

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Síntese, avaliação biológica e *docking* de novos derivados
2,3-substituídos-1,4-naftoquinônicos contendo nitrogênio,
oxigênio e enxofre com atividade anticâncer**

Maicon Delarmelina

Dissertação de Mestrado em Química

Vitória

2013

Maicon Delarmelina

Síntese, avaliação biológica e *docking* de novos derivados 2,3-substituídos-1,4-naftoquinônicos contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre com atividade anticâncer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Sandro J. Greco

VITÓRIA
2013

**Síntese, avaliação biológica e *docking* de novos derivados
2,3-substituídos-1,4-naftoquinônicos contendo nitrogênio,
oxigênio e enxofre com atividade anticâncer**

Maicon Delarmelina

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Química.

Aprovado em 30/08/2013 por:

Prof. Dr. Sandro José Greco
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Sergio Pinheiro
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, 30 de agosto de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me acompanhado e ter sido a força motriz para conquistar mais uma vitória.

À minha família, pelo apoio e incentivo, principalmente aos meus pais, Elza e José, que estiveram sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis dando suporte e compreensão.

Ao professor Dr. Sandro José Greco, pela orientação, paciência e oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À professora Letícia B. A. Rangel (UFES) e aos doutorandos Murilo F. Cerri, Klésia P. Madeira e Renata D. Daltoé pela realização dos testes *in vitro*.

Ao Professor Alex Gutterres Taranto (UFSJ), pela valiosa ajuda durante a realização dos trabalhos de *docking* molecular.

Ao Professor Sergio Pinheiro, pela participação na banca avaliadora.

Ao Professor Warley de Souza Borges, pela participação na banca avaliadora.

Ao Departamento de Química e ao Núcleo de Competências Químicas do Petróleo pela infraestrutura fornecida e análises realizadas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo apoio institucional.

À Capes pela bolsa fornecida.

Aos amigos da UFES que me acompanharam durante esse período.

Aos amigos do Laboratório de Síntese Orgânica & Medicinal (LSO&M), pela colaboração na realização desse trabalho, apoio e amizade.

“Essa felicidade que supomos, árvore dourada, que supomos toda arreada, existe sim, mas não a alcançamos, porque está sempre apenas onde a pomos e nunca a pomos onde nós estamos.”

Vicente de Carvalho

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento celular de tumores sólidos.	19
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2012/2013.	20
Figura 3. Taxas brutas de incidência estimadas para 2012/2013 por sexo no estado do Espírito Santo e na capital, Vitória.....	21
Figura 4. Alguns compostos utilizados no tratamento do câncer.	22
Figura 5. Derivados quinônicos de origem natural.	23
Figura 6. Alguns derivados quinônicos e suas aplicações na medicina.	24
Figura 7. Quinonas com atividade antineoplásica.	25
Figura 8. Mecanismo de ativação e atuação do fármaco Dinemicina A.	27
Figura 9. Ativação biorredutiva da Mitomicina C e sua ligação com o DNA.	30
Figura 10. Processo de redução das quinonas.	31
Figura 11. Estabilização captodativa dos radicais semiquinona.	31
Figura 12. Ciclo redox parcial das quinonas.	32
Figura 13. Derivados quinônicos contendo o grupo farmacofórico 1,4-naftoquinônico.	33
Figura 14. Estrutura química da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona.....	34
Figura 15. Metodologias para dissubstituir a 2,3-dicloronaftoquinona.....	35
Figura 16. Metodologias para obtenção de compostos 2-amino-1,4-naftoquinônicos.	35
Figura 17. Mecanismo de substituição nucleofílica com a 2-metóxi-1,4-naftoquinona.	36
Figura 18. Planejamento do trabalho experimental e dos estudos posteriores.	37
Figura 19. Mecanismo da reação de substituição nucleofílica na 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona.....	55
Figura 20. Explicação para a redução da eletrofilicidade do átomo de carbono ligado ao cloro.	56
Figura 21. Reagentes utilizados nas tentativas de síntese dos compostos 2-substituinte-3-cloro-1,4-naftoquinona e 2,3-substituinte1,4-naftoquinona.	56
Figura 22. Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto 25a	59
Figura 23. Expansão na região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto	

