## UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

TAMIRES ALVES DO NASCIMENTO

## CONTRIBUIÇÕES DA ELETROQUÍMICA MOLECULAR PARA A QUÍMICA MEDICINAL E PARA A ANÁLISE DE SONDAS FLUORESCENTES.

MACEIÓ-AL 2022

## TAMIRES ALVES DO NASCIMENTO

## CONTRIBUIÇÕES DA ELETROQUÍMICA MOLECULAR PARA A QUÍMICA MEDICINAL E PARA A ANÁLISE DE SONDAS FLUORESCENTES.

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Biotecnologia. Orientadora: Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart

## Catalogação na Fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto - CRB-4 - 1767

N244c Nascimento, Tamires Alves do. Contribuições da eletroquímica molecular para a química medicinal e para a análise de sondas fluorescentes / Tamires Alves do Nascimento. – 2022. 85 f.:il.
Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart. Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2022. Bibliografia: f. 82-85.
1. Eletroquímica orgânica. 2. Quinonas. 3. Derivados BODIPY. 4. Voltametria cíclica. 5. Mecanismo eletródico. I. Título.

## TAMIRES ALVES DO NASCIMENTO

## Contribuição da Eletroquímica Molecular em Química Medicinal e na Análise de Sondas Fluorescentes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 21/11/2022.



#### AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Marília Goulart, pela orientação e paciência.

À CAPES, pela bolsa concedida durante esses anos de doutorado.

À minha amiga Carol, que mesmo distante se fez presente, que foi grande incentivadora para conclusão desse doutorado, que é inspiração, exemplo e amor. Te amo, amiga, obrigada por sempre ficar ao meu lado.

À Andressa, de fundamental importância para construção do trabalho.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente a chegar até aqui.

A todos, o meu muito obrigada!

#### RESUMO

A eletroquímica molecular tem se mostrado útil para caracterizar reações redox e decifrar mecanismos reacionais associados à transferência de elétrons. As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural, assim como produtos sintéticos. O interesse por estas substâncias tem aumentado, não só devido à sua contribuição nos processos bioquímicos vitais, mas também no destaque cada vez maior para suas atividades biológicas, farmacológicas e tecnológicas. Apesar dos vários efeitos benéficos, as quinonas também são consideradas toxinas. É justamente esse comportamento duplo (pró-oxidante versus antioxidante) que confere a essa classe de compostos uma peculiaridade de grande interesse para os pesquisadores, especialmente na química medicinal. Os compostos fluorescentes são moléculas de forte aplicação teórico-tecnológica. Têm sido amplamente utilizados como sondas em análise química in-vitro ou in-vivo, corantes a laser e em aplicações terapêuticas. Suas propriedades eletroquímicas são parâmetros de escolha analíticamecanística-teórica, devido à relevância do processo de transferência de elétrons (TE), na sua ativação. Estes são passíveis de controle e estrutura-dependentes. A substituição em diferentes posições afeta o ambiente eletrônico em torno do núcleo BODIPY, causando mudanças características nos potenciais de oxidação e redução e em outras propriedades físico-químicas. Tanto as quinonas quanto os BODIPYS são moléculas bioativas promissoras, com destaque como protótipos candidatos a fármacos ou a sondas. Neste trabalho investigou-se o comportamento eletroquímico, in vitro, de quinonas hibridas e nitrosil-BODIPYS, em meio aprótico (ACN ou DMF + TBAPF<sub>6</sub> 0,1 mol  $\hat{L}^{-1}$ ), a fim de obter dados sobre seus mecanismos redox, intermediários eletrogerados e interação com macromoléculas biológicas. As técnicas eletroquímicas utilizadas foram voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, em eletrodo de carbono vítreo (d = 3 mm), o contra-eletrodo era um fio de platina e o eletrodo de referência, Ag | AgCl, Cl<sup>-</sup> (saturado). Investigamos quatorze quinonas acriladas e via comparação entre potenciais de redução e atividades biológicas, notou-se que as mais eletrofílicas (potenciais de redução mais positivos), apresentaram uma maior atividade tripanocida (IC<sub>50</sub>/24 h, inferior a cerca de 300 µM), com exceção de uma delas. Além de uma aparente correlação entre a presença de um grupo eletrorretirador, como o cloro, com redução mais facilitada, e uma atividade biológica mais elevada, portanto, mais promissora na luta contra o Trypanosoma cruzi, há também uma faixa ideal para o potencial de redução. No meio aprótico empregado, todos os compostos, com valores de potencial de redução de primeira onda (Ep1c), em torno de -0,5 V ou mais positivos, foram ativos. Esses compostos, facilmente redutíveis, podem ser considerados como "altamente oxidantes" neste contexto biológico, com repercussões na atividade tripanocida. Foram investigados BODIPYs nitrosilados nas posições  $\alpha$ - (5-nitrosil) e  $\beta$ - (6-nitrosil). A localização do grupo NO em  $\alpha$  ou  $\beta$  afeta fortemente as estruturas eletrônicas e o comportamento redox. Por meio da espetroeletroquímica associada à análise por métodos computacionais (CDFT) corroboram os resultados voltamétricos e explicam as diferenças inesperadas de reatividade dos compostos. O grupo nitrosila é o primeiro a ser reduzido no 5-nitrosil-BODIPY, enquanto no isômero  $\beta$ -, o grupo nitrosila facilita fortemente a redução que ocorre no sistema BODIPY. Os casos de investigação farmacoeletroquímica aqui estudados revelam que a compreensão dos mecanismos eletroquímicos de transferência de elétrons in vitro e a obtenção de parâmetros termodinâmicos e cinéticos são úteis na compreensão de vários processos que podem ocorrer em nível biológico. Este é um ponto fundamental para o desenvolvimento de moléculas bioativas, candidatas a protótipos de novos fármacos, especialmente quando sofrem bioativação por reações redox.

# Palavras-chave: Eletroquímica Orgânica; Quinonas híbridas; Derivados BODIPY; Voltametria cíclica; Mecanismos eletródicos.

#### ABSTRACT

Molecular electrochemistry is useful for characterizing redox reactions and deciphering reactional electron-transfer-associated mechanisms. Quinones represent a wide and diversified family of natural metabolites, along with synthetic ones. The interest in these substances has increased due to their contribution to vital biochemical processes and increasing prominence for their biological, pharmacological and technological activities. Despite several beneficial effects, quinones are also considered toxins. It is precisely this dual behavior (pro-oxidant versus antioxidant) that enlarge the interest of researchers, especially in medicinal chemistry. Fluorescent compounds are theoretically and technological attractive and have been widely used as sensors for *in-vitro* or *in-vivo* chemical analyses, as laser dyes, and for therapeutic applications. Their electrochemical properties, adjustable and structurally-dependent, are analytically, mechanistic and theoretically- relevant parameters, once the electron transfer processes (ET) drive the activation of these classes of compounds. Substitution at different positions affects the electronic environment around the BODIPY core, causing characteristic changes in oxidation and reduction potentials and other physicochemical properties. Both quinones and BODIPYS are promising bioactive molecules that may evolve as prototypes for drugs or probes. This work investigated the electrochemical behaviour, in electrochemical cells, of hybrid quinones and nitrosyl-BODIPYs, in an aprotic medium (ACN or DMF + TBAPF<sub>6</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>) to obtain data on their redox mechanisms, electrogenerated intermediates, formation of reactive oxygen species, and interaction with biological macromolecules. The electrochemical techniques used were cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry on vitreous carbon electrodes (d = 3 mm). The counter electrode was a platinum wire, and the reference electrode, Ag | AgCl, Cl- (saturated). We investigated fourteen acrylated quinones, and by the comparison among reduction/oxidation potentials and biological activities, it was noted that the most electrophilic (more positive reduction potentials) presented the highest trypanocidal activity (CI<sub>50</sub>/24 h, less than about 300 µM), except for one of them. An apparent correlation between the presence of an electron-withdrawing group, such as chlorine, with an easier reduction and a higher biological activity, appeared, together with an ideal range for the reduction potential. In the aprotic medium employed, all compounds, with first wave reduction potential values (Ep1c), around -0.5 V or more positive, were active. These compounds can be considered "highly oxidizing" in this biological context, with consequences on trypanocidal activity. Nitrosylated BODIPYs were investigated at  $\alpha$ - (5-nitrosyl) and  $\beta$ - (6-nitrosyl). The location of the NO group on  $\alpha$  or  $\beta$  strongly affects the electronic structures and redox behavior. Spectroelectrochemistry associated with computational studies (Conceptual Density analysis and Functional Theory (CDFT)) corroborate the voltammetric results and explains the unexpected reactivity differences. The nitrosyl group is the first to be reduced in 5-nitrosyl-BODIPY, while in the  $\beta$ -isomer, the nitrosyl group strongly facilitates the reduction of the BODIPY moiety. The results unveil that the understanding of the electrochemical mechanisms and the measurement of thermodynamic and kinetic parameters are useful as mimics of the invivo processes. This is a solid point for the planning and development of redox-based biologically active compounds.

# Keywords: Organic Electrochemistry; Hybrid Quinones; BODIPY derivatives; Cyclic Voltammetry; Electrodic Mechanisms

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Possibilidades do uso da eletroquímica em química medicinal14
Figura 2-Voltamogramas cíclicos mostrando diferentes velocidades de varredura17
Figura 3 - Ilustra o esquema (potencial vstempo), para a voltametria de pulso diferencial [BRETT e BRETT, 1996]
Figura 4 - Benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, respectivamente 20
Figura 5- Quinonas: Aplicações Clínicas e Industriais21
Figura 6 - Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q <sup>-</sup> ) e hidroquinonas (QH <sub>2</sub> ), respectivamente22
Figura 7 - Estrutura geral do BODIPY 25
Figura 8 - Esquema da cela eletroquímica utilizada para as análises
Figura 9 – Voltamogramas Cíclicos das Naftoquinonas, em DMF + TBAPF6 (0.1 mol L <sup>-1</sup> ),
ECV, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ . Direção catódica, varreduras sucessivas e varredura no potencial de
inversão. Direção catódica34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Técnica de VC. Perturbação aplicada e resposta obtida16
Tabela 2-Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis (1), irreversíveis (2) e
quase-reversíveis (3) 17
Tabela 3 - Estruturas químicas das quinonas acriladas em estudo 28
Tabela 4- Estruturas químicas dos derivados de BODIPYS em estudo30
Tabela 5 – Resultados IC50 dos compostos estudados39
Tabela 6-Principais parâmetros eletroquímicos em VC da naftoquinonas alquiladas (c =
1 mmol L <sup>-1</sup> ), em DMF + TBAPF <sub>6</sub> , 0,1 mol L <sup>-1</sup> , v = 100 mV s <sup>-1</sup>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BODIPYS	Borodipirrometenos
DMF	Dimetilformamida
Em	Potencial em meia altura de onda
E <sub>pc</sub>	Potencial de redução catódico
Eredox	Potencial redox
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
TBAPF <sub>6</sub>	Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio
VC	Voltametria Cíclica
VCs	Voltamogramas Cíclicos
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VPDs	Voltamogramas de Pulso Diferencial
VPN	Voltametria de Pulso Normal
TE	Tranferência de elétrons

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISAO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Eletroquímica molecular: uma área de interface e inúmeras	possibilidades de
reconhecimento das estabilidade e reatividades moleculares	13
2.2Métodos eletroquímicos	15
2.2.1 Voltametria Cíclica	15
2.2.2. Voltametria de Pulso Diferencial	17
2.2.3. Espectroeletroquímica	
2.3 Substâncias bioativas	20
2.3.1 Quinonas	20
2.3.2 BODIPYS	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	
4 EXPERIMENTAL	
4.1 Reagentes e solventes	
4.2 Estudos Eletroquímicos	31
4.3 Experimentos espectroeletroquímicos	
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1 CASO 1: Estudo Eletroquímico dos Acrilatos	
5.2 CASO 2: Decorando o BODIPY com o grupo NO, eletroatrae	nte: consequências
espectroeletroquímicas e investigação computacional	40
6. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	

# SUMÁRIO

## 1 INTRODUÇÃO

A eletroquímica estuda fenômenos de transferência de elétrons, isto é, as reações de oxirredução. Do ponto de vista biológico, processos fundamentais à vida, como a respiração celular, neuro-transmissão e fotossíntese são governados ou estimulados por reações oxidorredutivas (MENG et al., 2017).

A eletroquímica molecular tem sido útil na busca da compreensão dos mecanismos moleculares de ação de fármacos bioativos via redução e/ou oxidação, além de outras aplicações relacionadas à medicina redox. O comportamento redox de fármacos em diferentes situações clínicas pode se relacionar à cura ou ao agravamento de doenças. Diagnósticos clínicos podem ser realizados a partir do conhecimento da eletroquímica. Além disso, essas informações são úteis no estudo e planejamento de protótipos candidatos a fármacos, especialmente em casos onde a bioativação redox se mostra essencial ao mecanismo molecular de ação (SOUZA, 2003)

Há um interesse cada vez maior em compostos bioativos isolados de fontes naturais, principalmente os extraídos de plantas, bem como se almeja a obtenção de fármacos seguros, eficazes e seletivos. Neste contexto, as quinonas ocupam um lugar de destaque em química medicinal pela ampla variedade de atividades biológicas já descritas na literatura. Elas estão presentes em quase todas as formas de vida e suas propriedades redox explicam seu comportamento duplo, pró-oxidante e antioxidante (MALTA, 2000).

Outra classe de compostos de grande interesse biológico são os fluorescentes, os quais podem atuar como sondas redox. Um exemplo são os borodipirrometenos (BODIPYS), os quais contêm o núcleo 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno. Eles apresentam propriedades eletroquímicas ajustáveis e com substituição em diferentes posições em torno do núcleo BODIPY, mudanças características nos potenciais de oxidação e redução podem ser observadas (LAKOWICZ, J. R., 2013).

Dessa forma, tanto quinonas quanto BODIPYS são moléculas redox-ativas promissoras para protótipos candidatos a fármacos ou a sondas. Este trabalho visa apresentar as contribuições da eletroquímica molecular para a química medicinal, enfatizando a importância de compostos com múltiplas funcionalidades redox para aplicações na medicina e as possíveis correlações dos dados eletroquímicos com os biológicos. Além disso, almeja-se apresentar o estado da arte no campo da medicina redox e interfaces relevantes.

A presente tese divide-se em 6 capítulos e referências. Na introdução, são apresentados conceitos e justificativas para o presente estudo. No segundo capítulo, faz-se uma revisão sucinta da importância da eletroquímica molecular em química medicinal, uma rápida descrição

das técnicas eletroquímicas utilizadas e das substâncias submetidas à investigação: quinonas e BODIPYS. O capitulo 3 relaciona-se aos objetivos e em 4, descreve-se materiais e métodos. No capítulo 5 são representados pelos artigos resultantes da tese, com o capítulo 6 relativo a conclusões.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

# 2.1 Eletroquímica molecular: uma área de interface e inúmeras possibilidades de reconhecimento das estabilidade e reatividades moleculares

Eletroquímica é a ciência das reações de transferência de carga elétrica que ocorrem sob a influência de um gradiente de potencial eletroquímico. Tais reações podem acontecer em uma interface heterogênea, onde a substância redox interage fisicamente e/ou quimicamente com os demais componentes do meio, ou mesmo com as interfaces. Essas interações podem ser evidenciadas por meio de perturbações controladas ao sistema, como por exemplo, a aplicação de uma diferença de potencial e as medidas, conhecidas por sinais eletroquímicos, que podem ser relacionadas com parâmetros intrínsecos da substância avaliada (PACHECO,2013; SKOOG, 2009).

Do ponto de vista biológico, a transferência de elétrons é fundamental para a explicação de processos essenciais à vida, como a respiração celular, a neurotransmissão e a fotossíntese. Esses e outros processos são governados ou estimulados por reações oxidorredutivas, as quais garantem funções vitais e a integridade celular, auxiliando, assim, o desenvolvimento das áreas químico-farmacêutica, farmacológica, toxicológica e biomédica, em geral (SIES, H. et al., 2017).

Novos estudos em eletroquímica estão cada vez mais voltados para os sistemas naturais a fim de compreendê-los, imitá-los ou explorá-los (SAVÉANT; CONSTENTIN, 2019). Existe uma série de semelhanças entre as reações biológicas e as eletroquímicas, tais como: a natureza heterogênea (interface eletrodo-solução, enzima insolúvel-solução); os processos podem ocorrer tanto em meio aquoso, quanto não-aquoso; em temperaturas similares; como também os processos requerem uma orientação específica dos substratos (FORTI et al., 2003). Além disso, através dos métodos eletroquímicos, é possível simular alguns parâmetros importantes do ambiente biológico, tais como: valores de pH e conteúdo de oxigênio na célula eletroquímica.

A eletroquímica molecular, mais particularmente, tem se mostrado útil para caracterizar reações redox e decifrar mecanismos reacionais associados à transferência de elétrons em compostos de interesse biológico e farmacológico. Relaciona-se fortemente com a medicina redox (SILVA et al., 2017; SQUELLA, et al., 2006).

Os potenciais de oxidação ou de redução obtidos por técnicas eletroquímicas, trazem informações sobre a viabilidade dos processos de transferência de elétrons (TE) *in vivo* ou *in* 

*vitro*. Algumas correlações já divulgadas na literatura entre *E*pc (potencial de redução catódico),  $E_m$  (potencial em meia altura de onda) ou  $E_{redox}$  (potencial redox), (*E*pc+*E*pa)/2 (para sistemas reversíveis) ou *E*pc-*E*pc/2(para sistemas irreversíveis), e atividades biológicas (DE ABREU et al.,2002; DE PAIVA et al., 2015) também corroboram com a importância de técnicas eletroquímicas na elucidação de mecanismos de compostos bioativos.

Assim, por meio da eletroquímica é possível obter dados relativos aos produtos de redução e/ou oxidação, à estabilidade dos intermediários eletrogerados e/ou interações com alvos biológicos importantes. Essas informações são relevantes para o entendimento dos mecanismos de ação biológica, em nível molecular (SOUZA, 2011).

A figura 1 reforça as possibilidades de aplicações da eletroquímica molecular para a química medicinal e biológica, bem como as interessantes associações com métodos espectofotométricos, fluorimétricos e computacionais.





Fonte: Autora desta tese, 2022.

#### 2.2 Métodos eletroquímicos

A eletroquímica está relacionada a fenômenos químicos associados à separação de cargas. Muitas vezes, esta separação leva à transferência de carga, que pode ocorrer homogeneamente em solução, ou heterogeneamente, na superfície do eletrodo (BRETT e BRETT, 1996).

As técnicas voltamétricas são muito utilizadas no estudo eletroquímico de uma grande número de compostos, inclusive quinonas e bodipys, tanto em meio aprótico, quanto em meio prótico (BRITO, 2011; WANG et al., 2010; Silva, T. L. et.al., 2016). Duas importantes técnicas eletroquímicas, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, descritas a seguir, foram de fundamental importância no desenvolvimento do trabalho.

2.2.1 Voltametria Cíclica

Os fênomenos químicos associados à transferência de elétrons ocorrem de duas maneiras: heterogênea (superficie do eletrodo) e homogênea (solução) (BRETT & BRETT, 1996).

Dentre as várias técnicas eletroquímicas existentes, a voltametria cíclica é uma das mais empregadas nas análises, pois, permite obter informações sobre as reações de transferência eletrônica, analisar a reatividade química das espécies eletrogeradas e identificar espécies presentes em solução, com a obtenção de dados cinéticos e, por fim, auxilia na elucidação do mecanismo eletródico em questão (BRETT, 1996; BARD, 1990).

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica de varredura reversa de potencial, em que o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida e, ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade. É obtido, como resposta a essa perturbação, por exemplo, um par de picos, catódico e anódico (**Tabela 1**). Portanto, em um espectro eletroquímico, o potencial no qual o processo de transferência eletrônica (TE) ocorre, pode ser facilmente obtido.



Tabela 1-Técnica de VC. Perturbação aplicada e resposta obtida.

Fonte: Adaptado de BRETT et al., 1996.

