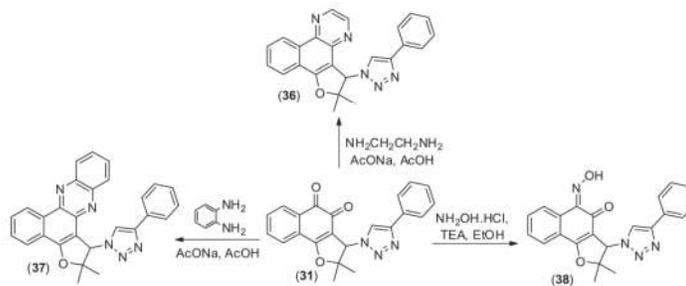
α -Lapachone and nor- α -lapachone-derived 1,2,3-triazoles were synthesized as described previously (Scheme 2).^{17a} Lapachol (**1**) was used to prepare α -lapachone (**2**), which was subsequently treated with *N*-bromosuccinimide in carbon tetrachloride, in the

presence of benzoyl peroxide, to provide 4-bromo- α -lapachone. This bromide was reacted with sodium azide to yield 4-azido- α -lapachone (**3**). The 1,2,3-triazoles **4–6** were then obtained from Cu(I)-catalyzed reactions with the appropriate alkynes, following the methodology described by Sharpless and co-workers (Scheme 2).^{17b}

Lapachol (**1**) was used to prepare nor-lapachol in two steps as described previously.²⁶ This derivative was treated with HCl/AcOH to provide nor- α -lapachone (**7**). Conversion to 3-bromo-nor- α -lapachone and reaction with sodium azide in dichloromethane gave the corresponding azide **8**, as described previously.^{17a} Triazole derivatives **9–12** were synthesized from quinone **8** (Scheme 2).



Scheme 4. Nor- β -lapachone-derived 1,2,3-triazoles **28–35**. (a) Ref. 16a,d.



Scheme 5. Preparation of 1,2,3-triazoles **36–38** derived from nor- β -lapachone based on compound **31**.

A previously described methodology^{16d,27} was used to prepare *para*-naphthoquinones **13–26** (Scheme 3). A series of *N*-phthalimidoalkylazides was initially prepared for the synthesis of compounds **13–22**. These intermediates were used in click chemistry reactions with substituted 2-(prop-2-yn-1-ylamine)-naphthoquinone to obtain the respective triazole compounds in high yields. Compounds **23** and **24** were prepared by the click reaction among the respective quinone and 1-azido-3-nitrobenzene. Final compounds were typically isolated as crystalline solids, and all spectroscopic data were in accordance with the proposed structures shown in Scheme 3. Compounds **17–24** are described herein for the first time.

The last set of naphthoquinoidal compounds was synthesized from the intermediate azide **27** that we have described previously.^{16a} Naphthoquinones substituted with a terminal alkyne had been synthesized previously. These compounds were subjected to click chemistry conditions^{17b} to prepare novel derivatives **28–30** as shown in Scheme 4. Nor- β -lapachone derivatives **28–30** were isolated in moderate yields as yellow and orange solids. Known compounds **31–35**,^{16a,d} shown in Scheme 4, were included

to study their electrochemical properties in comparison with their trypanocidal activity (vide infra).

Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) is a well established methodology using Cu(I) as source of catalysis.²⁸ Herein, we described the synthesis of quinone-based 1,2,3-triazoles using two reaction conditions, the most common using aqueous conditions employing $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate as reducing agent and copper(I) iodide in acetonitrile. As recently described by Meldal and Tornøe²⁹ there is no obvious correlation between method used and yield of reaction. In general, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate is preferred due to ease of workup, while, in other reactions, the copper(I) iodide can be used to improve the rate of reaction. In this manuscript the classical methodology published by Sharpless and co-workers^{17b} was used preferentially. In the case of low yields and long reaction time, copper(I) iodide in acetonitrile or the same condition under ultrasound energy were used.

The phenyl substituted 1,2,3-triazole derived from nor- β -lapachone (**31**) was described previously and was shown to be sixfold more potent than the standard drug benznidazole against trypanocidal forms of *T. cruzi*.^{16a} Herein we describe

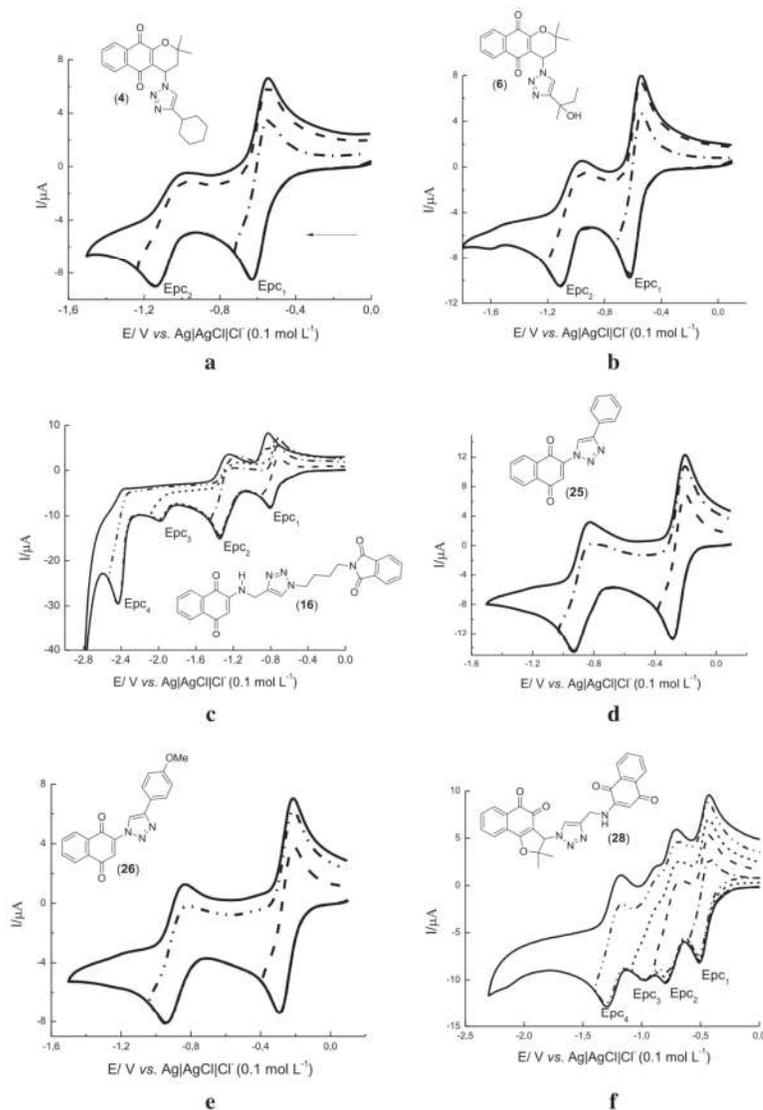


Figure 1. Cyclic voltammograms of naphthoquinones **4**, **6**, **9**, **16**, **25**, **26**, **28**, **30–35** ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), DMF/TBAP (0.1 mol L⁻¹), glassy carbon electrode, cathodic direction, $v = 50 \text{ mV}$.