25b.	60
Figura 24. Expansão na região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto	
25c.	62
Figura 25. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto	
25d.	63
Figura 26. Síntese do derivado naftoquinônico 25e e 25f	64
Figura 27. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto	
25e.	65
Figura 28. Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto 25f	66
Figura 29. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto	
25g.	68
Figura 30. Efeito eletrônico esperado sob o derivado naftoquinônico 25a ao utilizar	
AgNO_3 , CeCl_3 e AlCl_3	70
Figura 31. Preparação da 2-metoxi-1,4-naftoquinona.	72
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H do composto 32	72
Figura 33. Mecanismo de substituição nucleofílica da 2-metoxilausona.	73
Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto 32a	75
Figura 35. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto	
32b.	76
Figura 36. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto	
32c.	77
Figura 37. Possíveis reações colaterais entre a 2-metoxi-1,4-naftoquinona (32) e o	
1,2-ditioletano (38).	79
Figura 38. Reação entre a 2-metoxi-1,4-naftoquinona (32) e o 1,2-ditioletano (38) em	
meio básico.	80
Figura 39. Mecanismo de adição oxidativa tipo Michael na 1,4-naftoquinona.	82
Figura 40. Mecanismos da adição oxidativa de Michael.	84
Figura 41. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto 44.	
.....	88
Figura 42. Proposta mecanística para a alquilação da guanina do DNA.	90
Figura 43. Alteração do pareamento das bases nitrogenadas do DNA após	
alquilação.	91
Figura 44. Estrutura cristalina das enzimas <i>PI3K</i> (1E7U) e <i>topoisomerase II</i> (1QZR).	
.....	93

Figura 45. Ligantes cristalográficos (Cinza) e estruturas redocadas. (A - Vermelho) Wortmannin (1E7U – KWT: PDB); (B - Verde) Dexrazoxano (1QZR – CDX: PDB)...	94
Figura 46. Conformação farmacofórica do LY294002 (verde) com o sítio ativo da enzima <i>PI3K</i>	95
Figura 47. Interações do complexo <i>PI3K</i> e os ligantes 25c , 25f , 25g e 44	97
Figura 48. Conformação farmacofórica do etoposídeo (verde) com o sítio ativo da enzima <i>topoisomerase II</i>	98
Figura 49. Interações do complexo <i>topoisomerase II</i> e os ligantes 25c , 25f , 25g e 44	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Síntese dos derivados naftoquinônicos dissustituídos a partir da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (25).	57
Tabela 2. Metodologias testadas para a obtenção de 25f	64
Tabela 3. Síntese dos produtos 32a-c a partir da 2-metoxi-1,4-naftoquinona 32	73
Tabela 4. Valores de IC ₅₀ para linhagens de câncer de pulmão (H460), mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e ovário (A2780).	89
Tabela 5. Energias de interação ligante/receptor entre os compostos 25c , 25f , 25g , 44 , etoposídeo, LY294002 e as proteínas <i>PI3Kγ</i> e <i>Topoisomerase II</i>	94

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Metodologias testadas para a obtenção do produto dissubstituído 40 . 69	
Esquema 2. Metodologias testadas para a obtenção de 41 a partir do produto monossobstituído 25a com 1,2-etanoditiol (38).....71	
Esquema 3. Metodologias testadas para obtenção de 43 a partir da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (32).78	
Esquema 4. Metodologias testadas para obtenção de 44 a partir da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (32).81	
Esquema 5. Metodologias de adição oxidativa testadas para obtenção de 4085	
Esquema 6. Metodologias de adição oxidativa testadas para obtenção de 4386	
Esquema 7. Metodologias de adição oxidativa testadas para obtenção de 4487	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido desoxirribonucleico

d – Dubleto

dd – Duplo-dubleto

ddd – Duplo-duplo-dubleto

dtd – Duplo-triplo-dubleto

dq – Duplo-quarteto

FTMS – *Fourier transform mass spectrometry*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