De posse dos parâmetros eletroquímicos mais importantes, ou seja, os potenciais de pico catódico e anódico ( $Ep_c e Ep_a$ ), as correntes de pico catódico e anódico ( $Ip_c e Ip_a$ ) e os potenciais de meia onda ( $Ep_{/2}$ ) pode-se analisar o processo eletródico ocorrido.

A análise da dependência do potencial e da corrente de pico com a variação da velocidade de varredura, com a concentração da substância eletroativa e a partir da adição de eletrófilos, nucleófilos ou prótons, com base em testes diagnósticos, permite obter informações importantes, como reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência eletrônica, a verificação da presença de reações químicas acopladas, de adsorção e de fenômenos catalíticos, além de se poder caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico, ou seja, difusão, migração ou convecção.

Os testes diagnósticos para a caracterização de um processo reversível estão descritos na **Tabela 2**. Na maioria das vezes, a própria feição da onda é indicativa de processo reversível: a presença de um par de picos (catódico e anódico) de mesma altura, com potenciais de pico separados por uma distância de 59/n mV (n = n° de elétrons), caso as espécies oxidada e reduzida sejam estáveis. Já, um sistema irreversível é evidenciado pela completa ausência do pico reverso, apesar de esse não ser o único critério de análise.

Tabela 2-Testes	diagnósticos en	n VC para	n processos	reversíveis (1),	irreversíveis (2)	e quase
reversíveis (3).						

Processos reversíveis	Processos irreversíveis (2)	Processos Quase-reversíveis
(1)		(3)
$\Delta E_{\rm p} = E_{\rm pa} - E_{\rm pc} = 59/n$	Ausência de pico reverso	$I_{\rm pa}/I_{\rm pc} = 1  {\rm se}  \alpha = 0,5$
mV	$ E_{\rm p} - E_{\rm p/2}  = 48/\alpha n  {\rm mV}$	$I_{\rm p} \propto v$
$ E_{\rm p} - E_{\rm p/2}  = 59/{\rm n~mV}$	$E_{\rm pc}$ desloca -30/ $\alpha$ n mV por	$E_{\rm pc}$ desloca negativamente com
$ I_{ m pa}/I_{ m pc} =1$	década de aumento de v	aumento de v
$E_{\rm p}$ é independente de v	$I_{ m pc} \propto v^{1/2}$	$\Delta E_{\rm p}=58/{\rm n}~{\rm mV}$ e aumenta com
$I_{\rm p} \propto v^{1/2}$		ν.

Fonte: Adaptado de Greef et al., 1985

A influência da velocidade de varredura sobre a corrente e o potencial, em um processo de transferência eletrônica reversível, pode ser observada na Figura 2, onde a corrente aumenta com o aumento da velocidade de varredura (GREEF *et al.*, 1985).

Figura 2-Voltamogramas cíclicos mostrando diferentes velocidades de varredura



Fonte: Adaptado de GREEF et al., 1985.

#### 2.2.2. Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica extremamente usada em medidas, a níveis de traços, de espécies orgânicas e inorgânicas. O degrau de potencial é a base deste tipo de voltametria (WANG, 2000).

As técnicas de pulso foram desenvolvidas inicialmente para o eletrodo gotejante de mercúrio, onde o objetivo era sincronizar os pulsos com o crescimento da gota e reduzir a contribuição da corrente capacitiva por amostragem da corrente no fim da vida da gota. Depois

de se aplicar o pulso diferencial, a corrente capacitiva decresce mais rapidamente que a corrente faradáica, assim, acorrente é medida no fim do pulso aplicado. Este tipo de amostragem tem a vantagem do aumento da sensibilidade, apresentando, em consequência, melhores características para aplicações analíticas (BRETT e BRETT, 1996).

Em voltametria de pulso normal (VPN), escolhe-se um valor base de potencial,  $E_{\text{base}}$ , normalmente onde não há reação faradaica, e aplica-se ao eletrodo. A partir desse valor, aplicam-se pequenos pulsos de amplitude crescente, sendo o aumento da amplitude sempre igual. A corrente é medida no fim de cada pulso, cuja duração varia normalmente entre 5 a 100 ms; o intervalo entre os pulsos é de 2-4 s.

A técnica de pulso diferencial é bastante semelhante à de pulso normal, mas com duas diferenças importantes: 1) o potencial-base é aumentado entre os pulsos, sendo esses aumentos iguais e 2) a corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no fim deste, registra-se a diferença entre as duas correntes. Como VPD é uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, isto é, um pico.

A Figura 3 ilustra o esquema (potencial *vs* tempo), para a voltametria de pulso diferencial (BRETT e BRETT, 1996).

Figura 3 - Esquema de aplicação de potenciais voltametria de pulso diferencial - VPD



Fonte: Adaptado de BRETT et al., 1996.

#### 2.2.3. Espectroeletroquímica

Em termos de praticidade, eficiência e rapidez, nas últimas duas décadas, as técnicas espectroeletroquímicas (ou seja, a associação simultânea de métodos espectroscópicos com eletroquímicos) foram exploradas em diversas aplicações, desde química inorgânica e orgânica até bioquímica. Tais combinações de técnicas eletroquímicas e espectroscópicas contribuíram para a elucidação dos mecanismos de reação de transferência de elétrons e para a compreensão

de estados moleculares fundamentais nas interfaces. As experiências espectroeletroquímicas são frequentemente usadas para caracterizar estruturalmente um estado redox intermediário, além de serem mais rápidas que a eletrólise, por exemplo (KEYES; FORSTER, 2007).

A luz na faixa UV/VIS, ou seja, de 190 a 700 nm, pode promover a excitação de estados eletrônicos em espécies atômicas e moleculares em fases gasosa e em solução, e em outros meios. Como tal, representa uma valiosa sonda da estrutura e propriedades dos materiais. A Espectroeletroeletroquímica UV/VIS refere-se coletivamente a uma ampla gama de técnicas que empregam radiação nesta frequência para o estudo das propriedades ópticas de soluções eletrônicas e eletrólitos, particularmente aquelas induzidas por mudanças no potencial aplicado entre interfaces eletrodos-soluções. Implícita nesta definição está o fato de que as medidas são realizadas *in situ*, ou seja, com o eletrodo imerso na solução sob controle do potencial. Particularmente favoráveis à investigação espectroeletroquímica UV/VIS são processos eletrodicos que geram espécies solúveis que absorvem radiação nesta região espectral, e provocam variações espaciais no índice de refração, ou nas propriedades opticas das interfaces. A dependência da absortividade molar nos comprimentos de onda do composto em análise é específico para cada cromóforo e permite identificar e monitorar as espécies envolvidas na reação eletroquímica (SCHERSON et al., 2000).

As metodologias em espectroeletroquímica UV/VIS necessitam uma configuração especial com componentes ópticos, que irradiam as soluções na cela eletroquímica e após interação com a solução eletrolítica redireciona o feixe luminoso para a detecção.

#### 2.3 Substâncias bioeletroativas, pró-fármacos e pró-fluorescentes

#### 2.3.1 Quinonas

As quinonas têm sua estrutura formada por grupos carbonila  $\alpha$ , $\beta$ -insaturados conjugados em anéis de seis membros e são produtos de oxidação de dois elétrons de 1,2- e 1,4-difenóis aromáticos (KUMAGAI et al., 2012).

Essa classe de compostos é dividida em três categorias principais, de acordo com sua estrutura molecular utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas (anel benzênico); naftoquinonas (anel naftalênico); antraquinonas (antracênico linear ou angular), respectivamente exemplificadas na Figura 4 (EL-MAGHRABEY et al., 2021; LÓPEZ et al., 2015). Com um mesmo tipo de anel, dependendo dos arranjos das carbonilas, pode-se ter diferentes tipos de quinonas. No entanto, diversos estudos mostram que estas formas isoméricas diferem consideravelmente em suas atividades físicas, químicas e biológicas, bem como nas suas propriedades farmacológicas (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; DA SILVA; FERREIRA, 2016).

Figura 4 - Benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, respectivamente



Fonte: Autora desta tese, 2022.

São muito difundidas na natureza e desempenham uma variedade de funções bioquímicas e fisiológicas (MONKSET al., 2002; ASCHEET al.,2006). São componentes da cadeia biológica de transferência de elétrons, localizada nas membranas da mitocôndria, em bactérias e em cloroplastos, e envolvidas nos processos de respiração celular e fotossíntese. De acordo com Kaurola (2016), quinonas e seus análogos constituem uma classe importante de compostos que realizam reações chave de transferência de elétrons na fosforilação oxidativa e fotofosforilação.

Além disso, o par redox Coenzima Q (quinona) e sua forma reduzida atua como um poderoso antioxidante e estabilizador de membrana, evita danos celulares resultantes de processos metabólicos normais (NAGESWARA RAO et al. 2008) e protege contra várias doenças crônicas, incluindo Parkinson e doenças cardiovasculares (CLEREN et al. 2008; PEPE et al. 2007). A vitamina K (2-metil-3-fitil-1,4-naftoquinona) é essencial para manter a vida por sua função em processos de coagulação do sangue (AHMED et al. 2007; AZHARUDDIN et al.2007; BENZAKOUR 2008), na prevenção de doenças cardiovasculares (BEULENS et al. 2008; WALLIN et al. 2008), bem como na prevenção e tratamento da osteoporose (BUGEL 2008; LANHAM-NEW 2008; WEBER 2001). Do mesmo modo, muitas quinonas são anti-inflamatórias, antibióticos, antimicrobianas antioxidantes, anticancerígenas e (HALAMOVA et al.2010).

Além destes papéis biológicos, as quinonas têm várias aplicações clínicas e industriais (Figura 5). Na quimioterapia do câncer, por exemplo, elas são consideradas o segundo grupo mais importante (ABREU et. al.,2002). Analisando mais afundo a importância das quinonas, pode-se citar o grande número de drogas que possuem aplicações práticas reconhecidas, algumas, inclusive, chegaram à produção industrial, como por exemplo, antraciclinas, daunorrubicina, doxorrubicina, mitomicina, mitoxantronas, e saintopina, todos os quais são utilizados na terapia clínica de tumores sólidos (DA SILVA et al., 2003; KOYAMA; MORITA; YAMORI, 2010).



Figura 5- Quinonas: Aplicações Clínicas e Industriais

Fonte: Autora desta tese, 2022.

No entanto, apesar dos vários efeitos benéficos mencionados, quinonas também são consideradas como uma classe de toxinas que podem causar uma variedade de efeitos nocivos sobre as células vivas, incluindo a citotoxicidade aguda, imunotoxicidade e carcinogênese (BOLTON et al., 2000; KISHIKAWA; KURODA, 2014). É esse comportamento duplo, próoxidante *versus* antioxidante, que confere a essa classe de compostos um grande interesse para os pesquisadores, especialmente na Química Medicinal.

A bioativação das quinonas pode estar envolvida com sua capacidade de induzir o estresse oxidativo. Quando as quinonas sofrem redução monoeletrônica, ocorre a formação do ânion radical semiquinona, o qual reage com o oxigênio molecular para formar o ânion radical superóxido( $O_2^{\bullet}$ ) (Figura 6). Na sequência, na presença da enzima superóxido desmutase (SOD), o ânion radical superóxido é transformado em peróxido de hidrogênio( $H_2O_2$ ). Ainda que o  $H_2O_2$  não seja um radical livre, ele pode ser responsável pela oxidação de biomoléculas devido a sua reatividade. Adicionalmente, o  $O_2^{\bullet}$  por catálise com metais de transição, em reações do tipo Fenton, ou com  $H_2O_2$ , reação de Har ber-Weiis, gera radicais hidroxilas ( $\bullet$ OH) no interior da célula que são responsáveis por danos irreversíveis a biomoléculas, como o DNA (CAVALCANTI, 2010; SILVA; FERREIRA; SOUZA,2003; SILVA,2008; MOLFETA,2007).





Fonte: Autora desta tese, 2022.

O radical semiquinona é uma espécie extremamente reativa o que favorece a ocorrência

de lesões em estruturas celulares (peroxidação lipídica, destruição de proteínas, danificação de ácidos nucléicosequebra das fitas do DNA), que podem provocar a morte celular.

Além do estresse oxidativo, as quinonas também são capazes, diretamente ou por meio de intermediários, de formar ligações covalentes com estruturas celulares (proteínas e ácidos nucléicos). A alteração da normalidade celular pode induzir a apoptose como alternativa, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo, como ocorre no *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (ZHOU M, 2020; CAVALCANTI, 2011; MOLFETA, 2007).

As naftoquinonas, particularmente, têm sido empregadas desde a antiguidade como corantes e plantas medicinais, e continuam sendo estudadas na química medicinal visando a síntese de derivados com potencial atividade contra o câncer e doenças tropicais negligenciadas. Elas possuem propriedades únicas, como por exemplo, suas características como oxidantes e eletrófilos (DE CASTRO; EMERY; JUNIOR, 2013; VIEIRA et al., 2015). Podem apresentar isomerias 1,2 ou *orto*-quinonoídica (quando as carbonilas são vizinhas) ou 1,4 ou *para*-quinonoídica (quando as carbonilas estão separadas por dois carbonos). E por apresentarem essas diversas formas isoméricas, suas propriedades físicas e químicas e sua atuação biológica diferem entre si. Um exemplo clássico é a *orto*-naftoquinona  $\beta$ -lapachona que é muito mais ativa contra formas tripamastigotas de *Trypanosoma cruzi* do que seu isômero  $\alpha$ -lapachona (SILVA;FERREIRA;SOUZA,2003;MOLFETA,2007).

Dessa forma, as naftoquinonas têm se destacado principalmente na indução da apoptose de células cancerígenas (ZAGOTTO et al., 2011; REDAELLI et al., 2015; DA CRUZ et al., 2016) e na sua ação tripanocida (PINTO; DE CASTRO, 2009; DA SILVA et al., 2013; DIOGO et al., 2013; JARDIM et al., 2016; OGINDO et al., 2016).

Portanto, é notório o aumento da demanda por pesquisas relacionadas às naftoquinonas e seus derivados sintéticos, bem como a amplitude do potencial de análises eletroquímicas que possam corroborar, prever ou explicar seus mecanismos de ação (REDAELI et al., 2015; VIEIRA et al., 2015; DA SILVA; FERREIRA, 2016; DA CRUZ et al., 2016; GONTIJO et al., 2016, DE PAIVA et al., 2015).

Recentemente, houve publicação de um artigo comentado sobre quinonas, mostrando todas as suas potencialidades, limitações e perspectivas, especialmente no tocante à eletroquímica (SILVA et al., 2020).

Em resumo, estudos eletroquímicos, em diferentes condições: aquosa/aprótica/micelar/em miméticos de membrana e de células/em mitocôndrias e outros meios, com a investigação de interações em diferentes plataformas, combinadas com dados *in*  *vitro* e *in vivo*, incluindo bioimagem, pavimentam a compreensão das ações moleculares das quinonas. Estudos contínuos são essenciais para elucidar interações tão intrincadas. Para serem realizados *in vivo*, sistemas/eletrodos devem ser, em escala manométrica, biocompatíveis, precisos e seletivos.

Estudos futuros precisam esclarecer as relações entre reatividade e ações biológicas desses compostos redox-ativos eletrofílicos e obter informações sobre os mecanismos envolvidos nos danos celulares. Apesar da importância da eletroquímica, central nos processos redox, ainda há uma distância entre eletroquímicos e bioquímicos estudiosos do estresse oxidativo.

Muitas questões relacionadas a esses campos ainda não estão claras e a busca por seletividade em relação aos agentes terapêuticos redox permanece de interesse crescente (SILVA et al., 2020).

#### 2.3.2 BODIPYS

Existem diversos estudos com produtos naturais com fluorescência endógena que incluem aminoácidos aromáticos, como o triptofano, tirosina e fenilalanina; vitaminas, como o retinol, ácido fólico; coenzimas como NADH e FAD; e pigmentos como melanina e clorofila (LAKOWICZ, J. R., 2013).

No entanto grande parte dos analitos de interesse não possuem fluorescência intrínseca, sendo necessário a aplicação de fluoróforos para realização de ensaios baseados em fluorescência. Atualmente, são vários os tipos de fluoróforos conhecidos e, em relação à diversidade estrutural, as sondas fluorescentes são principalmente pequenas moléculas orgânicas aromáticas. Contudo, outros tipos de sondas fluorescentes estão disponíveis (UENO,T.; NAGANO,T. 2011).

Compostos fluorescentes são compostos atrativos pela sua capacidade redox e têm sido amplamente utilizados como sensores químicos, corantes a laser e em aplicações terapêuticas (S. XUAN, et. al., 2017).

Para o desenvolvimento de algumas técnicas analíticas espectroscópicas que são fundamentadas na detecção de fluorescência, necessita-se de marcadores fluorescentes com características e aplicabilidades diversas e dentre vários marcadores fluorescentes disponíveis, os borodipirrometenos são os mais utilizados (BOENS et al., 2012).

Os borodipirrometenos são compostos contendo o núcleo 4,4-difluoro-4-bora-3a,4adiaza-s-indaceno, mais conhecidos por "BODIPY" (Figura 7) (BOENS, et al., 2012). A estrutura dos BODIPYs possui um núcleo formado por duas unidades pirrólicas, unidas por uma ponte metino, que estão complexadaspor meio do par de elétrons não ligantes do nitrogênio pirrólico, a um átomo de boro, (LOUDET, A.; BURGESS, K., 2007) sendo derivados pirrólicos similares a porfirinas, porfirazinas e ftalocianinas. As dipirrinas, assim como as porfirinas, são conhecidas pela capacidade de complexação com íons metálicos. As propriedades fotofísicas dos BODIPYs são superiores às de outros complexos, o que estimulou o interesse maior por essa classe, desempenhando assim, um papel importante nas ciências biológicas e químicas como quimiossensores e marcadores biológicos (TRIBS; KREUZER, 1968).

Figura 7 - Estrutura geral do Bodipy



Fonte: Autora desta tese, 2021

Os BODIPYs estão entre os fluoróforos mais conhecidos e com aplicação mais ampla. Uma das principais características dos compostos BODIPY são suas propriedades eletroquímicas ajustáveis, manipulação simples, alta sensibilidade, especificidade, baixo custo e monitoramento em tempo real (YUAN et al., 2013; TANG et al., 2015). A substituição em diferentes posições afeta o ambiente eletrônico em torno do núcleo BODIPY, causando mudanças características nos potenciais de oxidação e redução.

A descoberta desse núcleo fluorescente ocorreu em 1968, quando Treibs e Kreuzer, (TRIBS; KREUZER, 1968) na tentativa de realizar a acetilação do 2,4-dimetilpirrol com anidrido acético e BF3·Et2O, obtiveram um produto desconhecido fluorescente. A estrutura desse composto inesperado foi elucidada como sendo o primeiro BODIPY. No entanto, embora conhecidos desde o final da década de1960, são poucos os estudos científicos abordando esse grupo de compostos publicadas nas duas décadas seguintes.

Desde a sua descoberta, vários estudos de métodos analíticos buscando sua modificação estrutural foram desenvolvidos. Essas modificações tornam-se necessárias na estrutura química do BODIPY para a síntese de sondas fluorescentes para aplicações específicas (REZENDE, 2016).

Os BODIPYs possuem outras características que são típicas desse composto, brilho intenso, relativa estabilidade, bem como solubilidade em solventes orgânicos e em geral não formam agregados, além de sua ampla aplicação como sondas fluorescente. No geral, observase um pico intenso de absorção na região visível do espectro eletromagnético referente à transição S<sub>0</sub>-S<sub>1</sub> ( $\pi$ - $\pi$ \*) entre 500 e 525 nm (coeficiente de absortividade molar entre 40.000 a 80.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). A transição vibracional 0-1 é em geral observada como um ombro do pico principal e a transição S<sub>0</sub>-S<sub>2</sub> pode ser observada como uma banda larga e pouco intensa de absorção abaixo de 480 nm. A emissão é observada como um pico fino e intenso com desvio de Stokes pequeno (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2014).