the synthesis of three novel derivatives synthesized from **31** (Scheme 5). Our strategy was based on modifying the redox centre of **31**. We selected modification reactions from previously published studies on related β -lapachone derivatives, which showed

pronounced activity against *T. cruzi*.¹⁶ Compound **31** was obtained in five steps, in good overall yield, starting from lapachol (**1**).^{16a} Intermediate **31** reacted smoothly with ethane-1,2-diamine or *ortho*-phenylenediamine in acetic acid³⁰ to furnish compounds

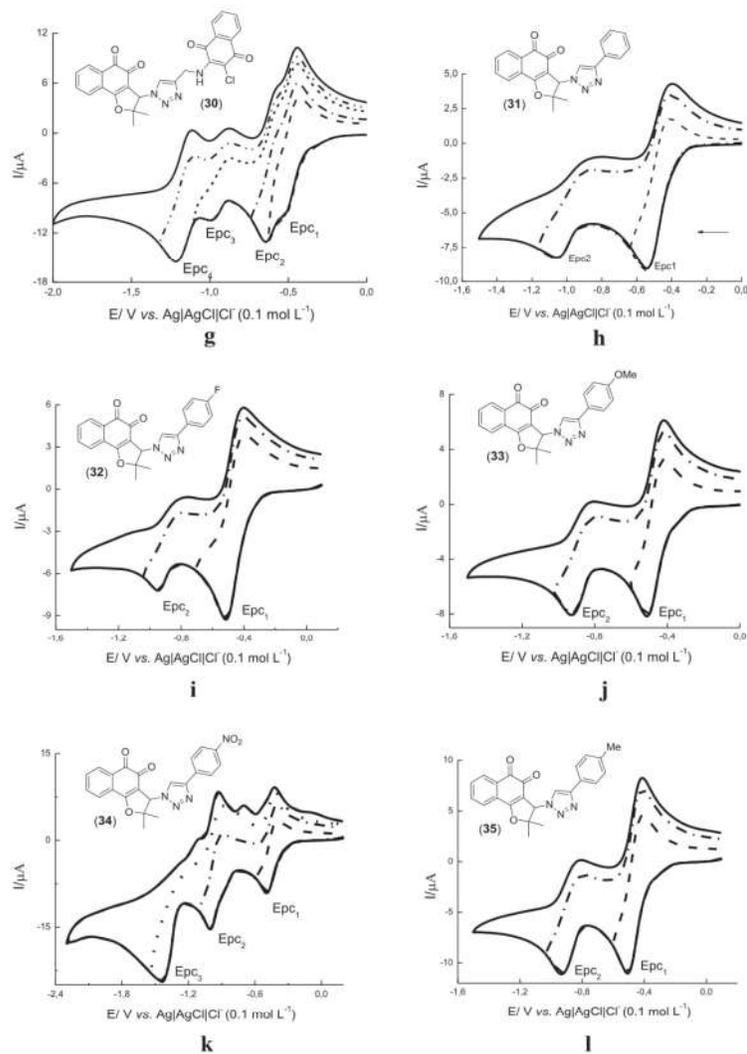


Fig. 1 (continued)

36 and **37** in excellent yields. Oxime **38** was prepared by reaction of **31** with hydroxylamine in ethanol in the presence of TEA (Scheme 5).³¹

The structures of novel compounds **17–24**, **28–30** and **36–38** were determined by ¹H, ¹³C NMR, and IR. The structures were further characterized by comparing their spectroscopic data with those of similar compounds known in the literature.^{16a,17a,18} Electrospray ionization mass spectra and combustion analysis data

were also obtained. Crystals of **38** suitable for X-ray analysis were obtained, and the structure was solved. ORTEP-3 projections are shown in Figure 2, and these reveal the Z-stereochemistry.

2.2. Electrochemistry

In a typical measurement, cyclic voltammograms (CV) were recorded first in aprotic medium (DMF + TBAP, 0.1 mol L⁻¹), at a scan

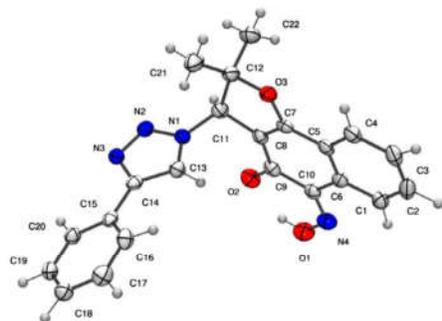


Figure 2. ORTEP-3 projection of compound **38** showing atom labeling and displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level.

Table 1

Major electrochemical parameters of the quinones ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, in DMF/TBAP, 0.1 mol L^{-1} , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)

Compound	Epc1 (V)	E_{redox} (V)	Epc2 (V)	Additional waves (V)
4	-0.630	-0.586	-1.143	—
6	-0.623	-0.581	-1.110	—
16	-0.807	-0.761	-1.348	-1.993, -2.436
25	-0.286	-0.244	-0.930	—
26	-0.291	-0.252	-0.940	—
28	-0.511	-0.467	-0.799	-0.965, -1.311
30	-0.521	-0.475	-0.648	-0.999, -1.216
31	-0.535	-0.472	-1.055	—
32	-0.515	-0.454	-0.950	—
33	-0.510	-0.464	-0.925	—
34	-0.493	-0.444	-1.001	-1.441
35	-0.506	-0.457	-0.935	—

rate of 50 mV s^{-1} . This enabled determination of the electrochemical reduction behavior of each compound. Initial cathodic and anodic peak currents were also determined for each compound.

Table 2

Crystal data and structure refinement for compound **38**

Empirical formula	$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$	
Formula weight	386.41	
Temperature	150(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Monoclinic, $P2_1$	
Unit cell dimensions	$a = 5.6099(2) \text{ Å}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 11.3548(5) \text{ Å}$	$\beta = 96.641(4)^\circ$
	$c = 14.5658(7) \text{ Å}$	$\gamma = 90^\circ$
Volume	$921.61(7) \text{ Å}^3$	
Z, Calculated density	2, 1.392 mg/m^3	
Absorption coefficient	0.095 mm^{-1}	
$F(000)$	404	
Crystal size	$0.087 \times 0.170 \times 0.188 \text{ mm}^3$	
Theta range for data collection	$2.28\text{--}29.42^\circ$	
Limiting indices	$-7 < h < 7, -14 < k < 14, -19 < l < 18$	
Reflections collected	4789	
Independent reflections	3346 [$R(\text{int}) = 0.0275$]	
Completeness to theta = 26.32°	99.95%	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	1 and 0.93	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	
Data/restraints/parameters	3346/1/272	
Goodness-of-fit on F^2	1.107	
Final R \bar{y} indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0465, wR_2 = 0.1163$	
R indices (all data)	$R_1 = 0.0598, wR_2 = 0.1342$	
Largest diff. peak and hole	0.292 and -0.315 e Å^{-3}	

It was not feasible to study all of the quinones in the present work. Representative compounds were selected to cover each of the structural classes (Schemes 2–4).

As has been noted, the compounds described here can be divided among three structural classes: dihydropyran-*para*-naphthoquinones (**4** and **6**), *para*-naphthoquinone derivatives (**16**, **25** and **26**), and *ortho*-dihydrofuranones (**28**, **30–35**).