I.V. - Infravermelho

m - Multipleteo

MHz – Megahertz

PDB – *Protein Data Bank*

PI3K - Fosfatidilinositol-3-kinase

p.f. – Ponto de fusão

q - Quarteto

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

s - Singleto

t.a. – Temperatura ambiente

t – Tripleto

td – Triplo-dubleto

tdd – Triplo-duplo-dubleto

WHO - *World Health Organization*

MTT - Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium

IC₅₀ – Concentração inibitória mínima

LISTA DE SÍMBOLOS

δ – Deslocamento químico ou deformação angular da ligação química

ν – Deformação axial da ligação química

Å - Angstrom

[O] – Ambiente oxidante

RESUMO

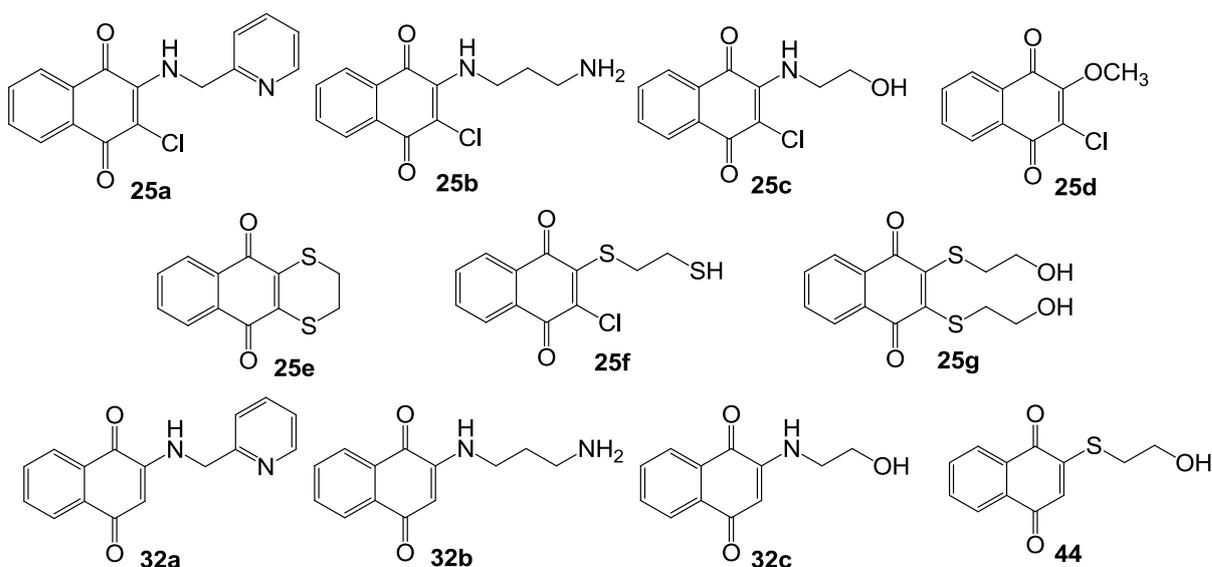
O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Estatisticamente, em pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO), o câncer é a segunda causa de óbitos no mundo com 13%, matando cerca de 6,0 milhões de pessoas por ano. Acredita-se que em 2015 o câncer seja responsável por 9 milhões de mortes no mundo. Os avanços verificados nas últimas décadas, na área da quimioterapia antineoplásica, têm facilitado consideravelmente a aplicação de outros tipos de tratamento de câncer e permitido maior número de curas. Entretanto, muitos tipos de câncer são intrinsecamente resistentes a quimioterápicos, enquanto outros inicialmente respondem ao tratamento, porém adquirem resistência aos fármacos. A resistência múltipla ao fármaco (MDR), o quadro mais grave, ocorre quando culturas de células *in vitro* e *in vivo* mostram resistência simultânea a diferentes fármacos. Portanto, apesar do grande número de compostos que compõem o arsenal quimioterápico de combate ao câncer, o problema de resistência requer a busca constante por novos fármacos eficazes no combate ao câncer, doença que afeta milhões de pessoas.

Em estudos farmacológicos com diversas quinonas foi evidenciado que esta classe de substância mostram variadas atividades farmacodinâmicas, dentre elas, as propriedades citotóxicas e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas. Como exemplo, destaca-se o estresse oxidativo que provocam ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio (ROS). Outra atividade marcante destas substâncias, descoberta recentemente, é a inibição da enzima *topoisomerase II*, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular.