Os corantes a base de BODIPY podem ser fotoexcitados com luz visível e mostram absorção estreita e bandas de emissão com altas intensidades de pico. E, eles são passíveis de modificação estrutural para que suas propriedades espectroscópicas possam ser ajustadas com a introdução substituintes adequados nas posições corretas (ROHAND et al., 2006). Esses ajustes podem ser feitos durante a síntese, utilizando grupos estabilizadores ligados ao grupo funcional aldeído com o propósito de aumentar a estabilidade e o rendimento reacional de obtenção do produto desejado, onde, o grupo "R" do aldeído utilizado na síntese é um anel benzênico diclorado. No entanto, é muito importante conhecer as diferentes estruturas eletrônicas e a intensidade de seu caráter aromático, para entender sua reatividade redox.

Este trabalho propõe dois estudos de casos, o primeiro baseado no estudo eletroquímico de várias quinonas modificadas, onde se fez uma relação estrutura, eletroatividade e atividade tripanocida. O segundo relata a investigação de três compostos, 8-Fenil-BODIPY (composto 1), 6-nitrosil-8-fenil-BODIPY (composto 2) e 5-nitrosil-8-fenil-BODIPY (composto 3), onde há interesse particular em analisar os efeitos da localização do grupo nitrosil na reatividade e estabilidade eletroquímica, pois isso pode influenciar suas aplicações, por exemplo, em ensaios *in vivo*. São apresentados os dois artigos resultantes deste trabalho.

#### **3 OBJETIVOS**

#### 3.1 Geral

Investigar o comportamento eletroquímico de substâncias de interesse medicinal tais como quinonas híbridas e compostos fluorescentes e obter dados sobre o mecanismo de redução e oxidação, e interação com alvos biológicos importantes, na perspectiva de corroborar, explicar ou prever o mecanismo molecular de ação biológica.

### 3.2 Objetivos Específicos

Investigar o comportamento eletroquímico de quinonas híbridas e compostos fluorescente derivados de BODIPY, em meio aprótico, por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, visando a obtenção de dados sobre o mecanismo de redução e oxidação para elucidação do mecanismo molecular de ação biológica;

Investigar e caracterizar intermediários eletrogerados por meio de espectroeletroquímica;

Buscar, por meio de estudos computacionais, ampliar as informações relativas aos processos redox a fim de elucidar os mecanismos moleculares de redução e oxidação e a ação biológica dos compostos estudados;

Estabelecer correlações entre os dados eletroquímicos e os dados biológicos dos compostos de interesse.

#### **4 EXPERIMENTAL**

#### **4.1 Reagentes e solventes**

Os compostos de interesse biológico estudados neste trabalho foram as quinonas híbridas (quinonas acriladas), e derivados BODIPY.

As quinonas acriladas (**Tabela 3**), cuja descrição das respectivas sínteses pode ser encontrada na literatura (VIEIRA et al, 2015) foram planejadas e sintetizadas no Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade Federal de Minas Gerais e cordialmente cedidas para os estudos eletroquímicos pelo professor Dr. Eufrânio Nunes da Silva Júnior (UFMG). Todas elas foram caracterizadas por métodos fisicoquímicos de análise e sua pureza atestada por diferentes métodos.

Os derivados BODIPY (**Tabela 4**), por sua vez, foram planejados e sintetizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e cordialmente cedidos para os estudos eletroquímicos pelo professor Dr. Flavio S. Emery (USP-Ribeirão Preto). Todas as suas características fotofísicas e estruturais foram publicadas recentemente, As respectivas purezas foram atestadas por diferentes métodos e verificadas utilizando-se cromatografia em fase delgada.

Tabela 3 - Estruturas químicas das quinonas acriladas em estimation	studo.
---	--------

( <i>E</i> )-Metil 3- (5,8-dioxo- 5,8-di-hidronaftalen-1- il) acrilato (3b)	(2 <i>E</i> , 2′E) -Dimetil 3,3 ′ - (5,8-dioxo-5,8-di- hidronaftaleno-1,4-diil) diacrilato (3b')	( <i>E</i> )-Etil 3- (7-cloro-6-metoxi- 5,8-dioxo-5,8-di-hidronaft- alen-1-il) acrilato (3c)
MeO O 3b (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz)	MeO O MeO O 3b' (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz)	EtO O CI O Me O CI O Me CI CI O Me





Tabela 4- Estruturas químicas dos derivados BODIPY em estudo.



#### 4.2 Estudos Eletroquímicos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT-30 da Metrohm Autolab<sup>®</sup> (Eco Chemie, Holanda) acoplado a um microcomputador controlado pelo software GPES (General Purpose Electrochemical Software) 4.9. As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional em um sistema de três eletrodos (Figura 8).

Como eletrodo de trabalho utilizou-se eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 cm); como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina espiralado e, como eletrodo de referência foi utilizado o sistema Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> (saturado) (Figura 8). O eletrodo de carbono vítreo foi polido com alumina sólida (3  $\mu$ m) e, posteriormente, lavado com água deionizada e imerso em acetona, sendo levado ao ultrassom por 30 s para a remoção de partículas residuais.

Para a verificação da área eletroativa do eletrodo, foram realizados testes em solução de  $(K_3[Fe(CN)_6]/(K_4[Fe(CN)_6].3H_2O) \ 1 \ \text{mmol} \ L^{-1} \ \text{em} \ \text{KCl} \ 0,1 \ \text{mol} \ L^{-1}, \ \text{através} \ \text{de voltametria}$  cíclica, na faixa de potencial de 0,3 V a -0,6 V vs eletrodo de referência Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup>(3 mol L<sup>-1</sup>) com velocidade de varredura de 0,1 V s<sup>-1</sup>.

Nos experimentos de voltametria cíclica, variou-se a velocidade de varredura de 10 a  $500 \text{ mVs}^{-1}$  nas direções anódicas e catódicas, na voltametria de pulso diferencial a velocidade de varredura foi de 5 mVs<sup>-1</sup>.

As medidas foram realizadas à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Para estudos de redução, antes do ensaio voltamétrico foi necessário desoxigenara célula com um fluxo de argônio durante 10min, posteriormente, o fluxo de argônio foi mantido sobre a superfície das soluções para evitar a presença de oxigênio. O tratamento dos gráficos foi realizado por meio do programa Origin 8.0.





Fonte: Autora desta tese, 2022.

#### 4.2.1 Estudos eletroquímicos em meio aprótico

O estudo eletroquímico em meio aprótico foi realizado utilizando os solventes *N*,*N*dimetilformamida (DMF), acetonitrila (ACN) e como eletrólito de suporte hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF<sub>6</sub>, 0,1 mol L<sup>-1</sup>).

### 4.3 Experimentos espectroeletroquímicos

Os experimentos espectroeletroquímicos foram realizados em uma célula eletroquímica de quartzo de camada fina com comprimento de caminho óptico de 1 mm (BASi) constituído por um sistema de três eletrodos consistindo em uma mini rede de Pt opticamente transparente como eletrodo de trabalho, um fio de Pt como contra-eletrodo e um Ag| AgCl |Cl<sup>-</sup>como eletrodo de referência (saturado). A célula foi conectada ao potenciostato e os espectros foram obtidos usando um espectrofotômetro Hewlett Packard 8453 (Silva et al., 2019). (T. L. Silva, J. C. S. da Silva, D. J. P. Lima, F. R. Ferreira, C. C. de Vasconcelos, D. C. Santos, C. D. Netto, P. R. R. Costa, M. O. F. Goulart, *J. Braz. Chem. Soc.*2019, *30*, 2438–2451.). As medidas foram realizadas em soluções desoxigenadas em DMF ou ACN + TBAPF<sub>6</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). O tratamento posterior dos gráficos foi realizado por meio do programa Origin 8.0.

#### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1 CASO 1: Estudo Eletroquímico das quinonas acriladas

A problemática do caso 1 é a doença de Chagas e as drogas utilizadas para tal doença, onde a maioria apresenta efeitos colaterais indesejáveis e também sofre importantes limitações de sua atividade, principalmente em pacientes crônicos, daí a necessidade do desenvolvimento contínuo de novas drogas tripanocidas.

Após síntese desses novos compostos (Tabela 3), foram investigadas sete substâncias com atividade tripanocida pronunciada (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados de IC<sub>50</sub> dos compostos estudados

Compounds	IC <sub>50</sub> /24 h <sup>[a]</sup> (μM)
3a	63.4 ± 6.3
3Ь	90.5 ± 8.9
ЗЬ'	188.7 ± 2.7
3c	95.3 ± 11.8
3d	>1000.0
3d'	>1000.0
3e	>1000.0
3f	>1000.0
3g	$114.0 \pm 5.8$
3g'	>1000.0
3h	$323.6 \pm 4.0$
3h'	344.8 ± 76.7
3i	>1000.0
3j	>1000.0
3k	>1000.0
Benzindazole	103.6 ± 0.6 <sup>[33a]</sup>

[a] Mean ± SD of at least three independent experiments.

A tabela acima mostra os resultados de  $IC_{50}$  dos compostos estudados. Pela análise dos resultados, observamos que os compostos 3h e 3h', foram moderadamente ativos contra o parasita. Em contraste o composto 3g, demonstra que a substituição do grupo etila por um grupo metila na porção acrilato pode melhorar a atividade tripanocida, com valor de  $IC_{50}$  próximo ao do medicamento benzindazol, medicamento padrão que serviu como controle positivo e composto de referência.

Os compostos 3a, 3b e 3c apresentaram atividade semelhante à observada para o medicamento de referência. Notou-se, também, que a presença do cloro é importante para o potencial tripanocida dos compostos.

Em geral, a inserção de grupos doadores de elétrons, como metoxi, metil, ou amina, diminuíram a atividade tripanocida dos compostos e na maioria dos casos, as substâncias mostraram-se inativas.

Através das diferenças observadas entre os vários grupos de quinonas modificadas, empregou-se a eletroquímica para coletar informações sobre uma possível relação estruturaeletroatividade e atividade tripanocida.

Foi utilizada voltametria cíclica como uma técnica confiável e informativa para investigar e eventualmente classificar esses compostos. A maioria dos voltamogramas cíclicos dos compostos sob investigação, exibiram na parte de redução, um total de três picos, os dois primeiros com transferência quase-reversível de um elétron ( $\Delta EpIc/EpIa > 60mV$ ) e natureza controlada por difusão, e o terceiro, com uma corrente maior e natureza eletroquímica irreversível (Figura 9). Os dois primeiros picos correspondem à porção quinona por transferências consecutivas de um elétron, e o terceiro, à redução da dupla ligação da função acrilato.

Figura 9 – Voltamogramas Cíclicos das naftoquinonas acriladas (Tabela 3), em DMF + TBAPF<sub>6</sub> (0.1 mol L<sup>-1</sup>), ECV,  $\nu = 100$  mV s<sup>-1</sup>. Direção catódica, varreduras sucessivas e varredura no potencial de inversão. Direção catódica.








Fonte: Autora desta tese, 2021.

Com base nos dados eletroquímicos resumidos na **Tabela 6**, torna-se aparente que existem diferenças significativas nos comportamentos eletroquímicos derivados de diversos substituintes e seus efeitos eletrônicos no centro ativo da quinona redox. Os compostos aminados 3i - 3k, por exemplo, possuem menor capacidade de redução em relação aos outros, devido ao efeito doador de elétrons do grupo amino.

Após a inversão em potenciais para mais negativos, abaixo de -2,5 V, as ondas de oxidação em potenciais mais positivos aparecem com menor intensidade. Comparando os potencias dos picos e respectivas correntes, no caso das metoxiquinonas (3e e 3f), um ligeiro deslocamento catódico é observado, em relação aos outros substituintes. O comprimento do grupo alcoxil não influencia os dois primeiros picos, enquanto o terceiro elétron, o processo de transferência é deslocado, dependendo da cadeia de carbono, sendo o processo mais difícil, para os de cadeisas mais longas. Uma tendência semelhante é observada para compostos substituídos pelo grupometil. A presença de dois grupos metoxi adjacentes, no composto 3d, facilita o processo de redução. Tem um efeito inverso, possivelmente devido a efeitos estéricos.

De particular interesse, a quinona 3c paresenta um pico de potencial de redução bastante elevada e picos de potenciais de oxidação associados com o cloro substituído. Em total contraste com os substituintes com grupos doadores de elétrons mencionados acima. Tais como grupo amina e metoxi, a presença do cloro que retira elétrons facilita a redução de quinona, conforme observado para os compostos 3b'e 3c (**Tabela 6**). Após a comparação entre os picos de potenciais de redução e atividades biológicas, é notável que estas quinonas mais eletrofílicas não foram apenas associadas com os potenciais eletroquímicos mais positivos, eles também apresentaram as maiores atividade tripanocida (IC<sub>50</sub> / 24 h, inferior a ~ 300 mol L <sup>-1</sup>), com exceção de 3g. Apesar de uma correlação aparente entre o presença de um grupo de retirada de elétrons, como o cloro, um redução mais positiva e potencial de oxidação e um maior atividade biológica e, portanto, mais promissora na luta contra Trypanosomacruzi, também há uma faixa ideal para o potencial de redução. No meio aprótico empregado, todos os compostos, com valores de potencial de redução de primeira onda (Ep1c), em torno de -0,5 V ou mais positivo, estavam ativos.

Esses compostos podem ser considerados como altamente oxidante no contexto biológico e, não surpreende sua capacidade de atacar moléculas biológicas. Esses resultados apontam que os compostos investigados agem por meio de um mecanismo redox, e enquanto a eletroquímica em um solvente aprótico, como DMF, pode não refletir todos os processos que ocorrem em uma célula de ambiente aquosa, os alvos precisos e mecanismos de ação precisam ser investigados com mais detalhes, a modulação redox parece estar no centro desta atividade.

**Tabela 6-**Principais parâmetros eletroquímicos em VC da naftoquinonas alquiladas (c = 1 mmol L<sup>-1</sup>), em DMF + TBAPF<sub>6</sub>, 0,1 mol L<sup>-1</sup>, v = 100 mV s<sup>-1</sup>.



Composto	EIc	EIIc	EIIIc	EIVc	EIa	EIIa	EIIIa
3i(A) R <sup>1</sup> =Et	-0.811	-1.450	-2.057		-0.736	-1.375	-0.412
3k (A) R <sup>1</sup> =Bn	-0.810	-1.450	-2.040		-0.727		-0.423
3j (A) (R <sup>1</sup> =Me)	-0.809	-1.448	-2.059		-0.735	-1.375	-0.427
3e (B) (R <sup>1</sup> =R <sup>3</sup> =OMe,R <sup>2</sup> =H.R <sup>4</sup> =Et)	-0.744	-1.287	-2.089		-0.669	-1.193	
3h'(C) (R <sup>1</sup> =Me,R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =Et)	-0.679	-1.333	-2.088		-0.598	-1.252	
3f (B) ( $R^1 = R^3 = H, R^2 = OMe,$ $R^4 = Et$ )	-0.672	-1.321	-2.049		-0.603	-1.248	
3h(B) (R <sup>1</sup> =R <sup>3</sup> =H, R <sup>2</sup> =Me,R <sup>4</sup> =Et)	-0.623	-1.331	-2.078		-0.544	-1.248	
3d(B) (R <sup>1</sup> =H,R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =OMe, R <sup>4</sup> =Me)	-0.623	-1.341	-2.185		-0.535	-1.213	
3g (B) (R <sup>1</sup> =R <sup>3</sup> =H, R <sup>2</sup> =Me,R <sup>4</sup> =Me)	-0.618	-1.316	-2.048		-0.535	-1.218	
3d'(C) (R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OMe, R <sup>3</sup> = Me)	-0.578	-1.254	-1.632	-2.034	-0.511	-1.126	-1.509
3g' (C) (R <sup>1</sup> =Me, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =Me)	-0.564	-1.267	-1.907	-2.195	-0.476		
3b (B) ( R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =H, R <sup>4</sup> =Me)	-0.530	-1.238	-2.107				

Fonte: autora desta tese, 2022

# 5.2 CASO 2: Decorando o BODIPY com o grupo eletroatraente -NO: consequências espectroeletroquímicas e investigação computacional

Examinamos e comparamos os parâmetros eletroquímicos e o comportamento espectroeletroquímico dos compostos derivados BODIPY 1-3 (Tabela 4) com suas atividades biológicas já reportadas e, em seguida, realizamos um estudo computacional das moléculas individuais, com o objetivo de racionalizar os mecanismos redox para os três compostos.

A seguir, serão apresentados os dois artigos na íntegra em anexo.



## CASO I

## DOI: 10.1002/ejoc.201900004

## C–H Activation

## Ruthenium(II)-Catalyzed C–H Alkenylation of Quinones: Diversity-Oriented Strategy for Trypanocidal Compounds

Gleiston G. Dias,<sup>[a,e]</sup> Tamires A. do Nascimento,<sup>[b]</sup> Andresa K. A. de Almeida,<sup>[b]</sup> Ana Cristina S. Bombaça,<sup>[c]</sup> Rubem F. S. Menna-Barreto,<sup>[c]</sup> Claus Jacob,<sup>[d]</sup> Svenja Warratz,<sup>[e]</sup> Eufrânio N. da Silva Júnior,\*<sup>[a,e]</sup> and Lutz Ackermann\*<sup>[e]</sup>

**Abstract:** Ruthenium(II)-catalysis enabled C–H alkenylations of unactivated naphthoquinones for the preparation of A-ringmodified naphthoquinoidal compounds with activity against *Trypanosoma cruzi*, the parasite causing Chagas disease. The present study encompasses C–H alkenylation by weak *O*-coordination by means of ruthenium(II carboxylates. This method provided an efficient and versatile tool towards a diversity-oriented strategy for the preparation of compounds with a relevant biological profile.

## Introduction

Chagas disease is a parasitic infection caused by the haemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* and is classified as one of the most neglected tropical diseases, with approximately 8 million people being infected today and more than 10,000 deaths every year.<sup>[1,2]</sup> This illness causes significant mortality and morbidity associated with poverty in populations of endemic countries in Latin America. At the same time, an increase in the number of cases is observed in Europe and particularly the United States, among other areas, largely derived from the migratory flux of infected individuals.<sup>[3–5]</sup>Chagas disease presents two very distinct clinical phases: An acute stage characterized by a high bloodstream parasitemia within the short period after the infection, without remarkable and specific symptoms, and a chronic phase defined by patent parasitemia, the absence of symptoms, positive serology, and normal electrocardiographic and radiologic exams.<sup>[6,7]</sup> After decades in the indeterminate chronic phase, 20–30

% of the patients progress to a symptomatic stage, consisting of cardiac and digestive manifestations and, more rarely, polyneuropathy.<sup>[8]</sup> Up to now, the clinical chemotherapy available for Chagas disease is based on benznidazole and nifurtimox, which are strongly effective in acute cases, but controversial for the treatment of the chronic phase.<sup>[9]</sup> Furthermore, these nitroderivatives present undesirable side effects and also suffer from important limitations of their activity, particularly in symptomatic chronic patients. These limitations, call for the continuous development of novel trypanocidal drugs.<sup>[10,11].</sup> During the last couple of years, several research groups have dedicated their efforts towards the synthesis and identification of novel naphthoquinoidal compounds with potent trypanocidal activity.<sup>[12-</sup> <sup>15]</sup> The groups of Bolognesi,<sup>[12]</sup> de Castro,<sup>[13]</sup> Salas,<sup>[14]</sup> and da Silva Júnior,<sup>[15]</sup> for instance, have described the synthesis and evaluation of quinonoid compounds based on the modification of A- and B-rings of naphthoquinones (Scheme 1A). Simple modifications to the B-ring of the quinoidal system are viable via Michael addition reactions.<sup>[16]</sup> even in an asymmetric fashion.<sup>[17]</sup> The modification of the benzenoid A-ring of the 1,4-naphthoquinone (1,4-NQs), in contrast, involves the prior construction of the functionalized quinoidal system via oxidation reactions<sup>[18]</sup> or extended synthetic routes with the preparation of an A-ring-substituted quinone via various steps.<sup>[19]</sup> In this case, new modular strategies for direct A-ring-modifications are highly warranted.<sup>[20]</sup>

In this context, the da Silva Júnior and Bower groups have described the application of the [RhCp\*Cl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> catalyst to the direct *ortho*-functionalization of 1,4-NQs with different electrophilic sources.<sup>[21]</sup> Following the same strategy, the da Silva Júnior group has demonstrated the value of this method for sequential C–H iodination/thiolation of 1,4-NQs.<sup>[22]</sup> These methods provided access to quinones with potent trypanocidal activity.<sup>[22,23]</sup> Recently, the da Silva Júnior and Ackermann groups joined forces to prepare hydroxylated quinones via ruthenium-catalyzed C–H oxygenation reactions. An investigation of the biological potential of the resulting quinones indicated a remarkable trypanocidal activity.<sup>[24]</sup>



Scheme 1. Overview.