Figure 1 shows the cyclic voltammograms of compounds **4**, **6**, **16**, **25**, **26**, **28**, and **30–35**. All of the quinones exhibited quasi-reversible reduction behavior (Fig. 1). The major electrochemical parameters for each compound are listed in Table 1.

The relative ease of reduction among the compounds was established by comparison of their first reduction potentials (Epc1, Table 1, column 2). The relative reduction potential of the compounds is as follows: **25** > **26** > **34** > **35** > **33** > **28** ~ **32** ~ **30** > **31** > **6** ~ **4** > **16**.

The values of E_{redox} were obtained from the equation $(\text{Epc1} + \text{Epa1})/2$ and are shown in Table 1. As was expected for quinonoid compounds, the overall CV profiles are similar to those reported for other quinones. The characteristic profile shows two couples of cathodic and anodic peaks, represented by diffusional ($\text{Epc} \propto v^{1/2}$) quasi-reversible systems.^{19b,c} The first pair is related to the formation of a radical anion ($\text{SQ}^{\bullet-}$, Eq. (1)). The second pair of peaks is broader and ill-defined, as has been observed previously.^{19b} This broadening may be due to possible disproportionation or comproportionation reactions.^{19b}

As shown in Table 1, compounds **25** and **26** (Fig. 1d and e) are most easily reduced. The direct attachment of the electron-withdrawing triazole affects the electrochemical behavior of the *para*-quinones in a way that facilitates electron transfer. On the other hand, the presence of an electron-donating amine group increases the barrier to reduction of compound **16** (Fig. 1c). This compound presents two additional waves at more negative potentials (Epc3 and Epc4, Fig. 1c, Table 1, column 4). A full description of the electrochemical mechanism is beyond the scope of the present paper and will be described elsewhere. It is noticeable that *nor*- β -lapachone *ortho*-quinones derivatives (**31–35**, Fig. 1h–l) are more easily reduced than are the α -lapachone-derived 1,2,3-triazoles (**4** and **6**, Fig. 1a and b), as has been shown previously.^{19b} The CV of compound **34**, which shows the lowest negative potential in this series,

Table 3
Intermolecular interaction parameters (Å, °) for compound **38**

A-H...B	d(A-B)	d(A-H)	d(H...A)	<(DHA)
C18 ¹ -H18 ¹ ...N3	3.364(4)	0.963(3)	2.665(2)	129.8(2)
C19 ² -H19 ² ...N2	3.297(4)	0.977(3)	2.588(2)	129.51(19)
C13-H13...O2	3.477(3)	0.984(3)	2.527(2)	162.24(19)

Symmetry operators: (1) $-x, -0.5 + y, 2 - z$; (2) $1 - x, -0.5 + y, 2 - z$; (3) $-1 + x, y, z$.

displayed additional waves that can be attributed to an additional electron-withdrawing nitro group (Fig. 1k). The behavior of this compound is characterized by three waves. The first wave arises from single electron transfer to the quinone system. The second is attributable to a combined system, with two close electron transfers: one to the semiquinone and the other to the nitroaromatic group, generating a nitro radical anion. The third wave is related to further reduction of the nitroaromatic system.

The presence of two quinone systems in **28** and **30** (Fig. 1f and g) leads to CV curves displaying considerably more complex features. These curves show at least four cathodic waves and corresponding anodic waves. It is clear from comparison with the CV of compound **16** that the first wave is related to the reduction of the *ortho*-quinone.

2.3. X-ray analysis

The Ortep-3 diagram of **38** is shown in Figure 2, and Table 2 lists the major crystallographic parameters. Compound **38** crystallizes in the non-centrosymmetric space group $P2_1$, with one molecule in the asymmetric unit. The bond lengths and angles are in good agreement with expected values, based on each atomic type. Although the statistical and structural parameters indicate that the structure is well solved, the Flack parameter indicates that the absolute structure cannot be resolved from this analysis. The crystal structure reveals one intramolecular hydrogen bond (O1–H10...O2) that forms a six-membered ring. Three main planes may be defined through the molecule. Plane 1 is formed by the quinoidal ring (atoms C1 to C10, as O1, O2 and N4). It is interesting to note that atoms C11 and O3 of the furan ring are close to plane 1 (distances equal to 0.059(4) Å 0.044(4) Å), while atom C12 is more distant from this plane (0.238(5) Å). Plane 2 is formed by atoms N1, N2, N3, C13 and C14. Nitrogen N1 of this plane is bonded to the chiral C11 atom of plane 1. The distance between C11 and plane 2 is equal to 0.018(5) Å, indicating that these atoms belong to both planes. Plane 3 is defined through the benzene ring (atoms C15–C20). The angle between planes 1 and 2 is equal to 85.75(7)°, while the angle between planes 2 and 3 is equal to 18.91(18)°. This suggests that the phenyl ring and the triazole group are approximately coplanar. The crystal packing is stabilized by intermolecular C–H...N and C–H...O interactions, involving atoms C13, N2 and N3 of the triazole ring (Table 3).

2.4. Biological activity

We have recently described the introduction of 1,2,3-triazole and arylamino groups into naphthoquinoidal structures; some of these substances were identified as potent trypanocidal compounds.¹⁰ In that work, we demonstrated that 1,4-naphthoquinones and β -lapachones derivatized with a 1,2,3-triazole had efficacy as novel trypanocidal compounds.

In the present study, we have evaluated four classes of compounds for activity against *T. cruzi*. These include α -(**4–6**) and nor- α -lapachone-derived 1,2,3-triazoles (**9–12**), aminomethyl-naphthoquinones conjugated to *N*-phthalimide via triazole

Table 4
Activity of compounds against the trypanostigote form of *T. cruzi*

Compound	IC ₅₀ /24 h ^a (μM)
Lapachol (1) ^b	410.8 ± 53.5
α -Lapachone (2) ^b	>4800
4-Azido- α -lapachone (3)	318.2 ± 31.8
4	>2000
5	>4000
6	>500
Nor- α -lapachone (7) ^c	>4800
3-Azido-nor- α -lapachone (8) ^c	179.3 ± 12.0
9	>1500
10	>2000
11	>4000
12	>4000
13	>4000
14	>4000
15	>4000
16	>4000
17	>4000
18	>4000
19	>4000
20	>4000
21	>4000
22	>4000
23	>4000
24	>4000
25 ^d	10.9 ± 1.8
26 ^d	45.8 ± 5.1
3-Azido-nor- β -lapachone (27) ^c	50.2 ± 3.8
28	80.8 ± 6.5
29	6.8 ± 0.7
30	8.2 ± 0.7
31 ^a	17.3 ± 2.0
32 ^a	20.8 ± 1.9
33 ^a	359.2 ± 11.1
34 ^a	21.8 ± 3.1
35 ^a	39.6 ± 4.0
36	>4000
37	>1500
38	>3200
Benznidazole ^c	103.6 ± 0.6
Crystal violet ^c	536.0 ± 3.0

^a Mean ± SD of at least three independent experiments.^b Ref. 18d.^c Ref. 16a.^d Ref. 16d.

linkers (**13–22**), nor- β -lapachone-derived 1,2,3-triazole-conjugated aminoquinones (**28–30**) and derivatives of nor- β -lapachone bearing phenazine and oxime moieties (**36–38**). Previously published data are included in Table 4 and the associated footnote to enable comparison.^{16a,d}

The first class of compounds, α -lapachones linked to 1,2,3-triazoles (*para*-quinones, Scheme 2), was synthesized from α -lapachone (**2**) and nor- α -lapachone (**7**). We sought to evaluate the effect of the 1,2,3-triazole ring on the trypanocidal activity of these compounds. This strategy had previously been shown to be effective for derivatives of nor- β -lapachone (*ortho*-quinones). Unfortunately, compounds **4–6** and **9–12** were inactive against trypanostigote forms of *T. cruzi*, with IC₅₀/24 h values greater than 500 μM for all derivatives (Table 4).