Likewise, the groups of Sun and Zhang<sup>[25]</sup> have also documented C-5 alkenylation of 1,4-NQs by using [RhCp\*Cl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> as catalyst and electrophilic acrylates in moderate yields. Despite this major advance, the methodology is associated with an important drawback, since it is necessary to install an amino group in the C-2 position to enhance the substrate-metal coordination and thus enable the catalytic reactions (Scheme 1B). These findings encouraged us to develop a novel strategy, which encompasses the search for new alkylated quinones with potential trypanocidal activity.

Given our recent success in terms of ruthenium-catalyzed C–H alkenylation with a wide range of directing groups, such as aryl carbamates, anilides and benzamides, aromatic esters, phenols, sulfonic acids, triazole and acetamides, among others (Scheme 1C),<sup>[26]</sup> we now report an efficient strategy for the diversity-oriented installation of alkenyl groups in a broad range of 1,4-naphthoquinones. For the first time, a C–H alkenylation strategy was thus established by employing ruthenium(II) catalysts for

the synthesis of naphthoquinoidal derivatives with considerable activity against the parasite that causes Chagas disease (Scheme 1D). In addition, we investigated the electrochemical parameters of the obtained compounds to establish key aspects of a possible structure-redox-activity relationship, which rationalizes the trypanocidal activity of the compounds.

## **Results and Discussion**

Our initial attempts involved the reaction of 1.4-naphthoguinone (1a) with a  $[RuClCp(PPh_3)_2]/AgSbF_6$  catalyst, ethyl acrylate (2a) as the alkenylating reagent and Cu(OAc)\_2 as the oxidant (Table 1, entry 1). Here, the C-5 alkenvlation was achieved in only 8 % yield. While obtaining the desired product **3a**, we continued our efforts towards alternative ruthenium-based catalysts. Hence, [RuClCp\*(COD)], Shvo's catalyst,  $RuCl_2(PPh_3)_3$ ,  $Ru(OAc)_2(PPh_3)_2$ ,  $Ru(OPiv)_2(PPh_3)_2$ , Ru(O<sub>2</sub>CAd)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (entries 2–7) were also evaluated as the ruthenium source, albeit with no success. Within this context, we also tested  $Ru(O_2CMes)_2(p-cymene)$  as catalyst and the desired product was obtained in 18 % yield (entry 8). Finally, 1,4-naphthoquinone (1a) with a [RuCl<sub>2</sub>(*p*-cymene)]<sub>2</sub>/AgSbF<sub>6</sub> catalyst and  $Cu(OAc)_2$  as oxidant enabled the preparation of **3a** in 33 % yield (entry 9). Increasing the catalyst loading and using different solvents, for instance, dioxane, toluene, and DMA, did not lead to any further improvement (entries 10-12).

Table 1. Optimization of C–H alkenylation of 1,4-naphthoquinone (1a).

			ÇO₂Et	CO <sub>2</sub> Et	
<b>P</b>	O CO <sub>2</sub> Et (2a, X eo [Ru]-source AgSbF <sub>6</sub> (Y equiv)	CO <sub>2</sub> Et (2a, X equiv) [Ru]-source AgSbF <sub>6</sub> (Y equiv)		. 🌂	ľ
	Cu(OAc) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O (2.0 e O Solvent (0.1 M), 110 °C 1a	quiv) C, 18 h	U 3a	R= 100	O 3a' CO₂Et
Entry	[Ru]-source (mol%)	Solvent	AgSbF <sub>6</sub> (Y equiv)	(2) (X equiv)	Yield 3a/3a'
1	[RuClCp(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] (2)	DCE	0.16	1.2	8/0
2	[RuClCp*(COD)] (2)	DCE	0.16	1.2	NR
3	Shvo's catalyst (2)	DCE	0.16	1.2	NR
4	RuCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (5)	DCE	-	3.0	NR
5	Ru(OAc) <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)	DCE	-	3.0	NR
6	Ru(OPiv) <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)	DCE	-	3.0	NR
7	Ru(O <sub>2</sub> CAd) <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (5)	DCE	-	3.0	NR
8	Ru(O <sub>2</sub> CMes) <sub>2</sub> (p-cymene) (5)	DCE	0.16	1.2	18/0
9	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (2)	DCE	0.16	1.2	33/0
10	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	Dioxane	0.16	1.2	15/0
11	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	PhMe	0.16	1.2	NR
12	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	DMA	0.16	1.2	13/0
13	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	DCE	0.40	1.2	36/0
14	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	DCE	0.60	1.2	38/0
15	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	DCE	1.00	1.2	42/0
16	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	DCE	1.20	3.0	30/18
17	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	DCE	1.40	3.0	45/27
18	$[RuCl_2(p-cymene)]_2$ (5)	DCE	1.60	3.0	48/35
19	$[RuCl_2(p-cymene)]_2$ (5)	DCE	2.00	3.0	48/38
20	[RuCl <sub>2</sub> (p-cymene)] <sub>2</sub> (5)	DCE	1.00	3.0	50/40
21	-	DCE	-	3.0	NR

Reaction conditions: **1a** (0.40 mmol), **2a** (1.2 or 3.0 equiv), catalysts (2.0-5.0 mol %), AgSbF<sub>6</sub> (0.10-2.00 equiv), Cu(OAc)<sub>2</sub> (2.0 equiv), solvent (2.0 mL), 110 °C, 18 h. NR = For all cases starting material was recovered. Yields of isolated products.

However, the use of 1,2-dichloroethane as solvent and increasing the loading of  $AgSbF_6$  resulted in an improved yield (entries 13–15), and product **3a** was thus efficiently obtained. Following a diversityoriented strategy for the preparation of new derivatives with antiparasitic potential for subsequent biological studies, we employed 3.00 equivalents of ethyl acrylate (**2a**), which led to the formation of *mono*-alkenylated 1,4-NQ **3a** and *bis*-olefinated product **3a**' (entry 16). After further fine tuning, functionalized derivatives **3a** and **3a**' were obtained in 50 % and 40 % yield, respectively, with an overall yield of 90 % (entry 20).

To investigate the viable scope of the C–H alkenylation, the method was employed for the synthesis of several substituted 1,4-naphthoquinones with representative alkenes **2** (Scheme 2).

For 1,4-naphthoquinone (1a), the reaction with methyl acrylate (2b) provided similar results when compared to ethyl acrylate (2a), with a slight decrease in the amount of the *bis*-alkenylated product, and derivatives **3b** and **3b**' were obtained in 48 % and 18 % yield, respectively. When methoxylated-chlorinated naphthoquinone 1c and ethyl acrylate 2a was employed, the product **3c** was obtained in 45 % yield.

The reaction of 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (1d) with methyl acrylate (2b) resulted in the formation of mono- and *bis*-acrylated products 3d and 3d', with an overall yield of 58 % and a predominance of the di-substituted product 3d'. The reaction with substrate 1e, featuring an electron-donating methoxy group in both benzenoid and dicarbonyl rings and ethyl acrylate (2a) provided derivative 3e in 35 % yield. In the case of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (1f), the C–H alkenylation reaction with alkene 2a resulted in the product 3f in 68 % yield.

The reaction with menadione and methyl acrylate (2b) led to products 3g and 3g' in 73 % total yield with a predominance for the mono-alkylated product 3g. Ethyl acrylate (2a) provided nearly the same results yet with a reduced quantity of the *bis*acrylated product (derivatives 3h and 3h', 44 % and 14 % yield, respectively). Structural assignments were based on detailed NMR spectroscopy analysis and X-ray diffraction of products 3d, 3f, 3g, and 3h.

Notably, an amino-naphthoquinone was also exposed to the C–H alkenylation reaction and similar regioselectivity were observed in comparison with 2-methoxy-1,4-naphthoquinone. Ethyl-, methyl- and benzyl-acrylates (**2a**, **2b**, and **2d**) were successfully employed, resulting in moderate yields for preparing compounds **3i–3k** (Scheme 3).

Considering on the working mode of the ruthenium catalysis, and based on previous reports,<sup>[26,27]</sup> and those of others,<sup>[28]</sup> a plausible catalytic cycle can be proposed, which is initiated by a carboxylate-assisted C–H ruthenation,<sup>[27]</sup> affording the ruthena(II)cycle (**A**) via initial coordination of the metal and by the quinoidal system. Then, a migratory insertion of the olefin occurs to provide the intermediate (**B**), followed by a -hydride elimination which allows the formation of the desired product **3**. Subsequently, reductive elimination and reoxidation of the ruthenium(0) intermediate by  $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$  regenerates the active species of the ruthenium(II) carboxylate (Scheme 4).

The compounds obtained by our new method are structurally similar to the naphthoquinones that we, and others, have synthesized and evaluated during the last few years against clinical targets, such as cancer,<sup>[29]</sup> malaria,<sup>[30]</sup> leishmania<sup>[31]</sup> and tuberculosis,<sup>[32]</sup> i.e. diseases with an inherently disturbed intracellular redox-balance. Since parasitic pathogens tend to be particularly sensitive to redox-attacks on their cellular thiolstat, we have therefore investigated the new compounds against *Trypanosoma cruzi*<sup>[33]</sup> and have identified seven substances with a rather pronounced trypanocidal activity.

Compounds **3h** and **3h**' with an IC<sub>50</sub> = 323.6 and 344.8  $\mu$ M were active against the parasite, albeit only moderately. The naphthoquinone **3g**, in contrast, presented IC<sub>50</sub> = 114.0  $\mu$ M, demonstrating that the replacement of the ethyl for a methyl group in the acrylate moiety may improve the trypanocidal activity considerably. Interestingly, the IC<sub>50</sub> value of this com pound is close to the one of benznidazole (IC<sub>50</sub> =

103.6  $\mu$ M),<sup>[33a]</sup> one of the standard drugs for the treatment of Chagas disease in the clinic which also served as positive control and benchmark in this study.

Amazingly, the activity of compounds **3a**, **3b**, and **3c** even exceeded the one of the marketed drug benznidazole, with IC<sub>50</sub> values in the range of 63.4 to 95.3  $\mu$ M. Overall, these derivatives presented activities similar to the one observed for benznidazole. Our studies have also demonstrated that the presence of the chlorine atom is important for the trypanocidal potential of the compounds. In general, insertion of electron-donating groups, for instance, methoxy, methyl or amine groups, decreased the trypanocidal activity of the compounds and in most cases, the substances were inactive. *Bis*-acrylated products presented low trypanocidal activity with the exception of **3b**' which was able to affect *T. cruzi* with IC<sub>50</sub> = 188.7  $\mu$ M, respectively. (Table 2).

Amazingly, the activity of compounds **3a**, **3b**, and **3c** even exceeded the one of the marketed drug benznidazole, with IC<sub>50</sub> values in the range of 63.4 to 95.3  $\mu$ M. Overall, these derivatives presented activities similar to the one observed for benznidazole. Our studies have also demonstrated that the presence of the chlorine atom is important for the trypanocidal potential of the compounds. In general, insertion of electron-donating groups, for instance, methoxy, methyl or amine groups, decreased the trypanocidal activity of the compounds and in most cases, the substances were inactive. *Bis*-acrylated products presented low trypanocidal activity with the exception of **3b**' which was able to affect *T. cruzi* with IC<sub>50</sub> = 188.7  $\mu$ M, respectively. (Table 2).

The differences in activity observed between the various modified quinones raised the question, if there may be an underlying structure-activity relationship connected via the individual redox properties of these compounds. Indeed, similar structure-redox-biological-activity relationships have been observed in the past for related biological active redox modulators, such as selenium- and tellurium-based substances, including certain phenol and quinone derivatives.<sup>[34]</sup>

We have, therefore, employed cyclic voltammetry as a reliable and informative method to investigate and eventually to "rank" these compounds. The majority of the cyclic voltammograms (CVs) of the compounds under investigation displayed in the relevant reduction part, a total of three reduction peaks, the first two with quasi-reversible one electron transfer ( $\Delta EpIc/EpIa > 60$  mV) and diffusion-controlled nature (peak current  $\propto to v^{1/2}$ ) and the third one, with a larger current and irreversi ble electrochemical nature (Figure 1).

Table 2. Activity of naphthoquinones on trypomastigote forms of T. Cruzi.



Scheme 2. Scope of the C–H alkenylation of naphthoquinones and ORTEP-3 projections of **3d**, **3f**, **3g** and **3h**, showing the atom numbering and displacement ellipsoids at the 50 % probability level.



Scheme 3. C–H Alkenylation of amino-naphthoquinones 1.



Scheme 4. Mechanism proposed for C–H alkenylation of naphthoquinones.

Compounds	IC <sub>50</sub> /24 h <sup>[a]</sup> (µM)			
3a	63.4 ± 6.3			
3b	90.5 ± 8.9			
3b'	188.7 ± 2.7			
3c	95.3 ± 11.8			
3d	>1000.0			
3d'	>1000.0			
3e	>1000.0			
3f	>1000.0			
3g	114.0 ± 5.8			
3g'	>1000.0			
3h	323.6 ± 4.0			
3h'	344.8 ± 76.7			
3i	>1000.0			
3j	>1000.0			
3k	>1000.0			
Benzindazole	103.6 ± 0.6 <sup>[33a]</sup>			

[a] Mean ± SD of at least three independent experiments.

The first two peaks correspond to the reduction of the quinone moiety by consecutive one-electron transfers, and the third one, sometimes broad, to the reduction of the double bond of the acrylate function (Table 3). For illustration, the CV of compounds **3h** is provided as representative in Figure 1, and the various electrochemical potentials are listed in Table 3. CVs. for all compounds studied were inserted in the Supporting Information file.



Figure 1. Cyclic voltammograms of **3h** (1 mM) in DMF + TBAPF<sub>6</sub> (0.1 M), glassy carbon electrode, v = 0.1 V s<sup>-1</sup>. Several inversion potentials, with change of colors. Cathodic direction.

Based on the electrochemical data summarized in Table 3, it becomes apparent that there are significant differences in the electrochemical behavior derived from diverse substituents and their electronic effects on the redox active quinone centre. The aminated compounds 3i-3k, for instance, are reduced less readily compared to the other ones, due to the electron-donating effect of the amino group. After inversion at potentials to more negative than -2.5 V, oxidation waves at more positive potentials appear, with lower intensity (see SI).

Table 3. Major electrochemical parameters of the alkylated naphthoquinones (c = 1 mmol L<sup>-1</sup>), using cyclic voltammetry, on GCE, in DMF + TBAPF<sub>6</sub> (0.1 mol L<sup>-1</sup>), vs. Ag/AgCl, Cl<sup>-</sup>, using Pt as the auxiliary electrode,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .<sup>[a]</sup>

ço;	₂R <sup>1</sup>	CO₂R <sup>4</sup>	0	CO₂R <sup>3</sup>			
		Ş			R <sup>2</sup>		
Compound	Eıc	Elic	Ellic	Eive	Ela	Ella	Еша
3i (A - R <sup>1</sup> = Et)	-0.811	-1.450	-2.057		-0.736	-1.375	-0.412
3k (A - R¹ = Bn)	-0.810	-1.450	-2.040		-0.727		-0.423
3j (A - R <sup>1</sup> = Me)	-0.809	-1.448	-2.059		-0.735	-1.375	-0.427
3e (B - R <sup>1</sup> = R <sup>3</sup> = OMe, R <sup>2</sup> = H, R <sup>4</sup> = Et)	-0.744	-1.287	-2.089		-0.669	-1.193	
3h' (C - R <sup>1</sup> = Me, R <sup>2</sup> = H, R <sup>3</sup> = Et)	-0.679	-1.333	-2.088		-0.598	-1.252	
3f (B - R <sup>1</sup> = R <sup>3</sup> = H, R <sup>2</sup> = OMe, R <sup>4</sup> = Et)	-0.672	-1.321	-2.049		-0.603	-1.248	
3h (B - $R^1 = R^3 = H$ , $R^2 = Me$ , $R^4 = Et$ )	-0.623	-1.331	-2.078		-0.544	-1.248	
3d (B - R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = R <sup>3</sup> = OMe, R <sup>4</sup> = Me)	-0.623	-1.341	-2.185		-0.535	-1.213	
$3g (B - R^1 = R^3 = H, R^2 = Me, R^4 = Me)$	-0.618	-1.316	-2.048		-0.535	-1.218	
3d' (C - R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OMe, R <sup>3</sup> = Me)	-0.578	-1.254	-1.632	-2.034	-0.511	-1.126	-1.509
3g' (C - R <sup>1</sup> = Me, R <sup>2</sup> = H, R <sup>3</sup> = Me)	-0.564	-1.267	-1.907	-2.195	-0.476		
3b (B - R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>3</sup> = H, R <sup>4</sup> = Me)	-0.530	-1.238	-2.107		-0.457	-1.130	
3b' (C - R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H, R <sup>3</sup> = Me)	-0.500	-1.179	-2.156		-0.410		
3c (B - R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = OMe R <sup>3</sup> = Cl, R <sup>4</sup> = Et)	-0.442	-1.175	-2.015		-0.394	-1.082	

[a] For better visualization the table was organized in function of the potential of the first wave that is the most important for correlating with biological activity.

By comparing the peak potentials and respective currents, in the case of methoxy-quinones (**3e** and **3f**), a slight cathodic shift is observed, in relation to the other substituents. The length of the alkoxyl group does not influence the first two peaks, whilst the third electron transfer process is shifted, depending on the carbon chain, being the process more difficult, for longer ones. A similar trend is observed for methyl-substituted compounds. The presence of two adjacent methoxy groups, in the compound **3d**, facilitates the reduction process. It has an inverse effect, due possibly to steric effects.

Of particular interest are the rather high reduction and oxidation potentials associated with the chlorine-substituted quinone **3c**. In stark contrast to the electron-donating substituents mentioned above, such as the amine and methoxy groups, the presence of the electron-withdrawing chlorine facilitates the quinone reduction, as observed for compounds **3b**' and **3c** (Table 3). Upon comparison among reduction potentials and biological activities, it is notable that these more electrophilic quinones not only were associated with the more positive electrochemical potentials, they also presented the highest trypanocidal activity (IC<sub>50</sub>/24 h, lower than ca. 300  $\mu$ M), with exception of **3g**. Despite an apparent correlation between the presence of an electron-withdrawing group, such as chlorine, a more positive reduction, and oxidation

potential and a higher biological activity, and hence more promising in the fight against *Trypanosoma cruzi*, there is also an optimal range for the reduction potential. In the aprotic medium employed, all the compounds, with values of first wave reduction potential ( $Ep_{1c}$ ), around -0.5 V or more positive, were active. These compounds can be considered as "highly oxidizing" in this biological context, and, not surprisingly, their ability to attack biological molecules, for instance of the cellular thiolstat,<sup>[35]</sup> and to cause oxidative stress, also implies considerable activity, as has already been indicated for other quinones.<sup>[36]</sup> These results support the notion that the compounds investigated act via a redox mechanism, and whilst electrochemistry in an aprotic solvent, such as DMF, may not reflect all processes taking place in an aqueous cellular environment, and the precise targets and mode(s) of action need to be investigated in more detail, redox modulation seems to be at the centre of this activity. Indeed, and despite the complexity of cell chemistry, redox medicine and the molecular mechanistic aspects of Chagas disease, such wider redox modulating, in this case oxidizing agents seem to hit targets, such as pre-existing redox conditions of sick cells, organelles, parasites and microorganisms, particularly hard and may therefore provide a promising therapeutic advantage as bioactive drugs.<sup>[34]</sup>

## Conclusions

The quest for new trypanocidal drugs is extremely important for the development of new compounds associated with Chagas disease, considering that the therapeutic arsenal against this serious disease consists of only two nitrogenated heterocycles, nifurtimox, and benznidazole.<sup>[10]</sup> Our results highlight the importance of naphthoquinones as trypanocidal compounds associated to anefficient strategy for direct substitution of benzenoid ring through catalytic processes. In this work, we have reported an efficient C–H alkenylation strategy for preparing benzenoid A-ring-functionalized naphthoquinones through ruthenium(II)-catalyzed reactions. We have also identified several compounds that are active against the parasite which causes Chagas disease and, with the assistance of cyclic voltammetry, have been able to identify an important structure-redoxbiological activity relationship for these quinone-based redox modulators. Whilst further details, such as cellular mechanisms of action need to be investigated in more detail, this manuscript represents a successful example of carbon–carbon bond formation with the use of catalysts based on ruthenium(II) for the diversity-oriented synthesis of bioactive compounds through a single synthetic step. Our findings open new avenues in and to the chemistry of quinoidal structures with trypanocidal activity by benign C–H activation.

## **Experimental Section**

**General Remarks:** All catalytic reactions were carried out under air using pre-dried 25 mL Schlenkor pressure tubes. 1,4-Naphthoquinone (**1a**) was purified via reduced pressure sublimation using a cold finger sublimation apparatus (50 °C, 0.9 mbar) and stored in a glovebox to prevent contact with moisture. Starting materials **1** were prepared following previously methods described in the literature.<sup>[24,37–41]</sup> Other chemicals were obtained from commercial sources and used without further purification. Yields refer to isolated compounds, estimated to be > 95 % pure as determined by <sup>1</sup>H NMR and GC. TLC: Merck, TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, detection at 254 nm. Chromatographic separations were carried out on Merck Geduran SI-60 (0.040–0.063 mm). IR spectra were recorded on a Bruker ATR FT-IR Alpha device. MS: EI-MS: Jeol AccuTOF at 70 eV; ESI-MS: Bruker maXis and MicrOTOF. High-resolution mass spectrometry (HRMS): Bruker maXis, Bruker MicrOTOF, and Jeol AccuTOF. Melting points (M.p.): Büchi 540 capillary melting point apparatus, values are uncorrected. NMR spectra were recorded on Varian Mercury VX 300, Inova-500, Inova-600 and Bruker Avance 300, Avance III 300, Avance III HD 400, Avance III 400, Avance III HD 500 instruments, if not otherwise specified, chemical shifts ( $\delta$ ) are provided in ppm.

**General Procedure:** To an oven-dried re-sealable tube, naphthoquinoidal substrates (0.40 mmol),  $[RuCl_2(p-cymene)]_2$  (12.0 mg, 0.02 mmol, 5 mol-%), AgSbF<sub>6</sub> (137 mg, 0.40 mmol, 1.0 equiv),  $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$  (160 mg, 0.80 mmol, 2.00 equiv) were added. Acrylates (3.0 equiv) and DCE (2 mL) were added via syringe, and the tube was sealed and submitted to heating (110 °C) and stirring for 18 hours. Then the reaction mixture was filtered through a pad of celite, and the crude product was purified via column chromatography under the conditions noted.

Characterization Data of Products 3. (*E*)-Ethyl 3-(5,8-dioxo-5,8dihydronaphthalen-1-yl)acrylate (3a) and (2*E*,2'*E*)-Diethyl 3,3'(5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalene-1,4-diyl)diacrylate (3a'): The general procedure was followed using ethyl acrylate (130 µL, 1.20 mmol). Purification by column chromatography (*n*-hexane/ EtOAc, 20:1) led to product 3a (51.3 mg, 0.20 mmol, 50 % yield) and 3a' (56.7 mg, 0.16 mmol, 40 % yield), obtained as yellow solids. 3a: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.57 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 8.14 (dd, J = 3.9, 1.5 Hz, 1H), 7.77–7.72 (m, 2H), 6.94 (s, 2H), 6.25 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.27 (q, J = 5.4 Hz, 2H), 1.33 (t, J = 5.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 186.2 (Cq), 184.7 (Cq), 166.2 (Cq), 144.0 (CH), 140.0 (CH), 137.3 (CH), 137.2 (Cq), 134.1 (CH), 133.6 (CH), 133.1 (Cq), 129.1 (Cq), 128.1 (CH), 122.8 (CH), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim} = 2910$ , 1720, 1654, 1320, 1195 cm<sup>-1</sup>; m.p. (°C) = 135–136. HRMS (ESI<sup>+</sup>): 279.0629 [M + Na]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 279.0628. 3a':

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.45 (d, *J* = 18.0 Hz, 2H), 7.72 (s, 2H), 6.93 (s, 2H), 6.24 (d, *J* = 18.0 Hz, 2H), 4.28 (q, *J* = 6.0 Hz, 4H), 1.33 (t, *J* =

6.0 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 158.9 (C<sub>q</sub>), 166.0 (C<sub>q</sub>), 143.9 (CH), 138.4 (C<sub>q</sub>), 138.3 (CH), 133.9 (C<sub>q</sub>), 130.5 (CH), 122.7 (CH), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim}$  = 2961, 1720, 1660, 1278, 850 cm<sup>-1</sup>; m.p. (°C) = 156–157.

(*E*)-Methyl 3-(5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalen-1-yl)acrylate (3b) and (2*E*,2'*E*)-Dimethyl 3,3'-(5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalene-1,4-diyl)diacrylate (3b'): The general procedure was followed using methyl acrylate (110 µL, 1.20 mmol). Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 25:1) led to product 3b (46.5 mg, 0.19 mmol, 48 % yield) and 3b' (23.5 mg, 0.07 mmol, 18 % yield) obtained as yellow solids. 3b: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.55 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J* = 6.5, 2.3 Hz, 1H), 7.74–7.71 (m,

2H), 6.93 (s, 2H), 6.24 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 186.0 (C<sub>q</sub>), 184.4 (C<sub>q</sub>), 166.4 (CH), 144.1 (CH), 139.8 (CH), 137.2 (C<sub>q</sub>), 137.0 (CH), 134.0 (C<sub>q</sub>), 133.5 (C<sub>q</sub>), 133.0 (CH), 129.0 (C<sub>q</sub>), 128.0 (CH), 122.2 (CH), 51.9 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim} = 2955$ , 1708, 1655, 1282, 784 cm<sup>-1</sup>; m.p. (°C) = 147–149; HRMS (ESI<sup>+</sup>): 243.0650 [M + H]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 243.0652. **3b':** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.45 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.71 (s, 2H), 6.93 (s, 2H), 6.24 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 3.82 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 185.9 (C<sub>q</sub>), 166.4 (C<sub>q</sub>), 144.2 (CH), 138.3 (C<sub>q</sub>), 133.9 (C<sub>q</sub>), 130.5 (CH), 122.2 (CH), 52.0 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim} = 2956$ , 1717, 1655, 1277, 840 cm<sup>-1</sup>. m.p. (°C) =

157–159; HRMS (ESI<sup>+</sup>): 349.0689  $[M + Na]^+$ . Cald. for  $[C_{18}H_{14}NaO_6]^+$ : 349.0683.

(*E*)-Ethyl 3-(7-chloro-6-methoxy-5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalen-1-yl)acrylate (3c): Ethyl acrylate (130 µL, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 5:1) led to product 3c (35.9 mg, 0.11 mmol, 28 % yield), obtained as a yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.57 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 8.16 (dd, *J* = 6.4, 2.6 Hz, 1H), 7.85–7.61 (m, 2H), 6.23 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 4.39–4.22 (m, 5H), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 179.3 (C<sub>q</sub>), 179.2 (C<sub>q</sub>), 165.9 (CH), 155.7 (C<sub>q</sub>), 143.8 (CH), 137.6 (CH), 134.8 (C<sub>q</sub>), 133.4 (C<sub>q</sub>), 132.0 (C<sub>q</sub>), 128.8 (C<sub>q</sub>), 128.3 (CH), 127.9 (C<sub>q</sub>), 123.0 (CH), 61.8 (CH<sub>3</sub>), 60.8 (CH<sub>3</sub>), 14.4 (CH<sub>2</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim}$  = 2956, 1705, 1673, 1607, 1242 cm<sup>-1</sup>; m.p. (°C) = 97–99; HRMS (ESI<sup>+</sup>): 343.0345 [M + Na]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClNaO<sub>5</sub>]<sup>+</sup>: 343.0344.

(*E*)-Methyl 3-(6,7-dimethoxy-5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalen1-yl)acrylate (3d) and (2*E*,2'*E*)-Dimethyl 3,3'-(6,7-dimethoxy5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalene-1,4-diyl)diacrylate (3d'): Methyl acrylate (110 µL, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 4:1) led to product 3d (27.8 mg, 0.05 mmol, 23 % yield) and 3d' (54.1 mg, 0.14 mmol, 35 % yield), obtained as yellow solids. 3d: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.57 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 6.4, 2.8 Hz, 54 1H), 7.83–7.56 (m, 2H), 6.25 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 4.10 (s, 3H), 4.09 (s, 3H), 3.83 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 182.8 (C<sub>q</sub>), 181.3 (C<sub>q</sub>), 166.5 (C<sub>q</sub>), 147.7

(CH), 146.4 (CH), 144.4 (C<sub>q</sub>), 136.8 (C<sub>q</sub>), 133.9 (CH), 133.2 (CH), 132.0 (C<sub>q</sub>), 127.9 (C<sub>q</sub>), 127.8 (CH), 122.0 (C<sub>q</sub>), 61.5 (CH<sub>3</sub>), 61.3 (CH<sub>3</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim} = 2957$ , 1720, 1614, 1430, 1161 cm<sup>-1</sup>. m.p. (°C) =

138–140; HRMS (ESI<sup>+</sup>): 325.0680 [M + Na]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 325.0683. *The structure of the product was also confirmed by X-ray diffraction (CCDC number = 1877197).* **3d':** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.47 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 7.67 (s, 2H), 6.24 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 4.10 (s, 6H), 3.84 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 182.6 (C<sub>q</sub>), 166.4 (CH), 146.6 (CH), 144.4 (C<sub>q</sub>), 138.0 (C<sub>q</sub>), 133.6 (CH), 129.4 (C<sub>q</sub>), 122.0 (C<sub>q</sub>), 61.4 (CH<sub>3</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim}$  = 2954, 1711, 1619, 1434, 1166 cm<sup>-1</sup>; m.p. (°C) = 179–181; HRMS (ESI<sup>+</sup>): 387.1089 [M + H]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>8</sub>]<sup>+</sup>: 387.1074.

(*E*)-Ethyl 3-(4,7-dimethoxy-5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalen-1yl)acrylate (3e): Ethyl acrylate (130 µL, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 2:1) led to product 3e (44.3 mg, 0.14 mmol, 35 % yield), obtained as a yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.39 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.18 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.08 (s, 1H), 4.28 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 1.34 (t,

J = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 184.3 (C<sub>q</sub>), 181.7 (C<sub>q</sub>), 166.4 (C<sub>q</sub>), 160.3 (C<sub>q</sub>), 158.7 (C<sub>q</sub>), 144.5 (CH), 135.0 (CH), 130.7 (C<sub>q</sub>),

130.0 (C<sub>q</sub>), 121.2 (CH), 120.2 (C<sub>q</sub>), 118.6 (CH), 110.9 (CH), 60.6 (CH<sub>2</sub>), 56.7 (CH<sub>3</sub>), 56.3 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $\tilde{v} = 2972$ , 1702, 1621, 1273, 1032 cm<sup>-1</sup>. m.p. (°C) = 156–158. HRMS (ESI<sup>+</sup>): 317.1020 [M + H]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 317.1025.

(*E*)-Ethyl 3-(6-methoxy-5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalen-1yl)acrylate (3f): Ethyl acrylate (130  $\mu$ L, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 4:1) led to product 3f (77.9 mg, 0.26 mmol, 68 % yield), obtained as a yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.63 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 8.21 (dd, J = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.80–7.64 (m, 2H), 6.24 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.16 (s, 1H), 4.29 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 1.35 (t, J = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 186.1 (C<sub>q</sub>), 179.9 (C<sub>q</sub>), 166.3 (C<sub>q</sub>), 159.4 (C<sub>q</sub>), 144.6 (CH) 137.1 (CH), 134.8 (CH), 133.0 (CH), 132.4 (C<sub>q</sub>), 129.2 (C<sub>q</sub>), 128.4 (C<sub>q</sub>), 122.5 (CH), 111.4 (CH), 60.9 (CH<sub>3</sub>), 56.6 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim} = 2991$ , 1705, 1680, 1619, 1233 cm<sup>-1</sup>. m.p. (°C) = 183–184. HRMS (ESI<sup>+</sup>): 287.0909 [M + H]<sup>+</sup>. Cald. for

 $[C_{16}H_{15}O_5]^+$ : 287.0914; The structure of the product was also confirmed by X-ray diffraction (CCDC number = 1877203 (**3f**)).

(*E*)-Methyl 3-(6-methyl-5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalen-1-yl)acrylate (3g) and (2*E*,2'*E*)-Dimethyl 3,3'-(6-methyl-5,8-dioxo5,8-dihydronaphthalene-1,4-diyl)diacrylate (3g'): Methyl acrylate (110 µL, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 5:1) led to product 3g (41.0 mg, 0.16 mmol, 40 % yield) and 3g' (44.2 mg, 0.13 mmol, 33 % yield), obtained as yellow solids. 3g: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.57 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.71– 7.65 (m, 2H), 6.77 (s, 1H), 6.22 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.13 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 186.1 (C<sub>q</sub>), 185.1 (C<sub>q</sub>), 166.7 (C<sub>q</sub>), 146.8 (C<sub>q</sub>), 144.4 (CH), 136.9 (CH), 136.7 (C<sub>q</sub>), 133.7 (CH), 133.3 (CH), 133.2 (C<sub>q</sub>), 129.3 (C<sub>q</sub>), 128.2 (CH), 122.0 (CH), 51.8 (CH<sub>3</sub>), 15.9 (CH<sub>3</sub>). m.p. (°C) = 135– 137; IR (ATR):  $v^{\sim}$  = 2956, 1728, 1655, 1431, 1158 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI<sup>+</sup>): 279.0625 [M + Na]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>4</sub>]: 279.0633; *The structure of the product was also confirmed by X-ray diffraction* (CCDC *number = 1877196*). 3g': <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.48 (dd, *J* =

15.7, 15.7 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.82 (q, J = 1.4 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 3.84 (d, J = 1.9 Hz, 6H), 2.18 (d, J = 1.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR

 $(75 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3) \delta$ : 186.5 (C<sub>q</sub>), 185.8 (C<sub>q</sub>), 166.5 (C<sub>q</sub>), 166.4 (C<sub>q</sub>), 147.8 (C<sub>q</sub>), 144.8 (CH), 144.4 (CH), 138.4 (C<sub>q</sub>), 138.0 (C<sub>q</sub>), 135.5 (C<sub>q</sub>), 133.6 (C<sub>q</sub>), 130.9 (CH), 130.7 (CH), 122.0 (CH), 121.8 (CH), 52.0 (CH<sub>3</sub>), 16.4 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim} = 2954$ , 1703, 1652, 1254, 1166 cm<sup>-1</sup>. m.p. (°C) = 173–174. HRMS (ESI<sup>+</sup>): 363.0835 [M + Na]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 363.0839.

(*E*)-Ethyl 3-(6-methyl-5,8-dioxo-5,8-dihydronaphthalen-1-yl)acrylate (3h) and (2*E*,2'*E*)-Diethyl 3,3'-(6-methyl-5,8-dioxo-5,8dihydronaphthalene-1,4-diyl)diacrylate (3h'): Ethyl acrylate (130  $\mu$ L, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 1:20) led to product 3h (47.6 mg, 0.13 mmol, 44 % yield) and 3h' (20.6 mg, 0.06 mmol, 14 % yield), obtained as yellow solids. 3h: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.55 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.70–7.63 (m, 2H), 6.75 (s, 1H), 6.20 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.24 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 186.3 (C<sub>q</sub>), 185.3 (C<sub>q</sub>), 166.4 (C<sub>q</sub>), 146.9 (C<sub>q</sub>), 144.3 (CH), 137.1 (C<sub>q</sub>), 134.6 (C<sub>q</sub>), 133.9 (CH), 133.4 (CH), 129.4 (C<sub>q</sub>), 128.4 (CH), 127.9 (CH), 122.7 (CH), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 16.1 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim}$  = 2956, 1728, 1655, 1431, 1158 cm<sup>-1</sup>.

m.p. (°C) = 96–98. HRMS (ESI<sup>+</sup>): 293.0797 [M + Na]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>4</sub>]: 293.0790; *The structure of the product was also confirmed by X-ray diffraction* (CCDC number = *1877202*). **3h':** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.48 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H) 8.42 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 6.79 (q, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* =

3.0 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 4.3, 2.1 Hz, 2H), 4.25 (dd, J = 4.3, 2.1 Hz, 2H), 2.15 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 1.33 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 1.32 (t, J = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 186.7 (C<sub>q</sub>), 186.0 (C<sub>q</sub>), 166.2 (C<sub>q</sub>), 148.0 (C<sub>q</sub>), 144.7 (CH), 144.3 (CH),

138.7 (C<sub>q</sub>), 138.3 (C<sub>q</sub>), 135.7 (C<sub>q</sub>), 133.8 (C<sub>q</sub>), 131.1 (CH), 130.9 (CH), 122.7 (CH), 122.5 (CH), 61.1 (CH<sub>2</sub>), 16.6 (CH<sub>3</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim} = 2981$ , 1699, 1632, 1273, 1170 cm<sup>-1</sup>. m.p. (°C) = 128–130. HRMS (ESI<sup>+</sup>): 391.1146 [M + Na]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>NaO<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 391.1158.

(*E*)-Ethyl 3-(5,8-dioxo-6-(butylamino)-5,8-dihydronaphthalen-1yl)acrylate (3i): Ethyl acrylate (130 µL, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 20:3) led to product 3i (65.5 mg, 0.20 mmol, 50 % yield), obtained as a red solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.72 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* =

7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.68 (ddd, *J* = 6.0, 3.0, 3.0 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 7.7,

7.7, 0.5 Hz, 1H), 6.14 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 5.73 (t, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.26 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.14 (dd, J = 6.0, 6.0 Hz, 2H), 1.67–1.62 (m, 2H), 1.45–1.37 (m, 2H), 1.35 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.94 (t, J = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 184.3 (C<sub>q</sub>), 181.6 (C<sub>q</sub>), 166.4 (C<sub>q</sub>), 146.8 (C<sub>q</sub>), 145.5 (CH), 136.8 (CH) 135.1 (C<sub>q</sub>), 131.7 (C<sub>q</sub>), 131.5 (CH), 130.5 (CH), 127.8 (C<sub>q</sub>), 121.2 (CH), 102.3 (CH), 60.6 (CH<sub>2</sub>), 42.3 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 20.2 (CH<sub>2</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>), 13.8 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim} = 3351, 2947, 1702, 1608, 1222$  cm<sup>-1</sup>; m.p. (°C) = 99–100; HRMS (ESI<sup>+</sup>): 328.1543 [M + H]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 328.1549.

(*E*)-Methyl 3-(5,8-dioxo-6-(butylamino)-5,8-dihydronaphthalen1-yl)acrylate (3j): Methyl acrylate (110  $\mu$ L, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 5:1) led to product **3j** (63.9 mg, 0.20 mmol, 51 % yield), obtained as a red solid. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.76 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.14 (dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H), 7.71 (ddd, *J* = 7.8, 1.4, 0.6 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 7.7, 7.7, 0.5 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.18–3.11 (m, 2H), 1.67–1.62 (m, 2H), 1.46–1.37 (m, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 184.2 (C<sub>q</sub>), 181.6 (C<sub>q</sub>), 166.8 (CH), 146.7 (CH), 145.8 (C<sub>q</sub>), 136.7 (C<sub>q</sub>), 135.1 (CH), 131.6 (C<sub>q</sub>), 131.5 (CH), 130.5 (C<sub>q</sub>), 127.9 (CH), 120.6 (C<sub>q</sub>), 102.2 (CH), 51.8 (CH<sub>2</sub>), 42.2 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>3</sub>), 20.2 (CH<sub>2</sub>), 13.7 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim}$  = 3351, 2951, 1707, 1604, 1272 cm<sup>-1</sup>; m.p. (°C) = 111–113; HRMS (ESI<sup>+</sup>): 314.1387 [M + H]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 314.1392.