The hybrids of 1,4-naphthoquinone and *N*-phthalimide (**13–22**) were prepared from brominated, chlorinated or unsubstituted quinones with spacers of one, two or three carbon atoms between the 1,2,3-triazole ring and the *N*-phthalimido group (Scheme 3). Compounds **13–22** were inactive against *T. cruzi*, as all showed IC₅₀/24 h values greater than 4000 μM. Compounds **23** and **24** were also inactive (Table 4).

The last class of naphthoquinoidal compounds described herein was designed to couple *ortho*-quinone to *para*-quinoidal structures

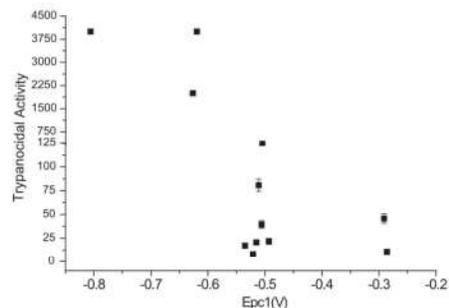


Figure 3. Graph correlating the values of Epc1 of each quinone with its trypanocidal activity (bloodstream trypomastigote forms), represented by $IC_{50}/24$ h (μ M).

(Scheme 4). Compounds **28–30** were isolated in moderate yields as yellow and orange crystalline solids. Our approach proved to be effective, and **28**, **29** and **30** showed $IC_{50}/24$ h values of 80.8, 6.8 and 8.2 μ M, respectively (Table 4). The compounds **29** and **30** were about 15 times more potent than benznidazole, the drug used for the treatment of Chagas disease. A hypothesis for the potent trypanocidal activity is that the union of *ortho*- and *para*-quinoidal moieties can generate high concentrations of reactive oxygen species, in general related to activity of this class of compounds. Analysis of the toxicity to heart muscle cells gave the $LC_{50}/24$ h values of <125, 63.1 and 281.6 μ M for **28**, **29** and **30**, respectively, corresponding to selectivity indexes (SI) of <1.5, 9.3 and 34.3. As preconized in the workshop 'Experimental Models in Drug Screening and Development for Chagas Disease' organized by Fiocruz and Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi)³² establishing a protocol for drug screening, compound **30** will be submitted to in vivo experiments using *T. cruzi*-infected mice. These results highlight the potential of these compounds as novel trypanocidal agents.

To evaluate the importance of redox centers primarily as releasers of ROS, we prepared a series of compounds by modifying the scaffold of the previously described trypanocidal nor- β -lapachone derivative **31** (Scheme 5).^{16a} Compounds **36–38** were evaluated against trypomastigote forms of *T. cruzi*, but none were found to be active (Table 4).

A comparison of the data in Tables 1 and 4 (Fig. 3) reveals a trend: more electrophilic quinones, that is, those with less negative values for Epc1, (Epc1 > -0.6 V vs Ag/AgCl, Table 1) were more potent trypanocidal compounds. Compound **33** was the lone exception to this trend.

Electrochemical experiments (analytical and preparative) and electrochemical (thermodynamic and kinetic) parameters are useful in biomedical chemistry, particularly in elucidating the mechanisms of biological electron-transfer processes. Such analyses can be useful in the design of putatively bioactive lead compounds for which the mechanism of action is based on redox reactions leading to oxidative stress.^{21a}

3. Conclusions

We evaluated twenty-six compounds, and three were identified as potent trypanocidal agents. These compounds were more active than the anti-*T. cruzi* drug benznidazole, the current therapeutic standard. As compound **30** was 12-fold more active than benznidazole, it is a promising candidate for further investigation. The electrochemical properties of selected compounds were studied, and important correlations were found with trypanocidal activity.

4. Experimental section

4.1. Chemistry

Melting points were obtained on Thomas Hoover and are uncorrected. Analytical grade solvents were used. Column chromatography was performed on silica gel (SiliaFlash G60 UltraPure—60–200 μ m, 60 Å). Infrared spectra were recorded on an FTIR Spectrometer IR Prestige-21—Shimadzu. ¹H and ¹³C NMR were recorded at room temperature using a Bruker AVANCE DRX200, Varian Mercury 300 and Varian Mercury 400 MHz, in the solvents indicated, with TMS as internal reference. Chemical shifts (δ) are given in ppm and coupling constants (*J*) in Hertz. High resolution mass spectra (electrospray ionization) were obtained using a MicroTOFIC—BrukerDaltonics. Elemental analysis was performed using a CE Instruments (Thermo-Fisher) EA 1110 CHNS-O elemental analyzer. All the compounds were nominated using the program CS ChemDraw Ultra version 10.0.

4.2. General procedure for the synthesis of compounds 17–24

Method A: In a flask containing 3 mL acetonitrile, it was added 0.5 mmol of the appropriate azides, followed by 0.6 mmol of the appropriate alkynes and finally 11 mg (0.06 mmol) of copper(I) iodide. The reaction was left under magnetic stirring at 28 °C under argon atmosphere, for a reaction time ranging from 19 to 24 h. The end of the reaction was monitored by TLC with dichloromethane as eluent. The solvent was then removed under reduced pressure and the reaction mixture was purified on a silica gel column as a gradient mixture of hexane/ethyl acetate or dichloromethane/ethyl acetate with increasing polarity. **Method B:** In a flask containing 2 mL of DMF, it was added 0.5 mmol of the appropriate azides, followed by 0.6 mmol of the appropriate alkynes, 11 mg (0.06 mmol) of copper(I) iodide and finally 1 drop of Et₃N. The reaction was left under ultrasound energy at 28 °C, during 30 min. After the end of the reaction monitored by TLC with dichloromethane, the mixture was purified as described in method A. **Method C:** The same procedures described in Method A, but 2 mL DMF, one drop Et₃N were added and the reaction was left under magnetic stirring for 60 min as monitored by TLC. **Method D:** The same procedures described in method A, 2 mL of DMF were added, and the reaction was left under magnetic stirring for 60 min as monitored by TLC.