(*E*)-Benzyl 3-(5,8-dioxo-6-(butylamino)-5,8-dihydronaphthalen1-yl)acrylate (3k): Benzyl acrylate (200 µL, 1.20 mmol) was used. Purification by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 25:3) led to product **3k** (87.2 mg, 0.22 mmol, 56 % yield), obtained as a red solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.82 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 7.7, 0.5 Hz, 1H), 7.50–7.27 (m, 5H), 6.22 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 5.77 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.28 (s, 2H), 3.16 (td, *J* = 57

= 6.8 and 6.8 Hz, 2H), 1.77– 1.57 (m, 2H), 1.47–1.34 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 184.2 (C<sub>q</sub>), 181.6 (C<sub>q</sub>), 166.1 (C<sub>q</sub>), 146.7 (C<sub>q</sub>), 146.2 (C<sub>q</sub>), 136.6 (CH), 136.0 (CH), 135.1 (C<sub>q</sub>), 131.6 (CH), 131.5 (CH), 130.5 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 120.2 (C<sub>q</sub>), 102.2 (C<sub>q</sub>), 66.3 (CH<sub>2</sub>), 42.3 (CH<sub>2</sub>) 30.3 (CH<sub>2</sub>), 20.2 (CH<sub>2</sub>), 13.8 (CH<sub>3</sub>). IR (ATR):  $v^{\sim}$  = 3362, 2953, 1712, 1608, 1167 cm<sup>-1</sup>. m.p. (°C) = 102–103. HRMS (ESI<sup>+</sup>): 390.1694 [M + H]<sup>+</sup>. Cald. for [C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 390.1705.

CCDC 1877197 (for 3c), 1877203 (for 3f), 1877196 (for 3g'), 1877202 (for 3h') contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre.

**Trypanocidal Assays:** The experiments were performed with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*.<sup>[42]</sup> Stock solutions of the compounds were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO), with the final concentration of the latter in the experiments never exceeding 0.1 %. Preliminary experiments showed that at concentrations of up to 0.5 %, DMSO has no deleterious effect on the parasites.<sup>[43]</sup> Bloodstream trypomastigotes were obtained from infected Albino Swiss mice at the peak of parasitemia by differential centrifugation. The parasites were resuspended to a concentration of  $10 \times 10^6$  cells/mL in Dulbecco's modified eagle medium supplemented with 10 % fetal calf serum (DMES). This suspension (100 µL) was added to the same volume of each of the compounds, which had been previously prepared at twice the desired final concentrations. The incubation was performed in 96-well microplates (Nunc Inc., Rochester, USA) at 37 °C for 24 h. Benznidazole (Lafepe, Brazil), the standard drug for treatment of chagasic patients, was used as control. Cell counts were performed in a Neubauer chamber, and the activity of the compounds corresponding to the concentration that led to 50 % lysis of the parasites was expressed as the IC<sub>50</sub>/24 h.

**Electrochemical studies:** Cyclic voltammetry (CV) experiments were performed with a conventional three electrode cell attached to an Autolab PGSTAT-30 potentiostat (Echo Chemie, Utrecht, the Netherlands) coupled to a PC microcomputer, using GPES 4.9 software. The working electrode was a glassy carbon (GC) BAS (d = 3 mm), the counter electrode was a Pt wire and the reference electrode an Ag|AgCl, Cl<sup>-</sup> (saturated), all contained in a one-compartment electrochemical cell with a volumetric capacity of 5 mL. The GC electrode was cleaned up by polishing with alumina on a polishing felt (BAS polishing kit). The solvent used in aprotic media studies was extra dry *N*,*N*-dimethylformamide (99.8 %) acquired from Acros Organics. In CV experiments, the scan rate varied from 10 to 1000 mV s<sup>-1</sup>. Electrochemical reduction and oxidation were performed in aprotic media (DMF + TBAPF<sub>6</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>) at room temperature ( $25 \pm 2$  °C). Each compound ( $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) was added to the supporting electrolyte

and the solution was deoxygenated with argon before the measurements by cyclic voltammetry, in different potential intervals.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## Keywords: C-H activation · Quinones · Synthetic methods · Ruthenium · Electrochemistry

- WHO. Chagas disease Epidemiology. http://www.who.int/chagas/ epidemiology/en/ (2017), Accessed October 2018.
- [2] WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on **2010** estimates. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2015**, *90*, 33–43.
- [3] A. Rassi Júnior, A. Rassi, J. A. Marin-Neto, Lancet 2010, 375, 1388–1402.
- [4] G. Schmunis, Z. E. Yadon, Acta Trop. 2010, 115, 14–21.
- [5] Q. Liu, X. N. Zhou, Infect. Dis. Poverty. 2015, 4, 60.
- [6] A. Prata, Lancet Infect. Dis. 2001, 1, 92–100.
- WHO. Expert Committee. Control of Chagas Disease. Brasilia, Brazil: World Health Organization, 2002.
   WHO technical report series 905.
- [8] C. Bern, N. Engl. J. Med. 2015, 373, 456–466.
- [9] C. A. Morillo, J. A. Marin-Neto, A. Avezum, S. Sosa-Estani, A. Rassi Júnior, F. Rosas, E. Villena, R. Quiroz, R. Bonilla, C. Britto, F. Guhl, E. Velazquez, L. Bonilla, B. Meeks, P. Rao-Melacini, J. Pogue, A. Mattos, J. Lazdins, A. Rassi, S. J. Connolly, S. Yusuf, *N. Engl. J. Med.* 2015, 373, 1295–1306.
- [10] R. F. Menna-Barreto, S. L. de Castro, Curr. Top. Med. Chem. 2017, 17, 1212-1234.
- [11] C. B. Scarim, D. H. Jornada, R. C. Chelucci, L. de Almeida, J. L. dos Santos, M. C. Chung, *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 155, 824–838.
- [12] a) F. Belluti, E. Uliassi, G. Veronesi, C. Bergamini, M. Kaiser, R. Brun, A. Viola, R. Fato, P. A. M. Michels, R. L. Krauth-Siegel, A. Cavalli, M. L. Bolognesi, *ChemMedChem* 2014, 9, 371–382; b) E. Uliassi, G. Fiorani, R. L. Krauth-Siegel, C. Bergamini, R. Fato, G. Bianchini, J. C. Menendez, M. T. Molina, E. Lopez-Montero, F. Falchi, A. Cavalli, S. Gul, M. Kuzikov, B. Ellinger, G. Witt, C. B. Moraes, L. H. Freitas-Júnior, C. Borsari, M. P. Costi, M. L. Bolognesi, *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 141, 138–148.
- [13] K. Salomão, N. A de Santana, M. T. Molina, S. L. de Castro, R. F. S. MennaBarreto, *BMC Microbiol.* 2013, 13, 196.
- [14] K. Vázquez, C. Espinosa-Bustos, J. Soto-Delgado, R. A. Tapia, J. Varela, E. Birriel, R. Segura, J. Pizarro, H. Cerecetto, M. Gonzalez, M. Paulino, C. O. Salas, *RSC Adv.* 2015, *5*, 65153–65166.
- [15] E. B. T. Diogo, G. G. Dias, B. L. Rodrigues, T. T. Guimarães, W. O. Valença,
   C. A. Camara, R. N. de Oliveira, M. G. da Silva, V. F. Ferreira, Y. G. de Paiva, M. O. F. Goulart, R. F. S. Menna-Barreto, S. L. de Castro, E. N. da Silva Júnior, *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 6337–6348.
- [16] a) D. K. Barange, V. Kavala, B. R. Raju, C.-W. Kuo, C. Tseng, Y.-C. Tu, C.-F. Yao, *Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 5116–5119; b) S. T. Martinez, B. V. Silva, A. C. Pinto, V. F. Ferreira, F. C. da Silva, *Quim. Nova* 2012, 35, 858–860.
- [17] a) D. K. Nair, R. F. S. Menna-Barreto, E. N. da Silva Júnior, S. M. Mobind, I. N. N. Namboothiri, *Chem. Commun.* 2014, 50, 6973–6976; b) For selected reviews, see: B. Hosamani, M. F. Ribeiro, E. N. da Silva

Júnior, I. N. N. Namboothiri, Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 6913–6931; X. Zhang, Y.-H. Chen, B. Tan, Tetrahedron Lett. 2018, 59, 473–486.

- [18] a) R. L. de Carvalho, G. A. M. Jardim, A. C. C. Santos, M. H. Araujo, W. X. C. Oliveira, A. C. S. Bombaça, R. F. S. Menna-Barreto, E. Gopi, E. Gravel, E. Doris, E. N. da Silva Júnior, *Chem. Eur. J.* 2018, 24, 15227–15235; b) D. Bhasin, K. Cisek, T. Pandharkar, N. Regan, C. Li, B. Pandit, J. Lin, P.-K. Lia, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 391–395; c) J. Ren, L. Lu, J. Xu, T. Yu, B.-B. Zeng, *Synthesis* 2015, 47, 2270–2280.
- [19] a) D. Gust, T. A. Moore, A. L. Moore, G. Seely, P. Liddell, D. Garrett, L. O. Harding, X. C. Ma, S.-J. Lee, F. Gao, *Tetrahedron* 1989, 45, 4867–4891; b) N. V. Ivashkina, V. S. Romanov, A. A. Moroz, M. S. Shvartsberg, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)* 1984, 33, 2345–2348.
- [20] E. N. da Silva Júnior, G. A. M. Jardim, R. S. Gomes, Y.-F. Liang, L. Ackermann, *Chem. Commun.* 2018, 54, 7398–7411.
- [21] G. A. M. Jardim, E. N. da Silva Júnior, J. F. Bower, Chem. Sci. 2016, 7, 3780–3784.
- [22] G. A. M. Jardim, W. X. C. Oliveira, R. P. de Freitas, R. F. S. Menna-Barreto, T. L. Silva, M. O. F. Goulart, E. N. da Silva Júnior, *Org. Biomol. Chem.* 2018, *16*, 1686–1691.
- [23] G. A. M. Jardim, T. L. Silva, M. O. F. Goulart, C. A. de Simone, J. M. C. Barbosa, K. Salomão, S. L. de Castro, J. F. Bower, E. N. da Silva Júnior, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *136*, 406–419.
- [24] G. G. Dias, T. Rogge, R. Kuniyil, C. Jacob, R. F. S. Menna-Barreto, E. N. da Silva Júnior, L. Ackermann, *Chem. Commun.* 2018, 54, 12840–12843.
- [25] C. Zhang, M. Wang, Z. Fan, L.-P. Sun, A. Zhang, J. Org. Chem. 2014, 79, 7626–7632.
- [26] a) J. Li, C. Kornhaaß, L. Ackermann, *Chem. Commun.* 2012, 48, 11343–11345; b) L. Ackermann, L. Wang, R. Wolfram, A. V. Lygin, *Org. Lett.* 2012, *14*, 728–731; c) K. Graczyk, W. Ma, L. Ackermann, *Org. Lett.* 2012, *14*, 4110–4113; d) W. Ma, L. Ackermann, *Chem. Eur. J.* 2013, *19*, 13925–13928; e) W. Ma, R. Mei, G. Tenti, L. Ackermann, *Chem. Eur. J.* 2014, *20*, 15248–15251; f) C. Tirler, L. Ackermann, *Tetrahedron* 2015, *71*, 4543–4551; g) Q. Bu, T. Rogge, V. Kotek, L. Ackermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, *57*, 765–768; *Angew. Chem.* 2018, *130*, 773–776.
- [27] a) L. Ackermann, J. Pospech, Org. Lett. 2011, 13, 4153–4155; b) A. Bechtoldt, C. Tirler, K. Raghuvanshi, S. Warratz, C. Kornhaaß, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 264–267; Angew. Chem. 2016, 128, 272; c) (lit; For selected reviews, see:L. Ackermann, R. Vicente, A. Althammer, Org. Lett. 2008, 10, 2299–230;
  d) P. Gandeepan, T. Müller, D. Zell, G. Cera, S. Warratz, L. Ackermann, Chem. Rev. 2019, 119, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev. 8b00507; e) L. Ackermann, Org. Process Res. Dev. 2015, 19, 260–269; f) L. Ackermann, Acc. Chem. Res. 2014, 47, 281–295; g) L. Ackermann, Chem. Rev. 2011, 111, 1315–1345.
- [28] a) J. A. Leitch, P. B. Wilson, C. L. McMullin, M. F. Mahon, Y. Bhonoah, I. H. Williams, C. G. Frost, ACS Catal. 2016, 6, 5520–5529; b) M. Bakthadoss, P. V. Kumar, T. S. Reddy, Eur. J. Org. Chem. 2017, 4439–4444; c) R. Manikandan, P. Madasamy, M. Jeganmohan, ACS Catal. 2016, 6, 230–234.
- [29] a) T. B. Gontijo, R. P. de Freitas, G. F. de Lima, L. C. D. de Rezende, L. F. Pedrosa, T. L. Silva, M. O. F. Goulart, B. C. Cavalcanti, C. Pessoa, M. P. Bruno, J. R. Corrêa, F. S. Emery, E. N. da Silva Júnior, *Chem. Commun.* 2016, *52*, 13281–13284; b) T. Rodrigues, M. Werner, J. Roth, E. H. G. da Cruz, M. C. Marques, P. Akkapeddi, S. A. Lobo, A. Koeberle, F. Corzana, E. N. da Silva Júnior, O. Werz, G. J. L. Bernardes, *Chem. Sci.* 2018, *9*, 6899–6903; c) L. G. de Oliveira, M. M. Silva, F. C. S. de Paula, E. C. Pereira-Maia, C. L. Donnici, C. A. de Simone, F. Frézard, E. N. da Silva Júnior, C. Demicheli, *Molecules* 2011, *16*, 10314–10323; d) B. C. Cavalcanti, F. W. A. Barros, I. O. Cabral, J. R. O. Ferreira, H. I. F. Magalhães, H. V. N. Júnior, E. N. da Silva Júnior, F. C. de Abreu, C. O. Costa, M. O. F. Goulart, M. O. Moraes, C.

Pessoa, *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1560–1574; e) G. A. M. Jardim, T. T. Guimaraes, M. C. F. R. Pinto, B. C. Cavalcanti, K. M. de Farias, C. Pessoa, C. C. Gatto, D. K. Nair, I. N. N. Namboothiri, E. N. da Silva Júnior, *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 120–130.

- [30] N. B. de Souza, I. M de Andrade, P. F. Carneiro, G. A. M. Jardim, I. M. M. de Melo, E. N. da Silva Júnior, A. U. Krettli, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2014, *109*, 546–552.
- [31] T. T. Guimarães, M. C. F. R. Pinto, J. S. Lanza, M. N. Melo, R. L. do MonteNeto, I. M. M. de Melo, E. B. T. Diogo, V. F. Ferreira, C. A. Camara, W. O. Valença, R. N. de Oliveira, F. Frézard, E. N. da Silva Júnior, *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 63, 523–530.
- [32] K. C. G. Moura, P. F. Carneiro, M. C. F. R. Pinto, J. A. da Silva, V. R. S. Malta, C. A. de Simone, G. G. Dias, G. A. M. Jardim, J. Cantos, T. S. Coelho, P. E. A. da Silva, E. N. da Silva Júnior, *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 6482–6488.
- [33] a) E. N. da Silva Júnior, R. F. S. Menna-Barreto, M. C. F. R. Pinto, R. S. F. Silva, D. V. Teixeira, M. C. B. V. de Souza, C. A. de Simone, S. L. de Castro, V. F. Ferreira, A. V. Pinto, *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 1774–1780; b) M. C. Fernandes, E. N. da Silva Júnior, A. V. Pinto, S. L. de Castro, R. F. S. MennaBarreto, *Parasitology* 2012, *139*, 26–36; c) see Ref.<sup>[15]</sup>; d) G. A. M. Jardim, W. J. Reis, M. F. Ribeiro, F. M. Ottoni, R. J. Alves, T. L. Silva, M. O. F. Goulart, A. L. Braga, R. F. S. Menna-Barreto, K. Salomão, S. L. de Castro, E. N. da Silva Júnior, *RSC Adv.* 2015, *5*, 78047–78060.
- [34] a) G. I. Giles, K. M. Tasker, R. J. K. Johnson, C. Jacob, K. N. Green, C. Peers, *Chem. Commun.* 2001, 2490–2491; b) G. I. Giles, K. M. Tasker, C. Peers, K. N. Green, L. O. Klotz, H. Sies, C. Jacob, *Org. Biomol. Chem.* 2003, *1*, 4317–4322; c) F. H. Fry, A. L. Holme, N. M. Giles, G. I. Giles, C. Collins, K. Holt, S. Pariagh, T. Gelbrich, M. B. Hursthouse, N. J. Gutowski, C. Jacob, *Org. Biomol. Chem.* 2005, *3*, 2579–2587.
- [35] C. Jacob, Biochem. Soc. Trans. 2011, 39, 1247–1253.
- [36] a) V. Jamier, L. A. Ba, C. Jacob, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10920–10928; b) see Ref.<sup>[34c]</sup>.
- [37] M. Delarmelina, R. D. Daltoé, M. F. Cerri, K. P. Madeira, L. B. A. Rangel, V. Lacerda Júnior, W. Romão, A. G. Taranto, S. J. Greco, J. Braz. Chem. Soc. 2015, 26, 1804–1816.
- [38] Y. Brandy, N. Brandy, E. Akinboye, M. Lewis, C. Mouamba, S. Mack, R. J. Butcher, A. J. Anderson, O. Bakare, *Molecules* 2013, 18, 1973–1984.
- [39] G. Wurm, U. Geres, Archiv. Pharmazie 1989, 322, 155–157.
- [40] F. Brommel, P. Zou, H. Finkelmann, A. Hoffmann, Soft Matter 2013, 9, 1674–1677.
- [41] N. Mathew, T. Karunan, L. Srinivasan, K. Muthuswamy, Drug Dev. Res. 2010, 71, 188–196.
- [42] L. H. P. Silva, V. Nussenszweig, Folia Clin. Biol. 1953, 20, 191-208.
- [43] S. L. de Castro, M. C. F. R. Pinto, A. V. Pinto, *Microbios* 1994, 78, 83–90.

Received: December 28, 2018

## CASO II

Dyes and Pigments 173 (2020) 10788 5



## Nitrosation of BODIPY dyes and their applications in the development of thiol sensors



Shaiani Maria Gil de Melo<sup>a</sup>, Lucas Cunha Dias de Rezende<sup>b</sup>, Raquel Petrilli<sup>a</sup>,

Renata Fonseca Vianna Lopez<sup>a</sup>, Marilia O.F. Goulart<sup>c</sup>, Flavio da Silva Emery<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FCFRP-USP), Av. Do Café, s/nº - Campus Universitário da USP, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil <sup>b</sup> Department of Natural Science, Centro Universitário Norte Do Espírito Santo, Universidade Federal Do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brazil <sup>c</sup> Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, 57072970, Brazil

#### ABSTRACT

Herein we describe a new method for the post-functionalization of BODIPY dyes, by means of nitrosation with NOBF<sub>4</sub>, in yields of up to 93%. The application of nitroso-BODIPY dyes as analytical tools for the fluorimetric analysis of thiols is also shown, including the ability to cross cell membranes.

## 1. Introduction

BODIPYs play an important role in biological sciences and chemical biology as chemosensors and biological markers [1,2]. While the dipyrromethene core of BODIPYs is very reactive allowing introduction of different functional groups, nitroso substitution of BODIPYs is unprecedented in the literature, and direct nitrosation opens opportunity for the development of new fluorescent probes. Although several methods for nitrosation of aromatic compounds are available [3], the nitroso functionalization of electron-rich aromatic rings ( $\pi$ -excessive), as pyrroles, is a synthetic challenge, with only few described examples in the literature [4].

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Corresponding author.

Nitroso-containing coumarin were recently reported as useful probes for  $H_2S$ , due to sulfide-mediated reduction of the nitroso group [5]. However, fluorescence-based analytical methods involving nitroso dyes are not fully described for thiol containing organic compounds, such as cysteine (Cys) and glutathione (GSH) and would be an important tool for analysis of wide range of cellular processes [6,7].

Based on the recognized reactivity of BODIPYs with electrophiles, in this paper we describe a fast and efficient method for the nitrosation of the pyrrole ring in BODIPYs core using NOBF<sub>4</sub> [8]. In addition, we studied the reactivity and photophysical properties of nitroso-BODIPY in the presence of biothiols.

#### 2. Results and discussion

### 2.1. Study of the nitrosation of BODIPY

Nitrosation reactions were carried out with different substituted BODIPYs, which were synthesized using previously published methods (Table 1).

Initially, we studied the direct nitrosation of 1,3,5,7,8-pentamethyl BODIPY 1 using NOBF<sub>4</sub> as a nitroso source, in different conditions (solvents, temperature and atmosphere), as described in Table 2. Acetonitrile was the most suitable solvent, yielding 65% of the 2-nitroso BODIPY 2, with full conversion of 1 in 10 min at -5 °C (Entry 6), which is possibly related to the higher solubility of NOBF<sub>4</sub> in this solvent. Room temperature and open-vessel conditions were detrimental (Entries 7 and 8), while no relevant change in yields was observed when the reaction was carried out at -40 °C (Entry 9).

Another classical method for nitrosation of aromatic rings, using sodium nitrite and hydrochloric acid (NaNO<sub>2</sub>/HCl) was evaluated. However, nitroso compounds were not observed in any of the reactions, but the reactions resulted in degradation of the BODIPYs starting materials.

Based on the successful nitrosation of 1, we tested the optimized method for the modification of the symmetric BODIPYs 3–6. These experiments showed that nitrosation of 1,3,5,7-tetramethyl-8-aromatic BODIPYs with NOBF<sub>4</sub> is a straightforward reaction regardless of the aromatic substituent, with moderate to high yields (Scheme 1).

The nitrosation was successfully applied to symmetric non-methylated BODIPY 12, from which two regioisomers were produced (Scheme 2). Compound 14, substituted at C-3, was isolated with 40% yield, while the 2-nitroso BODIPY 16 was a minor regioisomer, isolated with 19% yield. On the other hand, for the nitrosation of the structurallyrelated compound 13, the reaction was regioselective, furnishing 15 in higher yields (78%). It is interesting to note that electrophilic substitutions, such as nitration,

sulfonation, formylation and thiocyanation, are usually observed at C-2 and C-6 of the BODIPY core [2a,13-17], while at C-3 and C-5 are prone to nucleophilic substitutions [18]. However, there is one report showing nitration at C-3, using HNO<sub>3</sub> in Ac<sub>2</sub>O at low temperature, supporting the possibility of electrophilic substitutions at this position [19]. In general, moderate to excellent yields were obtained for that conversion compared to other electrophilic substitution reactions described for BODIPYs [19].

	R <sup>3</sup> 7 5 R <sup>3</sup>	$ \begin{array}{cccc}                                  $			
#	R1	R2	R3	R4	Ref.
1	Me	Me	Me	Me	[9]
3	Me	Me	Me	4-	[10]
			fl	uorophenyl	
4	Me	Me	Me	4-	[10]
			c	yanophenyl	
5	Me	Me	Me	4-	[10]
			n	nethoxyphenyl	
6	Me	Me	Me	Ph	[10]
12	Н	Н	Н	Ph	[11]
13	Н	Н	Н	2,6-	[11]
			d	ichlorophenyl	
20	Н	Ph	Н	Ph	[12]

Table 1 - Structure numbering of the BODIPY core and starting materials used in the nitrosation study.

The regioisomers 14 and 16 were easily differentiated by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, especially when analyzing the signals of hydrogens at C2, C-3, C-5 and C-6. The structure of 14 was confirmed by <sup>1</sup>H NMR spectra (400 MHz, DMSOd<sub>6</sub> - in the supporting information – SI page 15), showing chemical shifts observed for hydrogen C-5 at 8.80 ppm (s, 1H); C-2 at 7.34 ppm (dd, J = 4.5 Hz, 1H); C-6 at 7.06 ppm (dd, J = 4.7, 1.6 Hz, 1H). For compound 16 the <sup>1</sup>H NMR spectra (400 MHz, DMSOd<sub>6</sub> - in the supporting information - SI page 17), show the chemical shifts observed for hydrogen at C-5 at 8.74 ppm (s, 1H); C-3 at 8.74 ppm (d, J = 4.6 Hz, 1H). Analyzing these results, for 14 there is no

signal around 8 ppm, referent to hydrogen at C-3 on the starting material. On the other hand, for 16, no signal around 7 ppm with <sup>3</sup>J referring to typical coupling constant  $\beta\beta$ ' typical in pyrrole, suggesting the regioisomers (Scheme 2).

Aiming to expand the scope of this nitrosation method, we carried out the reaction with the asymmetric BODIPY 20. Interestingly, this reaction followed the same reactivity shown above, and furnished regioselectivity asymmetric red-shifted 3,8-diphenyl BODIPY 20, which yielded 73% of the nitrosated BODIPY 21. The formation of 2-nitrososubstituted derivative, which was expected based on the previous experiments in this work, was not observed (Scheme 3).

According to the described reactivity of BODIPYs in the literature [16,20], the nitrosation reaction is probably based on an electrophilic attack at the nitrosonium cation, while the observed regioselectivity can be explained by the favourable formation of the intermediates 25a - 25c (Scheme 4) compared to 24a – 24b. Furthermore, the successful nitrosation with NOBF<sub>4</sub> may reflect the importance of tetrafluorborate as a counteranion in this reaction. In this context, a six-membered cyclic transition state could be involved during the reaction process (Scheme 4).

According to the photophysical experiments, nitroso-BODIPYs invariably showed reduced fluorescence quantum yields, compared to the parent starting materials, possibly due to the addition of a new nonradiative decay pathway. As expected, fluorescence quantum yield was even lower for non-methylated BODIPYs, due to the free rotation of the meso-substituent that leads to non-radiative decay of the excited state [21]. It is worth of note that nitrosation was not related to relevant shifts in the emission and absorption spectra (in the supporting information – SI pages 4–8).

## 2.2. Reactivity of nitroso-BODIPY and fluorescence properties involving compounds with thiol

Considering that nitroso group is reactive towards thiols, leading to the reduced product [5], the reactivity and photophysics of the products synthesized herein were studied. As a model, compound 21 was reacted with sodium hydrosulfide (NaHS) in different concentrations, and a relevant increase in the emission (detailed in the SI pages 2–3) was observed. Through this experiment, the concentration of thiol analytes was established for use in further experiments.

Therefore, we analyzed the fluorescence of a solution of 15 (0.5 mM) in MeOH/Water 1:1 in the presence of thiopropanol (50 mM). Interestingly, we observed an increased and red-shifted emission outcome from the interaction of 15 with thiopropanol. Similar changes in the emission were observed for solutions of 15 treated with cysteine (Cys), N-acetylcysteine (NAC), glutathione (GSH) and 2-

mercaptopyridine, while no relevant changes were observed for solutions treated with ethylamine or other amino acids (Fig. 1). Interestingly, no changes in fluorescence were observed for the cystine (oxidized dimer of cysteine), showing the importance of the free thiol for nitroso BODIPYs interactions. These observations reinforce the idea that 15 can act as a specific fluorescent probe for biothiols.

From visual inspection (SI - page 9), it is clear that the emission of 15 is particularly enhanced by NAC and GSH, while the effect for Cys is smaller (Fig. 2). Interestingly, the fluorescence emission of other nitrosyl BODIPYs (11, 21, 14) were also shown to be relevantly changed by the treatment with these three biothiols (Fig. 2). On the other hand, we observed that 2-substituted dye 16 showed no change in fluorescence, under studied conditions, a reason for this behaviour may be related to compound decomposition, which is coherent to the literature data [19].

To understand the response of nitroso-substituted BODIPYs when in the presence of thiol compounds, the reaction between 15 and thiopropanol was further investigated. Remarkably, TLC control showed the formation of a mixture of fluorescent red-shifted products. From this mixture, it was possible to isolate and confirm the structure of 3amino,5-thiopropyl 26 (Scheme 5). Regarding the obtained compound 26, it can be suggested that the process involving nitroso-BODIPY and thiol group can be related to two processes that may occur concomitantly, one of them being the addition of the thiol group to the pyrrole ring of BODIPY, with further reduction of the NO group, as observed for compound 26.

The NMR <sup>1</sup>H analyses (in the supporting information – SI pages 20–21) suggests that three other compounds were formed, having signals related to the structure of the BODIPY core. It is interesting to note, the addition of thiopropanol to C-5 of the BODIPY, which has recently been reported when using an oxidizing agent [22].

To identify if compound 26 was responsible for the increase in fluorescence in thiol sensor experiments, the emission spectra of the pure product 26, 15 and the spectrum of the thiol-sensor experiment solution (Mixture of 15 with thiopropanol – 589 nm) were compared (Fig. 3).

Pure compound 26 showed fluorescence emission (569 nm) which is far from the observed in the thiol-sensor experiment (589 nm), however, when compared with 15 (534 nm), it resulted in an expected bathochromic shift due to the insertion of the thiol group. In the literature, It is well-described that 3-thio-substituted BODIPYs are commonly associated with relatively intense and red-shifted fluorescence emission [23b]. On the other hand, the same is not reported for 3amino-substituted BODIPYs [23], which usually show less intense fluorescence because the electron releasing capacity of the amino at C-3 is not strong enough to induce a charge transfer state, which usually drastically quenches the fluorescence

emission of BODIPYs [19]. Nitroso-BODIPYs produced herein invariably showed reduced fluorescence quantum yields, compared to the parent starting materials.

$\begin{array}{c c} & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\$						
Entry	Conditions <sup>a</sup>				Yield <sup>b</sup>	
Solven	t	Temp. <sup>c</sup>	Atm.	Time <sup>d</sup>		
1	DCE	-5 <sup>e</sup>	N <sub>2</sub>	45	25	
2	1,4 -Dioxane	-5 <sup>e</sup>	$N_2$	35	27	
3	DMF	-5 <sup>e</sup>	$N_2$	120	0	
4	Me <sub>2</sub> CO	-5 <sup>e</sup>	$N_2$	15	31	
5	THF	-5 <sup>e</sup>	$N_2$	40	30	
6	MeCN	-5 <sup>e</sup>	$N_2$	10	65	
7	MeCN	rt	$N_2$	10	36	
8	MeCN	-5 <sup>e</sup>	Air	10	47	
9	MeCN	$-40^{\mathrm{f}}$	$N_2$	15	68	

Table 2- Optimization of the nitrosation of BODIPY 1.

a Reactions were carried out with 50 mg of compound 1 and 1.5 eq. of NOBF4.

<sup>b</sup>Calculated yield % after chromatographic purification.

c Temperatures are given in °C or rt (room temperature).

d Time in minutes for complete consumption of starting material according to TLC control.

e Ice bath/acetone.

f Dry ice bath/acetonitrile.



Scheme 1. Nitrosation of 1,3,5,7-tetramethyl-8-aromatic BODIPYs.



Scheme 2. Nitrosation of non-methylated BODIPYs.

### 2.3. Cellular uptake of nitroso-BODIPY



Scheme 3. Nitrosation of 3,8-diphenyl BODIPY.

In addition, we analyzed the ability of the nitroso-BODIPY to cross cell membrane, to access their usefulness as in vitro probes. In that sense, a flow cytometry analysis was performed in A431 squamous cell carcinoma line, as a model tumour cell line, as shown in Fig. 4A–C flow cytometry dot plots. Thiol-probe 15 was used as treatment for a duration of 5 min, 30 min and 24 h. A time-dependent permeation process was observed (Fig. 4), with the highest amount of 15 positive cells at 24 h (Fig. 4D). This result was also confirmed by the fluorescence intensity at  $\lambda em = 585/42$  nm (Fig. 4E) at the end of the experiment, which is similar to the observed for the solution thiol-sensor experiment (589 nm). Statistical difference was observed for the different treatment durations (p < 0.05, One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test) and no viability cell changes were observed. As a result, the compound 15 presents time-dependent tumoral cellular uptake and was effective in acting as an in vitro probe.



Scheme 4. Mechanistic proposal for BODIPY nitrosation.

### Concluding remarks

This work showed the development of a simple and very efficient method for obtaining the unprecedented nitroso-substituted fluorophores, with up to 93% yields, using a readily available and inexpensive reagent. In addition, a preliminary chemical reactivity study involving thiols yielded the reduced nitroso to amino group, with an unexpected addition to the BODIPY core. These structural changes and unusual reactivity for BODIPYs modulate the changes in photophysical properties, which could be also followed by cell studies, indicating the ability of the nitroso BODIPY to cross cell membranes, instigating a future study of the potential sensor for thiol groups. Finally, these results demonstrate the potential application of nitroso-BODIPY dyes as fluorescent probes and encourages us to continue studying this class of compounds for further applications.

## Experimental section

4.1. General procedure 1: optimized nitrosation reaction

NOBF<sub>4</sub> (1.5 eq.) was added to a stirring solution of the BODIPY in dry acetonitrile (5 mL) cooled to -5 °C (Ice bath/acetone), under nitrogen atmosphere, and the reaction course was followed by TLC. After full consumption of the starting material, water was added, and the solution was left stirring for 5 min. The reaction mixture was extracted three times, with EtOAc, dried over magnesium sulfate and

concentrated to dryness. The residue was purified chromatographically in a sílica gel column, using mixtures of Hex: EtOAc or Hex: DCM as eluents, to yield desired product.



Fig. 1. Changes in the fluorescence emission of compound 15 after treatment with thiols. Conditions: MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1, concentrations: 0.5mM of nitroso-BODIPYs and 50 mM of biothiols



Fig. 2. Changes in the fluorescence emission intensity of compounds 15, 11, 21 and 14 after treatment with thiols. Bla: Blank. Conditions: MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1, concentrations: 0.5 mM of nitroso-BODIPYs and 50 mM of biothiols.



Scheme 5. Reaction of BODIPY 15 with Thiopropanol.

4.1.1. 1,3,5,7,8-Pentamethyl-2-nitrosyl-BODIPY 2

Prepared from BODIPY 1 (50 mg, 0.190 mmol) using the optimized nitrosation reaction in 65% yield (36 mg, 0.123 mmol); m.p 240–249 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/EtOAc 8:2). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.30 (s, 1H), 2.80 (s, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.70 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 2.49 (s, 3H). 13C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  162.6, 147.8, 147.0, 143.8, 139.0, 136.0, 132.2, 128.3, 125.3, 18.2, 17.8, 15.2, 14.5, 14.3. IR (neat): 1568, 1530, 1479, 1411, 1376, 1337, 1196, 1150, 1066, 980 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/ z calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 292.1427, found 292.1428.

4.1.2. 1,3,5,7-Tetramethyl-2-nitrosyl-8-(4-fluorophenyl)-BODIPY 8

Prepared from BODIPY 3 (50 mg, 0.146 mmol) using the optimized nitrosation reaction in 43% yield (24.3 mg 0.063 mmol); m.p 130–140 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/EtOAc 8:2). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.54 (dd, J = 8.0, 5.6 Hz, 2H), 7.46 (t, J = 8.7 Hz, 2H), 6.57 (s, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.44 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSOd<sub>6</sub>)  $\delta$  165.9, 164.6, 162.1, 149.4, 147.8, 142.9, 138.7, 135.4, 133.5, 130.9, 130.8, 129.6, 129.6, 126.9, 126.2, 117.3, 117.1, 15.4,

15.2, 14.3, 12.3. IR (neat): 2955, 2925, 2856, 1734, 1603, 1521, 1334, 1310, 1260, 1190, 1068, 813 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for  $C_{19}H_{17}BF_3N_3O [M + H]^+ 372.1490$ , found 372.1494.

4.1.3. 1,3,5,7-Tetramethyl-2-nitrosyl-8-(4-cyanophenyl)-BODIPY 9
Prepared from BODIPY 4 (43 mg, 0.113 mmol) using the optimized nitrosation reaction in 71% yield (28 mg, 0.080 mmol); m.p 258–262 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/EtOAc 8:2). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.89 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.29 (s, 1H), 2.95 (s, 3H), 2.67 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.44 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  166.1, 165.0, 147.9, 147.9, 142.0, 138.6, 136.8, 135.3, 133.4, 129.2, 127.6, 126.0, 117.8, 114.3, 15.6, 15.4, 13.0, 11.3. IR (neat): 2970, 2955, 2832, 1554, 1310, 1191, 1185, 1069, 989, 815 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 379.1536, found 379.1538.

## 4.1.4. 1,3,5,7-Tetramethyl-2-nitrosyl-8-(4-methoxiphenyl)-BODIPY 10

Prepared from BODIPY 5 (100 mg, 0.282 mmol) using the optimized nitrosation reaction in 47% yield (51 mg, 0.133 mmol); m.p 225–230 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/EtOAc 8:2). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.19–7.13 (m, 2H), 7.09–7.02 (m, 2H), 6.20 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.85 (s, 3H), 2.63 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.49 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  164.1, 160.8, 149.1, 148.9, 144.0, 139.0, 135.5, 134.9, 129.0, 127.5, 125.62, 124.8, 115.0, 55.4, 15.3, 14.3, 14.3, 12.6. IR (neat): 2960, 2925, 2843, 1609, 1564, 1536, 1487, 1417, 1336, 1245, 1171,1087, 1017, 841 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 384.1689, found 384.1678.

## 4.1.5. 1,3,5,7-Tetramethyl-2-nitrosyl-8-phenyl-BODIPY 11

Prepared from BODIPY 6 (50 mg, 0.154 mmol) using the optimized nitrosation reaction in 93% yield (51 mg, 0.144 mmol); m.p 190–195 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/DCM 7:3). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.59–7.50 (m, 3H), 7.33–7.27 (m, 2H), 6.25 (s, 1H), 2.97 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.46 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  165.4, 164.9, 148.9, 148.8, 145.0, 135.8, 133.7, 129.9, 129.7, 128.4, 127.7, 125.3, 111.8, 15.5, 15.2, 13.0, 11.0. IR (neat): 2961, 2926, 2851, 1556, 1415, 1335, 1310, 1261, 1190, 1144, 1064, 996, 824, 722 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O [M + Na]<sup>+</sup> 376.1398, found: 376.1402.

## 4.1.6. 3-Nitrosyl-8-phenyl-BODIPY 14

Prepared from BODIPY 12 (70 mg, 0.261 mmol) using the optimized nitrosation reaction in 40% yield (31 mg, 0.104 mmol); m.p 175–182 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/EtOAc 7:3). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSOd<sub>6</sub>):  $\delta$  8.80 s, 1H), 7.76–7.70 (m, 3H), 7.68–7.62 (m, 2H), 7.43–7.40 (m, 1H), 7.34 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 4.7,

1.6 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 4.5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSOd<sub>6</sub>):  $\delta$  156.3, 148.9, 147.9, 137.9, 137.4, 134.1, 132.0, 131.8, 131.0, 128.9, 126.1, 125.5, 115.3. IR (neat): 3138, 3060, 1584, 1525, 1404, 1334, 1304, 1271, 1108, 981, 814, 728. cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O [M + K]<sup>+</sup> 336.0517, found 336.0529.



Fig. 3. Absorption and emission spectra ( $\lambda_{exc}$  =470 nm) fluorescence of compounds 15, 26 and spectra of emission of mixture of 15 with thiopropanol described in Fig. 1. And emission observed under black light. Conditions: MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1.



BODIPYs fluorescence, whereas FITC channel at  $\lambda ex = 488$ nm,  $\lambda em = 530/30$  nm is related to 3-nitrososubstituted BODIPYs. Fig. 4D presents the percentage of cells and 4E the fluorescence intensity of 3-thiosubstituted BODIPYs. Results are expressed in mean ± SD.