4.2.1. 2-((4-(((3-Chloro-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (17)

Using method D, compound **17** was obtained as an orange solid (200 mg, 0.44 mmol, 87% yield); mp 170–172 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3324, 3140, 2955, 1775, 1712, 1672, 1605, 1573, 1507, 1403, 1363, 1330, 1293, 1136, 1048, 953, 717. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.12 (dd, 1H, *J* = 1.2 and 8.0 Hz), 8.01 (dd, 1H, *J* = 1.2 and 8.0 Hz), 7.91–7.89 (m, 3H), 7.78–7.76 (m, 2H), 7.70 (td, 1H, *J* = 1.6 and 7.3 Hz), 7.61 (td, 1H, *J* = 1.6 and 7.3 Hz), 6.41 (br s, 1H, NH), 6.20 (s, 2H), 5.14 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 177.6, 174.1, 163.8, 142.4, 141.4, 132.4, 132.1, 132.0, 128.8, 127.4, 124.2, 124.1, 121.6, 121.4, 120.5, 120.3, 47.2, 37.6. Anal. Calcd for C₂₂H₁₄ClN₃O₄ · 0.3 × H₂O: C, 58.30; H, 3.25; N, 15.45. Found: C, 58.48; H, 3.21; N, 15.24.

4.2.2. 2-(2-((4-(((3-Chloro-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (18)

Using method D, compound **18** was obtained as a red solid (200 mg, 0.44 mmol, 71% yield); mp 197–199 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} ,

KBr): 3313, 3141, 1774, 1715, 1678, 1605, 1572, 1525, 1425, 1391, 1356, 1298, 1139, 1049, 943, 720. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.15 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 8.04 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.79–7.61 (m, 7H), 6.41 (br s, 1H, NH), 5.13 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz), 4.69 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 4.15 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 180.3, 167.5, 134.8, 134.3, 132.6, 131.7, 126.8, 123.6, 48.2, 40.3, 37.7. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}_4 \cdot 0.35 \times \text{H}_2\text{O}$: C, 59.01; H, 3.49; N, 15.16. Found: C, 59.38; H, 3.64; N, 14.56.

4.2.3. 2-(3-(4-(((3-Chloro-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione (19)

Using method D, compound **19** was obtained as a red solid (200 mg, 0.44 mmol, 94% yield); mp 179–181 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3313, 3141, 1774, 1712, 1678, 1602, 1571, 1525, 1435, 1293, 1139, 1049, 716. ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 7.93–7.60 (m, 2H), 7.70–7.61 (m, 7H), 6.94 (br s, 1H, NH), 5.01 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz), 4.37 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.59 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 2.18 (qt, 2H, $J = 7.0$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 181.7, 175.2, 167.3, 143.9, 134.1, 133.4, 131.9, 125.9, 122.2, 121.9, 46.9, 39.6, 34.3. Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_4$: C, 60.57; H, 3.81; N, 14.72. Found: C, 60.38; H, 3.69; N, 14.45.

4.2.4. 2-(4-(((3-Bromo-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (20)

Using method C, compound **20** was obtained as a red solid (200 mg, 0.40 mmol, 88% yield); mp 155–157 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3250, 3123, 1778, 1725, 1675, 1596, 1567, 1401, 1361, 1329, 1292, 1132, 1045, 783, 737. ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ : 8.13 (s, 1H), 8.07–7.65 (m, 8H), 7.02 (br s, 1H, NH), 6.25 (s, 2H), 5.20 (d, 2H, $J = 5.1$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ : 179.4, 174.9, 165.9, 144.6, 134.4, 134.2, 131.9, 131.1, 130.9, 125.9, 122.9, 122.6, 49.4, 39.8. Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{BrN}_5\text{O}_4$: C, 53.68; H, 2.87; N, 14.23. Found: C, 53.62; H, 2.97; N, 13.86.

4.2.5. 2-(2-(4-(((3-Bromo-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (21)

Using method A, compound **21** was obtained as a red solid (200 mg, 0.40 mmol, 90% yield); mp 169–170 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3314, 3274, 3129, 1772, 1714, 1591, 1565, 1397, 1286, 1124, 1024, 939, 722. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.14 (dd, 1H, $J = 1.5$ and 7.5 Hz), 8.03 (dd, 1H, $J = 1.5$ and 7.5 Hz), 7.79–7.77 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.72–7.61 (m, 4H), 6.48 (br s, 1H, NH), 5.14 (br s, 2H), 4.70 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 4.15 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 180.0, 176.5, 167.6, 146.2, 144.8, 134.7, 134.3, 132.5, 132.2, 131.6, 130.0, 127.0, 126.9, 123.6, 122.5, 48.2, 40.6, 37.7. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{O}_4$: C, 54.56; H, 3.19; N, 13.85. Found: C, 54.46; N, 3.58; H, 13.48.

4.2.6. 2-(3-(4-(((3-Bromo-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione (22)

Using method C, compound **22** was obtained as a red solid (200 mg, 0.40 mmol, 70% yield); mp 168–170 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3219, 3137, 1770, 1711, 1680, 1600, 1566, 1389, 1290, 1131, 1054, 715. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.13 (dd, 1H, $J = 0.9$ and 6.9 Hz), 8.04 (dd, 1H, $J = 1.2$ and 7.5 Hz), 7.85–7.80 (m, 3H), 7.76–7.60 (m, 4H), 6.57 (br s, 1H, NH), 5.17 (d, 2H, $J = 5.1$ Hz), 4.41 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.74 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.35 (qt, 2H, $J = 6.3$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 180.2, 176.8, 168.6, 146.5, 135.0, 134.5, 132.8, 132.4, 132.1, 130.2, 127.3, 127.2, 123.7, 48.2, 40.9, 35.2, 29.6. Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{BrN}_5\text{O}_4$: C, 55.40; H, 3.49; N, 13.46. Found: C, 55.61; H, 3.82; N, 13.37.

4.2.7. 2-(((1-(3-Nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)naphthalene-1,4-dione (23)

Using method B, compound **23** was obtained as an orange solid (200 mg, 0.54 mmol, 78% yield); mp 234–235 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3298, 3132, 1673, 1640, 1590, 1526, 1350, 1260, 1046, 804, 721. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.94 (s, 1H), 8.68 (br s, 1H, NH), 8.38 (dd, 1H, $J = 2.0$ and 8.0 Hz), 8.30 (dd, 1H, $J = 2.0$ and 8.4 Hz), 8.02–7.71 (m, 6H), 5.80 (s, 1H), 4.62 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 181.4, 181.3, 148.4, 148.1, 144.7, 137.0, 134.6, 132.9, 132.1, 131.3, 130.3, 125.9, 125.7, 125.2, 122.8, 121.7, 114.5, 100.6, 37.3. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$: C, 60.80; H, 3.49; N, 18.66. Found: C, 60.83; H, 3.84; N, 18.86.

4.2.8. 2-Bromo-3-(((1-(3-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)naphthalene-1,4-dione (24)

Using method A, compound **24** was obtained as an orange solid (200 mg, 0.44 mmol, 86% yield); mp 175–176 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3298, 3132, 1673, 1640, 1590, 1526, 1350, 1260, 1046, 804, 721. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.91 (s, 1H), 8.68 (br s, 1H, NH), 8.37 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.29 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.99 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.88–7.74 (m, 5H), 5.16 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 179.6, 175.3, 148.4, 147.4, 147.0, 137.1, 134.6, 132.6, 131.4, 131.3, 130.1, 126.5, 126.0, 125.8, 122.8, 121.3, 114.5. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{BrN}_5\text{O}_4 \cdot 0.45 \times \text{H}_2\text{O}$: C, 49.36; H, 2.81; N, 15.15. Found: C, 49.72; H, 3.18; N, 14.78.

4.2.9. 3-(4-(((1,4-Dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,2-dimethyl-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (28)

Using method A, compound **28** was obtained as a yellow solid (220 mg, 0.7 mmol, 65% yield); mp 218–220 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3352 (NH), 1671 (C=O), 1654 (C=O), 1605 (C=O), 1565 (C=O). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.26 (s, 1H), 8.02 (d, 1H, $J = 7.34$ Hz), 7.97–7.93 (m, 1H), 7.92–7.86 (m, 2H), 7.84–7.76 (m, 3H), 7.76–7.67 (m, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.45 (d, 2H, $J = 5.98$ Hz), 1.65 (s, 3H), 0.97 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 181.9, 180.1, 174.9, 170.1, 148.6, 143.4, 135.2, 135.1, 133.4, 133.3, 132.7, 132.1, 130.7, 129.1, 126.9, 126.3, 125.7, 125.4, 123.9, 111.6, 101.0, 95.6, 66.5, 38.0, 27.3, 21.0. EI-HRMS (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 481.1424. Calcd for $[\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5\text{H}]^+$: 481.1512.

4.2.10. 3-(4-(((3-Bromo-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,2-dimethyl-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (29)

Using method A, compound **29** was obtained as an orange solid (196 mg, 0.5 mmol, 70% yield); mp 167–168 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3348 (NH), 1671 (C=O), 1651 (C=O), 1608 (C=O), 1565 (C=O). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.21 (s, 1H), 8.01 (d, 1H, $J = 7.26$ Hz), 7.94–7.88 (m, 2H), 7.84–7.75 (m, 3H), 7.74–7.68 (m, 3H), 5.99 (s, 1H), 4.99 (d, 2H, $J = 6.36$ Hz), 1.65 (s, 3H), 0.97 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 180.1, 175.8, 174.9, 170.2, 168.7, 147.2, 145.6, 135.1, 133.4, 133.1, 132.1, 131.8, 130.4, 129.1, 127.0, 126.4, 125.4, 123.4, 123.3, 111.7, 95.6, 40.3, 27.3, 21.0. EI-HRMS (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 559.0532. Calcd for $[\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{BrN}_4\text{O}_5\text{H}]^+$: 559.0617.

4.2.11. 3-(4-(((3-Chloro-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,2-dimethyl-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (30)

Using method A, compound **30** was obtained as an orange solid (211 mg, 0.5 mmol, 82% yield); mp 194–195 °C. IR ν_{max} (cm^{-1} , KBr): 3355 (NH), 1671 (C=O), 1615 (C=O), 1605 (C=O), 1565 (C=O). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.24 (s, 1H), 8.02 (d, 1H, $J = 6.94$ Hz), 7.95–7.90 (m, 2H), 7.86–7.76 (m, 4H), 7.76–7.70 (m, 2H), 6.02 (s, 1H), 4.98 (d, 2H, $J = 6.65$ Hz), 1.67 (s, 3H), 0.99 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 180.4, 180.2, 175.9, 174.9,

170.1, 145.8, 135.3, 135.1, 133.4, 133.2, 132.1, 132.1, 130.3, 129.1, 127.0, 126.9, 126.2, 125.4, 123.3, 111.7, 95.6, 66.5, 40.3, 27.3, 21.0. EI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$: 515.1022. Calcd for $[C_{27}H_{19}ClN_4O_5H]^+$: 515.1122.

4.2.12. 2,2-Dimethyl-3-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-dihydrobenzo[f]furo[2,3-h]quinoxaline (36)

Nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazole **31** (200 mg, 0.54 mmol) was reacted with an excess of ethylenediamine (65 mg, 1.08 mmol) in 30 mL toluene. The reaction was stirred under reflux in a Dean-Stark apparatus till the total consumption of the reagents as monitored by TLC. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue obtained was purified by column chromatography on silica gel using an increasing polarity mixture of hexane/ethyl acetate as eluent. Compound **36** was obtained as a yellow solid (162 mg, 0.41 mmol, 77% yield, mp 235–238 °C); IR (KBr) 1595 (C=N), 1346 (C=C), 1070 (C–O), 767 (C–H) cm^{-1} . 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.28 (dd, 1H, $J = 8.11$ and 0.73 Hz), 8.74 (d, 1H, $J = 2.16$ Hz), 8.67 (d, 1H, $J = 2.16$ Hz), 8.25 (dd, 1H, $J = 7.86$ and 0.89 Hz), 7.95–7.84 (m, 2H), 7.71–7.67 (m, 2H), 7.34–7.28 (m, 2H), 7.26–7.22 (m, 2H), 6.63 (s, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.34 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 158.1, 146.1, 144.9, 141.0, 140.6, 138.2, 132.3, 130.3, 129.6, 129.5, 129.0, 128.8, 127.9, 125.2, 125.1, 124.7, 122.6, 122.5, 121.5, 109.8, 92.2, 67.7, 27.0, 21.1.

4.2.13. 2,2-Dimethyl-1-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2-dihydrobenzo[a]furo[2,3-c]phenazine (37)

Nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazole **31** (150 mg, 0.4 mmol) was reacted with *ortho*-phenylenediamine (41 mg, 0.44 mmol) and sodium acetate (62 mg, 0.76 mmol) in 25 mL glacial acetic acid. The reaction was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was shed over cold water and the precipitate filtered using Buchner funnel. The solid obtained was purified by column chromatography on silica gel using an increasing polarity mixture of hexane/ethyl acetate as eluent. Compound **37** was obtained as a yellow solid (195 mg, 0.44 mmol, 82% yield, mp 224–227 °C); IR (KBr) 1597 (C=N), 1346 (C=C), 1049 (C–O), 763 (C–H) cm^{-1} . 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.48 (d, 1H, $J = 8.16$ Hz), 8.31–8.26 (m, 1H), 8.26–8.21 (m, 1H), 8.06–8.01 (m, 1H), 7.98–7.93 (m, 1H), 7.92–7.86 (m, 1H), 7.78–7.72 (m, 2H), 7.70–7.66 (m, 2H), 7.31–7.25 (m, 3H), 7.24–7.18 (m, 1H), 6.73 (s, 1H), 1.83 (s, 3H), 1.36 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 160.2, 146.6, 142.2, 142.2, 141.1, 139.9, 132.9, 131.2, 131.0, 130.8, 130.5, 129.8, 129.6, 129.2, 129.1, 128.6, 126.1, 125.5, 125.4, 124.3, 123.5, 121.8, 109.4, 93.1, 68.2, 27.5, 21.6.