## 4.1.7. 3-Nitrosyl-8-(2,6-dichlorophenyl)-BODIPY 15

Prepared from BODIPY 13 (164 mg, 0.488 mmol) using the optimized nitrosation reaction in 78% yield (139 mg, 0.380 mmol); m.p 75–80 °C. ( $C_6H_{14}$ /EtOAc 7:3). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.39 (s, 1H), 7.51 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 7.13 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 4.4 Hz, 1H)·<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 75

δ 156.1, 150.8, 142.6, 139.0, 135.0, 135.0, 133.6, 132.3, 129.9, 128.7, 125.1, 124.7, 115.41. IR (neat): 1608, 1521, 1407, 1333, 1306, 1263, 1108, 991 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>BCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O [M + K]<sup>+</sup> 403.9743, found 403.9737.

4.1.8. 2-Nitrosyl-8-phenyl-BODIPY 16

Prepared from BODIPY 12 (70 mg, 0.261 mmol) using the optimized nitrosation reaction with 19% yield (15 mg, 0.050 mmol); m.p 195–200 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/DCM 7:3). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSOd<sub>6</sub>):  $\delta$  8.74 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.78–7.72 (m, 3H), 7.70–7.63 (m, 2H), 7.41 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.01 (d, J = 4.6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  151.7, 149.6, 141.7, 137.8, 136.2, 135.4, 132.4, 132.0, 131.8, 130.5, 129.07, 122.6, 122.0. IR (neat): 1584, 1562, 1522, 1389, 1364, 1311, 1255, 1221, 1085, 995 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O [M + K]<sup>+</sup> 336.0517, found 336.0519.

## 4.1.9. 3,8-Diphenyl-5-nitrosyl-BODIPY 21

Prepared from BODIPY 20 (43 mg, 0.124 mmol) using the optimized nitrosation reaction in 73% yield (34 mg, 0.091 mmol); m.p 221–230 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/DCM 7:3). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.07 (m, 2H), 7.68–7.50 (m, 8H), 7.17 (dd, J = 5.9, 4.7 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 4.4 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  169.0, 149.7, 145.4, 140.4, 136.5, 134.2, 133.0, 132.2, 131.2, 130.7, 130.7, 130.4, 130.4, 130.3, 129.0, 128.8, 126.9, 124.1, 115.4. IR (neat): 1601, 1583, 1502, 1346, 1306, 1118, 1086, 983 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O [M + K]<sup>+</sup>412.0835, found 412.0829.

## 4.2. General procedure 2: reaction to obtain the compounds 26

To a stirring solution of the BODIPY 15 (137 mg, 0.375 mmol) in methanol (10 mL), thiopropanol (1 eq.) was added, and the reaction course was followed by TLC every 20 min. After full consumption of the starting material, water (15 mL) was added and left stirring for 5 min. The solution is, then, extracted three times with DCM (15 mL), dried over magnesium sulfate and evaporated on rotary evaporator. The residue is purified chromatographically in a silica gel column, using mixtures of Hex:EtOAc as eluents.

#### 4.2.1. 3-Propylthio-5-amine-8-(2,6-dichlorophenyl)-BODIPY 26

(41 mg, 0.097 mmol) with 26% yield; m.p 90–94 °C. (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/EtOAc 1:1). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.45–7.29 (m, 3H), 6.56 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.16 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.03 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.87 (s, 2H), 2.99 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.78 (h, J = 7.4 Hz, 2H), 1.06 (t, J = 7.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  161.0, 136.5, 136.3, 133.2, 132.0, 130.6, 128.3, 128.2, 126.0, 125.6, 120.26, 115.1, 113.4, 36.3, 22.7, 13.6. IR (neat): 3372, 2963, 2929, 2873, 1641, 1603, 1532, 1453, 1423, 1363, 1287, 1171, 1050, 956, 802 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): m/z calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>BCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M + H]<sup>+</sup> 426.0581, found 426.0575.

#### 4.3. General procedure 3: photophysical and analytical assays

Absorption and emission spectra were recorded on a UV/vis spectrophotometer and on a fluorimeter ( $\lambda$ exc 470 nm), respectively. Fluorescence quantum yields were calculated using a comparative method with a fluorescein standard (0.1 M in NaOH (aq.) –  $\Phi = 0.91$ ,  $\lambda$ exc = 470 nm). The integrated fluorescences of five diluted samples were recorded and plotted against the absorbance. The slope of each linear tendency curve was calculated and the quantum yield of the tested compound ( $\Phi_x$ ) was obtained, using the following equation:

$$\Phi x = \Phi st \left[ mx \right] nx$$

where  $\Phi_{st}$  is the quantum yield of the standard,  $m_x$  and  $m_{st}$  are the slopes for the test compound and the standard compound, respectively, and  $n_x$  and  $n_{st}$  are the refractive indices of the solvents.

To access the potential analytical application of nitroso-BODIPYs, 1 mL solutions of several analytes in distilled water (50 mM) were prepared. Besides the 20 standard amino acids, aqueous solutions of ethylamine, thiopropanol, 2-mercaptopyridine, cystine, N-acetylcysteine and glutathione were also prepared. Each solution was treated with 1 mL of a methanolic solution of the BODIPY 15 (0.5 mM), and fluorescence spectrum was recorded after stirring with a magnetic stirrer for 1 min. Fluorescence emission under black light (370 nm) incidence was also recorded via digital photography. Besides compound 15, other nitrosylated compounds were also tested in a similar manner with specific analytes.

#### 4.4. General procedure 4: cellular uptake

A431 human squamous cell carcinoma cell line was cultivated in DMEM, containing 10% heat-inactivated FBS and 1% (v/v) of an antibiotic/antimycotic solution (10.000 IU of penicillin, 10 mg of streptomycin and 25 µg of amphotericin B per mL). The cells were kept at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cellular uptake of BODIPY 15 was analyzed by flow cytometry. For this purpose, tumor cells, at  $7 \times 10^5$  cells/well, were seeded onto 6-wells microplates, containing sterilized cover slips for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells were then rinsed using sterilized saline and incubated with BODIPY (stock solution 1 mg/mL in DMSO diluted 1:2500 using culture medium) during 5 min, 30 min and 24 h (n = 3 per incubation time). Flow cytometry analysis was performed, after rinsing the treated cells, using saline and trypsin at 0.25%, followed by neutralization using complete DMEM medium. The samples' fluorescence was then monitored using flow cytometer (BD FACSCanto I) and 10,000 count at  $\lambda ex = 488$  nm,  $\lambda em = 530/30$  nm (FITC channel, 3-nitroso-substituted BODIPY) and  $\lambda ex = 488$  nm,  $\lambda em = 585/42$  nm (PerCP-A channel, 3-thio-substituted BODIPY). Treatment controls using culture medium without BODIPY were performed at each time point and cellular viability was monitored with or without BODIPY treatment. By the end of the analysis, cell viability was also monitored with 3  $\mu$ L of propidium iodide (50  $\mu$ g/mL) at  $\lambda$ ex = 488 nm,  $\lambda$ em = 530/ 30 nm. Statistical analysis was performed, using Oneway ANOVA with Tukey's multiple comparison test and a level of significance set at 0.05. Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### References

- [1] Treibs A, Kreuzer FH. Justus Liebigs Ann Chem 1968;718:208–23.
- [2] [For reviews in BODIPY chemistry and photophysics see:].
- (a) Loudet A, Burgess K. Chem Rev 2007;107:4891–932;
- (b) Ulrich G, Ziessel R, Harriman A. Angew Chem, Int Ed 2008;47:1184–201;
- (c) Rezende LCD, Emery FS. Orbital Electron J Chem 2013;5(1):62-83
  - [3] Bosch E, Kochi JK. J Org Chem 1994;59:5573–86
  - [4] [For papers on Nitrosation:].
  - (a) Gowenlock BG, Richter-Addo GB. Chem Rev 2004;104:3315–40;
  - (b) Hall MJ, McDonnell SO, Killoran J, O'Shea DF. J Org Chem 2005:5571–8;

- (c) Liras M, Prieto JB, Pintado-Sierra M, Arbeloa FL, García-Moreno I, Costela A, Infantes L, Sastre R, Amat-Guerri F. Org Lett 2007;9:4183–6
  - [5] Renault K, Sabot C, Renard PY. Eur J Org Chem 2015:7992–6.
- [6] (a) Ballatori N, et al. Biol Chem 2009;390:191–214;
- (b) Tew DK. Cancer Res 1994;16:4313–20;
- (c) Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, et al. Oxid Med Cell Longev 2013:972913–23.
- [7] Jeong ME, et al. Stem Cell Rep 2018;13:600–14.
- [8] Molander GA, Cavalcanti LN. J Org Chem 2012;77:4402–13.
- [9] Nepomnyashchii AB, Bröring M, Ahrens J, Bard AJ. J Am Chem Soc 2011;133:86330.
- [10] Rezende LCD, Vaidergorn MM, Biazzotto-Moraes JC, Emery FS. J Fluoresc 2014;24:257.
- [11] Rohand T, Qin W, Boens N, Dehaen W. Eur J Org Chem 2006:4658–63.
- [12] Verbelen B, Boodts S, Hofkens J, Boens N, Dehaen W. Angew Chem Int Ed 2015;54:4612–6.
- [13] a) Wories HJ, Koek JH, Ladder G, Lugtenburg J. Recl Trav Chim Pays-Bas 1985;104:288;
- (b) Boyer JH, Haag AM, Sathyamoorthi G, Soong ML, Thangaraj K, Pavlopoulos TG. Heteroat Chem 1993;4:39–49.
- [14] (a) Pavlopoulos TG, Boyer JH, Shah M, Thangaraj K, Soong ML. Appl Opt 1990;29:3885;
- (b) Shah M, Thangaraj K, Soong M-L, Wolford LT, Boyer JH, Politzer IR, Pavlopoulos TG. Heteroat Chem 1990;1:389.
- [15] (a) Yogo T, Urano Y, Ishitsuka Y, Maniwa F, Nagano T. J Am Chem Soc 2005;127:12162;

(b) Jiao L, Pang W, Zhou J, Wei Y, Mu X, Bai G, Hao E. J Org Chem

2011;76:9988–96.

- [16] Jiao L, Yu C, Li J, Wang Z, Wu M, Hao E. J Org Chem 2009;74:7525–8.
- [17] Rezende LCD, Melo SM, Boodts S, Verbelen B, Dehaen W, Emery FS. Org Biomol Chem 2015;13:6031–
  8.
- [18] (a) Rohand T, Baruah M, Qin W, Boens N, Dehaen W. Chem Commun 2006:266–8; (b) Leen V, Gonzalvo VZ, Deborggraeve WM, Boens N, Dehaen W. Chem Commun 2010;46:4908–10.
- [19] Esnal I, Bañuelos J, Arbeloa IL, Costela A, Garcia-Moreno I, Garzón M, Agarrabeitia AR, Ortiz M. J RSC Adv 2013;3:1547–56.
- [20] Lakshmi V, Sharma R, Ravikanth M. Rep Org Chem 2016;6:1–24.
- [21] (a) Kee HL, Kirmaier C, Yu L, Thamyongkit P, Youngblood WJ, Calder ME, Ramos L, Noll BC, Bocian DF, Scheidt WR, Birge RR, Lindsey JS, Holten DJ. Phys Chem B 2005;109:20433–43.
- [22] Lv F, Tang B, Hao E, Liu Q, Wanga H, Jiao L. Chem Commun 2019;55:1639–42.
- [23] (a) Rohand T, Qin W, Boens N, Dehaen W. Eur J Org Chem 2006:4658–63;
- (b) Han J, Gonzalez O, Aguilar-Aguilar A, Peña-Cabrera E, Burgess K. Org Biomol Chem 2009;7:34-6;
- (c) Duran-Sampedro G, Palao E, Agarrabeitia AR, de la Moya S, Boens N, Ortiz M. J RSC Adv 2014;4:19210–3.

## CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou a quão promissora é a relação existente entre a Química Medicinal e Biológica e a Eletroquímica Molecular. Os casos de investigação aqui estudados revelaram que a compreensão do mecanismo eletroquímico de transferência de elétrons *in vitro* e a obtenção dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos são úteis à compreensão de vários processos que podem ocorrer em nível biológico. Este é um ponto fundamental para o desenvolvimento de moléculas bioativas, candidatas a protótipos de novos fármacos, principalmente relacionados a pró-fármacos, bioativados por reações de transferência de elétrons.

Os resultados reunidos explicam em parte os efeitos citotóxicos e parasiticidas relatados para o CASO 1. Foram identificados vários compostos que são ativos contra o parasita causador da doença de Chagas e, através da voltametria cíclica, foi possível identificar um importante relação estrutura-redox -atividade biológica para esses moduladores redox à base de quinona.

No CASO II, novos corantes nitrosil BODIPY foram investigados por meios eletroquímicos e ópticos. Os estudos destacaram a influência de solventes e o papel essencial da natureza e posição do C-nitroso substituinte. Uma das características mais surpreendentes observadas neste trabalho é até que ponto a natureza do solvente polar aprótico permite o discernimento do mecanismo misto para 2, alterando a proporção monômero-dímero de azodioxi. Dimerização reversível, uma das mais características e intrigantes propriedades de compostos aromáticos C-nitroso e seus análogos heteroaromáticos, permaneceu misterioso por décadas, e só recentemente é que um mais completo compreensão dos porquês e dos motivos deste processo finalmente começou a emergir.

O conhecimento aprofundado do comportamento desses compostos está começando a lançar uma luz valiosa no estudo de muitas outras áreas da química. De acordo com os resultados obtidos via CDFT, a adição do grupo NO ao núcleo BODIPY muda os principais centros reativos eletrofílicos do pirrol anéis em direção a NO. Em consonância com os resultados experimentais, o cálculo vertical afinidade eletrônica dos três compostos investigados revelou que incorporar NO na porção BODIPY facilita o processo de redução. A fronteira molecular a análise dos orbitais mostrou que as bandas de absorção mais intensas no BODIPY e compostos derivados de BODIPY-NO são caracterizados principalmente por meio de um mecanismo de transferência de carga (CT) do grupo NO para o núcleo BODIPY. A

porção BODIPY pode desempenhar um papel importante nas propriedades eletrônicas destes sistemas, promovendo um deslocamento batocrômico.

Em geral, os métodos eletroquímicos são muito úteis para prever o mecanismo de formação de adutos e a ocorrência de rearranjo estrutural de compostos semelhantes a estes e parecem bem adaptadas para explorar as vias redox *in vitro* e correlacioná-las a estudos *in vivo*. Uma vantagem adicional associada à eletroquímica está relacionada ao fato de que ela permite acompanhar a quebra redutiva *in situ*, a caracterização dos intermediários eletrogerados, via técnicas hifenadas, o cálculo do número de elétrons transferidos e mimetiza as experiências *in vitro* e *in vivo*.

# REFERÊNCIAS

BOENS, N.; LEEN, V.; DEHAEN, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. Chemical Society Reviews, v. 41, n. 3, p. 1130-1172, 2012.

BOLTON, J. L. et al. Role of Quinones in Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, p. 135-160, 2000.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Electroquímica Princípios, Métodos e Aplicações. Livraria Almedina, Reimpressão 1996, p. 298-299.

DA CRUZ, E, H, G et al. Synthesis and antitumor activity of selenium-containing quinonebased triazoles possessing two redox centres, and their mechanistic insights. **EuropeanJournalof Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 1-16, 2016.

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

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

DANIEL A. SCHERSON, YURIY V. TOLMACHEV, and IONEL C. STEFAN. Ultraviolet/Visible Spectroelectrochemistry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.) Copyright John Wiley & Sons Ltd pp. 10172–10225, Chichester, 2000

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

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

FERREIRA, F. R. Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico. 2013. 151 p. Tese de doutorado, Físico-Química - Universidade Federal de Alagoas, 23 de janeiro de 2013.

GONÇALVES, F. C.; et al. Células-tronco mesenquimais agem como antioxidante e elevam os níveis de glutationa reduzida em modelo experimental de colite ulcerativa. **Clin. Biomed. Res.**, v. 34, 2014.

GONTIJO, T. B. et al. Novel fluorescent lapachone-based BODIPY: synthesis, computational and electrochemical aspects, and subcellular localisation of a potent antitumour hybrid quinone. **Chemical Communications**, v. 52, p. 13281-13284, 2016.

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

JARDIM, G. A. M. et al. Rhodium-catalyzed C-H bond activation for the synthesis of quinonoid compounds: Significant Anti-Trypanosoma cruzi activities and electrochemical studies of functionalized quinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 406-419, 2017.

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.

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

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer, 3ª edição, 2006.

LEE, EUNYOUNG; SEO, EUN-YOUNG; KWON, YOUNGJOO; HA, HUNJOO. Rapid and Reliable Measurement for Evaluating Directly the Reactivity of N-Acetylcysteine with 72

LEE, J. H. et al. Soft implantable microelectrodes for future medicine: prosthetics, neural signal recording and neuromodulation. **Lab Chip**, v. 16, p. 959–976, 2016.

MALTA, V. R. S. Estudo cristalográfico de naftoquinonas e seus derivados e cálculos teóricos de propriedades relevantes na relação estrutura-atividade. 2000. 258 f. Tese (Doutorado em

Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

MENG, J.; LV, Z.; QIAO, X.; LI, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, C. The decays of redox-stress response capacity is a substantive characteristic of aging: Revising the redox theory of aging. Redox Biology, v. 11, n. 365-374, 2017.

MONKS, T. J; JONES, D. C. The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers. **Current Drug Metabolism**,v. 3,p.425–438, 2002.

PAIVA, Y.G.; FERREIRA, Fabricia da Rocha; SILVA, T. L.; Labbe, E; BURIEZ, O.; AMATORE, C.; Goulart, Marilia O. F. Electrochemically Driven Supramolecular Interaction of Quinones and Ferrocifens: An Example of Redox Activation of Bioactive Compounds. Current Topics in Medicinal Chemistry (Print). v.15, p.136 - 162, 2015.

REDAELLI, M. et al. New naphthoquinone derivatives against glioma cells. **European** Journal of Medicinal Chemistry, v. 96, p. 458-466, 2015.

REZENDE, L. C. D. Síntese, caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY.Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2016.

ROHAND, T.; et al. Funcionalização de corantes fluorescentes BODIPY por substituição nucleofílica. **Chemical Communications**, v. 42, n. 3, p. 266-268, 2006.

ROHAND, T.; et al. Palladium-Catalyzed Coupling Reactions for the Functionalization of BODIPY Dyes with Fluorescence Spanning the Visible Spectrum. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 20, p. 4658–4663, 2006.

SAVEANT, J. Molecular Electrochemistry: Recent Trends and Upcoming Challenges. **ChemElectroChem**, v. 3, p. 1967 – 1977, 2016.

SIES, H; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. Annu. Rev. Biochem. v. 86, p. 715-748, 2017.

SILVA, T. L.; AZEVEDO, M. L. G.; FERREIRA, F. R.; SANTOS, D. C.; AMATORE, C.; GOULART, M.O.F. Quinone-based molecular electrochemistry and their contributions to medicinal chemistry: a look at the present and future. **Current Opinion In Electrochemistry**.,

v.24, p.79 - 87, 2020.

SOUZA, D.; MACHADO, S.; AVACA, L. Square Wave Voltammetry. Part I: theorical aspects. Química Nova, v. 26, n. 1, 2003.

T. L. Silva, J. C. S. da Silva, D. J. P. Lima, F. R. Ferreira, C. C. de Vasconcelos, D. C. Santos,C. D. Netto, P. R. R. Costa, M. O. F. Goulart, J. Braz. Chem. Soc.2019, *30*, 2438–2451.

TANG, Y.; et al. Development of fluorescente probes based on protection-deprotection of the key functional groups for biological imaging, **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, p. 5003-5015, 2015.

TRIBS, A.; KREUZER, F.-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. **European Chemical Societies**, v. 718, p. 208–223, 1968.

VIEIRA, A. A. et al. Hybrid compounds with two redox centres: Modular synthesis of

YUAN, L.; et al. Far-red to near infrared analyteresponsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging, **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 622-661, 2013.