4.2.14. (Z)-5-(Hydroxyimino)-2,2-dimethyl-3-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3-dihydro-naphtho[1,2-b]furan-4(5H)-one (38)

Nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazole **31** (200 mg, 0.54 mmol) was reacted with hydroxylamine hydrochloride (120 mg, 1.68 mmol), sodium acetate (89 mg, 1.08 mmol) and catalytic triethylamine in 30 mL methanol. The reaction was stirred under reflux overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue obtained was purified by column chromatography on silica gel using an increasing polarity mixture of hexane/ethyl acetate as eluent. Compound **38** was obtained as a yellow solid (129 mg, 0.33 mmol, 62% yield, mp 222–225 °C); IR (KBr) 3449 (OH), 1609 (C=O), 1524 (C=N), 972 (N–O) cm^{-1} . 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.41 (d, 1H, $J = 8.09$ Hz), 7.90 (d, 1H, $J = 7.75$ Hz), 7.81 (d, 2H, $J = 7.55$ Hz), 7.73 (t, 1H, $J = 7.67$ Hz), 7.66–7.58 (m, 2H), 7.40 (t, 2H, $J = 7.53$ Hz), 7.32 (t, 1H, $J = 7.53$ Hz), 6.10 (s, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.27 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 202.5, 170.9, 149.4, 147.0, 131.7, 129.7, 129.6, 128.9, 128.8, 128.5, 126.2, 126.0, 125.1, 123.3, 123.3, 123.1, 118.7, 103.0, 89.9, 60.3, 23.1, 23.1.

4.4. Trypanocidal activity

Stock solutions of the compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), with the final concentration of the latter in the experiments never exceeding 0.1%. Preliminary experiments showed that concentrations of up to 0.5%, DMSO have no deleterious effect on the parasites. Bloodstream trypomastigotes of the Y strain were obtained at the peak of parasitaemia from infected albino mice, isolated by differential centrifugation and resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DME) to a parasite concentration of 10^7 cells/mL in the presence of 10% of mouse blood. This suspension (100 μ L) was added in the same volume of each compound previously prepared at twice the desired final concentrations. Cell counts were performed in Neubauer chamber and the trypanocidal activity was expressed as IC_{50} , corresponding to the concentration that leads to lysis of 50% of the parasites.

4.5. Toxicity to heart muscle cells

The cytotoxicity assays were performed using primary cultures of heart muscle cells (HMC). Briefly, hearts of 18-day-old mouse embryos were fragmented and dissociated with trypsin and collagenase in phosphate buffered saline (PBS pH 7.2), as previously established.³³ For these experiments, 6×10^4 cardiomyocytes in 100 mL of RPMI-1640 medium (pH 7.2) plus 10% foetal bovine serum and 2 mM glutamine were added to each well of a 96-well microtiter plate and incubated for 24 h at 37 °C. The treatment with **28–30** was performed in fresh supplemented medium without phenol red (200 μ L/well) for 24 h at 37 °C. After this period, 110 μ L of the medium was discarded and 10 μ L of PrestoBlue (Invitrogen) was added to complete the final volume of 100 μ L. Thus, the plate was incubated for 5 h and the measurement was performed at 570 and 600 nm, as recommended by the manufacturer. The results were expressed as the difference in the percentage of reduction between treated and untreated cells being the LC_{50} value, corresponds to the concentration that leads to damage of 50% of the mammalian cells.

4.6. X-ray analysis

X-ray data were collected at 150 K using MoK α (0.71073 Å) on an Agilent–Gemini diffractometer equipped with a CCD area detector. The CrysAlisPro software package³⁴ was used for data collection and data reduction. The data were corrected empirically for absorption using spherical harmonics using the SCALE3 ABSPACK³⁵ scaling algorithm. The structure was solved by direct methods using SHELXS-97³⁶ and refined by full-matrix least squares on F^2 using SHELXL-97.³⁷ All non-hydrogen atoms were successfully refined using anisotropic displacement parameters. Hydrogen atoms were found in the Fourier difference synthesis and fixed. Crystallographic data for the structure were deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre, with number CCDC 926844.

4.7. Electrochemical studies

Cyclic voltammetry (CV) experiments were performed with a conventional undivided three electrode cell using an Autolab PGSTAT-30 potentiostat (Echo Chemie, Utrecht, the Netherlands) coupled to a microcomputer, interfaced by GPES 4.9 software. Glassy carbon (GC) (diameter = 3 mm) as the working electrode, a Pt wire as the counter electrode and the reference electrode an Ag|AgCl, Cl⁻ (saturated) were used. The GC electrode was cleaned up by polishing with alumina on a polishing felt (BAS polishing kit). The solvent used in aprotic media studies, DMF, was distilled under reduced pressure after stirring with anhydrous copper sulfate. In CV experiments, the scan rate varied from 10 to 500 mV

s⁻¹. All experiments were conducted at room temperature (25 ± 2 °C) and purging an inert gas (Argon). Electrochemical reduction in aprotic media (DMF + TBAP 0.1 mol L⁻¹) was performed in the absence of oxygen. Each compound (1 × 10⁻³ mol L⁻¹) was added to the supporting electrolyte and the solution was deoxygenated with argon before the measurements by cyclic voltammetry.

4.8. Statistical analysis

The comparison between the IC₅₀ values for *T. cruzi* was performed by ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls and Mann–Whitney tests (*p* < 0.05).

Acknowledgments

This research was funded by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Project Universal–MCTI/CNPq no 14/2012 (1480719/2012–8), FAPEMIG APQ-04166–10, PRONEM–FACEPE (1232.1.06/10), CENAPESQ–UFRPE, PRONEX/FAPEAL/CNPq and CAPES. Dr. E.N. da Silva Júnior also thanks the Programa Institucional de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-Contratados and Universidade Federal de Minas Gerais. The authors would like to thank Professors Bruno C. Cavalcanti and Claudia Pessoa for the support with the biological assays.

References and notes

- Rassi Júnior, A.; Rassi, A.; Rezende, J. M. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2012**, *26*, 275.
- Schofield, C. J.; Jannin, J.; Salvatella, R. *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 583.
- Shikanai-Yasuda, M. A.; Carvalho, N. B. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, 845.
- Coura, J. R.; Junqueira, A. C. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 145.
- Schmunis, G. A.; Yadon, Z. E. *Acta Trop.* **2010**, *115*, 14.
- Coura, J. R.; Viñas, P. A. *Nature* **2010**, *465*, 58.
- Dias, J. C. P.; Prata, A.; Correia, D. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41*, 193.
- Abad-Franck, F.; Santos, W. S.; Schofield, C. J. *Acta Trop.* **2010**, *115*, 44.
- Guedes, P. M. M.; Silva, G. K.; Gutierrez, F. R. S.; Silva, J. S. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2011**, *9*, 609.
- Soeiro, M. N. C.; de Castro, S. L. *Open Med. Chem. J.* **2011**, *5*, 21.
- DNDI 2012 New letter Chagas Disease Clinical Research Platform, dez 2012 [http://www.dndi.org.br/images/stories/img_videos/NEWSLETTERChagasEd2%20\(1\)\(1\).pdf](http://www.dndi.org.br/images/stories/img_videos/NEWSLETTERChagasEd2%20(1)(1).pdf), accessed 12/6/2012.
- (a) Salas, C. O.; Faúndez, M.; Morello, A.; Maya, J. D.; Tapia, R. A. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 144; (b) Pieretti, S.; Haanstra, J. R.; Mazet, M.; Perazzo, R.; Bergamini, C.; Prati, F.; Fato, R.; Lenaz, G.; Capranico, G.; Brun, R.; Bakker, B. M.; Michels, P. A. M.; Scapozza, L.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2012.
- O'Brien, P. J. *Chem. Biol. Interact.* **1991**, *80*, 1.
- Constantino, L.; Barlocco, D. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 65.
- Pinto, A. V.; de Castro, S. L. *Molecules* **2009**, *14*, 4570.
- (a) da Silva Júnior, E. N.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Silva, R. S. F.; Teixeira, D. V.; Souza, M. C. B. V.; de Simone, C. A.; de Castro, S. L.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1774; (b) da Silva Júnior, E. N.; Guimarães, T. T.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; de Simone, C. A.; Pessoa, C.; Cavalcanti, B. C.; Sabino, J. R.; Andrade, C. K. Z.; Goulart, M. O. F.; de Castro, S. L.; Pinto, A. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3224; (c) da Silva Júnior, E. N.; de Moura, M. A. B. F.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Souza, M. C. B. V.; Araújo, A. J.; Pessoa, C.; Costa-Lotuf, L. V.; Montenegro, R. C.; de Moraes, R. C.; Goulart, M. O. F.; Ferreira, V. F. *Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 635; (d) da Silva Júnior, E. N.; Melo, I. M. M.; Diogo, E. B. T.; Costa, V. A.; Souza Filho, J. D.; Valença, W. O.; Camara, C. A.; Oliveira, R. N.; Araújo, A. S.; Emery, F. S.; Santos, M. R.; de Simone, C. A.; Menna-Barreto, R. F. S.; de Castro, S. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 304.
- (a) Guimarães, T. T.; Pinto, M. C. F. R.; Lanza, J. S.; Melo, M. N.; do Monte-Neto, R. L.; de Melo, I. M. M.; Diogo, E. B. T.; Ferreira, V. F.; Camara, C. A.; Valença, W. O.; de Oliveira, R. N.; Frézard, F.; da Silva Júnior, E. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 523; (b) Rostovtsev, V. V.; Green, G. L.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- (a) Pinto, A. V.; Neves Pinto, C.; Pinto, M. C. F. R.; Santa Rita, R.; Pezzella, C. A. C.; de Castro, S. L. *Arzneim.-Forsch.* **1997**, *47*, 74; (b) Neves Pinto, C.; Dantas, A. P.; Moura, K. C. G.; Emery, F. S.; Polequevitch, P. F.; Pinto, M. C. F. R.; de Castro, S. L.; Pinto, A. V. *Arzneim.-Forsch.* **2000**, *50*, 1120; (c) Pinto, A. V.; Cruz, F. S.; Pellegrino, J.; Mello, R. T. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1977**, *71*, 133; (d) da Silva Júnior, E. N.; de Souza, M. C. B. V.; Fernandes, M. C.; Menna-Barreto, R. F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Lopes, F. A.; de Simone, C. A.; Andrade, C. K. Z.; Pinto, A. V.; Ferreira, V. F.; de Castro, S. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5030.
- (a) Goulart, M. O. F.; Zani, C. L.; Tonholo, J.; Freitas, L. R.; de Abreu, F. C.; Oliveira, A. B.; Raslan, D. S.; Starling, S.; Chiari, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2043; (b) Paulino, M.; Alvareda, E. M.; Denis, P. A.; Barreiro, E. J.; Sperandio da Silva, G. M.; Dubin, M.; Gastellú, C.; Aguilera, S.; Tapia, O. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2238; (c) Pérez-Silanes, S.; Devarapally, G.; Torres, E.; Moreno-Viguri, E.; Aldana, I.; Monge, A.; Crawford, P. W. *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96*, 217.
- Song, Y.; Buettner, G. R. *Free Radical Biol. Med.* **2010**, *49*, 919.
- (a) Hillard, E. A.; de Abreu, F. C.; Ferreira, D. C. M.; Jaouen, G.; Goulart, M. O. F.; Amatore, C. *Chem. Commun.* **2008**, 2612; (b) Araújo, A. J.; de Souza, A. A.; da Silva Júnior, E. N.; Marinho Filho, J. D. B.; de Moura, M. A. B. F.; Rocha, D. D.; Vasconcelos, M. C.; Costa, C. O.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O.; Ferreira, V. F.; de Abreu, F. C.; Pinto, A. V.; Montenegro, R. C.; Costa-Lotuf, L. V.; Goulart, M. O. F. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 585; (c) Cavalcanti, B. C.; Barros, F. W. A.; Cabral, J.; Ferreira, J.; Magalhães, H.; Júnior, H.; da Silva Júnior, E. N.; de Abreu, F. C.; Costa, C. O.; Goulart, M. O. F.; Moraes, M. O.; Pessoa, C. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1560; (d) Ferreira, D. C. M.; Tapsoba, I.; Arbauff, S.; Bouret, Y.; Moreira, A. M. S.; Pinto, A. V.; Goulart, M. O. F.; Amatore, C. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 528.
- Ceric, H.; Sindler-Kulyk, M.; Kovacevic, M.; Peric, M.; Ivkovic, A. Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3053.
- Spallarossa, A.; Cesarini, S.; Ranise, A.; Bruno, O.; Schenone, S.; La Colla, P.; Collu, G.; Sanna, G.; Secci, B.; Laddo, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1650.
- Banik, B. K.; Banik, I.; Becker, F. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3611.
- Li, Y. F.; Wang, G. F.; He, P. L.; Huang, W. G.; Zhu, F. H.; Gao, H. Y.; Tang, W.; Luo, Y.; Feng, C. L.; Shi, L. P.; Ren, Y. D.; Lu, W.; Zuo, J. P. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4790.
- Fieser, L. F.; Fieser, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3215.
- da Silva, M. T.; de Oliveira, R. N.; Valença, W. O.; Barbosa, F. C. G.; da Silva, M. G.; Camara, C. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1839.
- Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302.
- Meldal, M.; Törnøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952.
- Silva, R. S. F.; Pinto, M. C. F. R.; Goulart, M. O. F.; de Souza Filho, J. D.; Neves Júnior, I.; Lourenço, M. C. S.; Pinto, A. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2334.
- Emery, F. S.; Silva, R. S. F.; de Moura, K. C. G.; Pinto, M. C. F. R.; Amorim, M. B.; Malta, V. R. S.; Santos, R. H. A.; Honório, K. M.; da Silva, A. B. F.; Pinto, A. V. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2007**, *79*, 29.
- Romanha, A. J.; de Castro, S. L.; Soeiro, M. N.; Lannes-Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Júnior, L. H.; Romero, L. I.; Bahia, M. T.; Lotrowska, M.; Soares, M.; Andrade, S. G.; Armstrong, T.; Degraeve, W.; Andrade, Z. A. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 233.
- Meirelles, M. N.; de Araujo-Jorge, T. C.; Miranda, C. F.; de Souza, W.; Barbosa, H. S. *Eur. J. Cell Biol.* **1986**, *41*, 198.
- CRYSLISPRO, Agilent Technologies, Version 1.171.35.21 (release 20-01-2012 CrysAlis171.NET).
- SCALE3 ABSPACK Scaling Algorithm, CrysAlis, Agilent Technologies, Version 1.171.35.21 (release 20-01-2012 CrysAlis171.NET).
- Sheldrick, G. M. *SHELXS-97 Program for the Solution of Crystal Structures*; University of Göttingen: Germany, 1997.
- Sheldrick, G. M. *SHELXS-97 Program for the Refinement of Crystal Structures*; University of Göttingen: Germany, 1997.