Neste trabalho foram sintetizados em rendimentos que variaram de 52 a 89% onze derivados 1,4-naftoquinônicos contendo grupos oxigenados, nitrogenados e sulfurados nas posições 2 e/ou 3 do núcleo naftoquinônico. Posteriormente estes compostos tiveram as suas citotoxicidades avaliadas nas linhagens de câncer humano de pulmão (H460), mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e ovário (A2780). Os compostos **25f** e **44**, **25c** e **44**, e **25g** e **44** apresentaram uma significativa atividade anticâncer *in vitro* para as linhagens de câncer de pulmão H460, mama triplo-negativos MDA-MB-231 e ovário A2780, respectivamente, demonstrando um grande

potencial como compostos protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos.

Efetua-se também estudos de *docking* dos quatro compostos mais ativos com os alvos terapêuticos *PI3K* e *topoisomerase II*. Os estudos mostraram que um possível alvo terapêutico das substâncias sintetizadas é a enzima *topoisomerase II*, resultado das interações estabilizadoras observadas no complexo enzima/ligante.



Palavras-chave: 1,4-naftoquinona, atividade antineoplásica, *topoisomerase*, *PI3K* e *docking*.

ABSTRACT

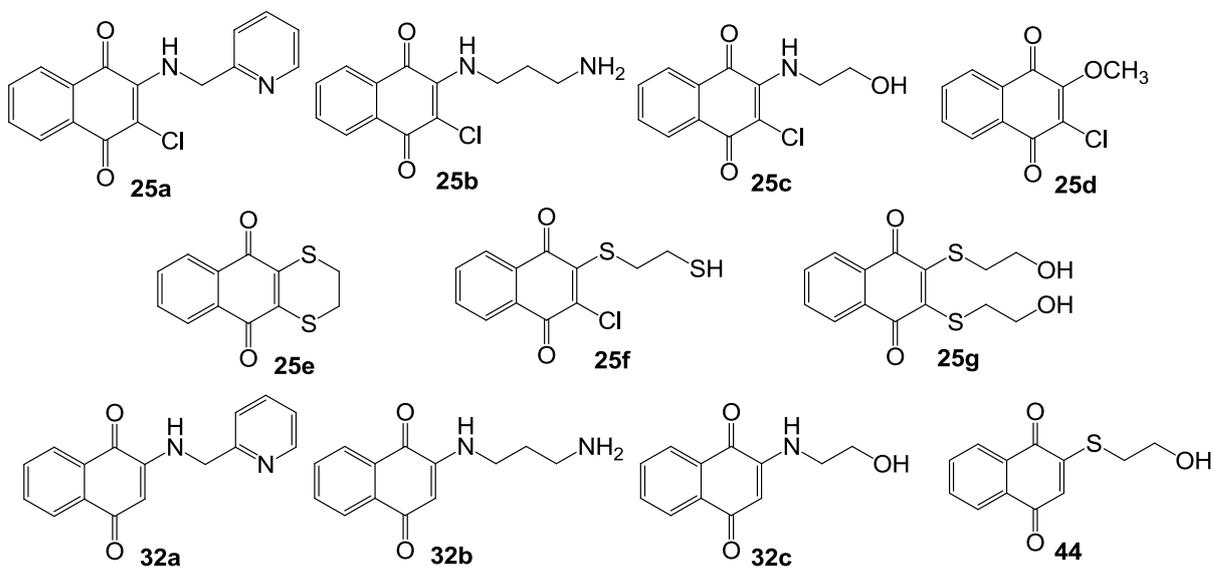
Cancer is one of the most feared disease in society, which have become a stigma of death and pain. Statistically, a survey conducted by the World Health Organization (WHO), cancer is the second cause of death in the world with 13%, killing about 6.0 million people per year. It is believed that in 2015 cancer will be responsible for over 9 million deaths worldwide. The advances achieved in recent decades in cancer chemotherapy research have greatly facilitated the implementation of other types of cancer treatment and allowed a greater number of cures. However, many cancers are intrinsically resistant to chemotherapy, while others respond to initial treatment, but it acquires drug resistance. The multiple drug resistance (MDR), the most severe case, occurs when *in vitro* and *in vivo* cell cultures show simultaneous resistance to different drugs. Therefore, despite the large number of compounds that make up the arsenal of anti-cancer chemotherapy, the resistance problem requires a constant search for effective new drugs in fighting cancer, a disease that affects millions of people.

In pharmacological studies with various quinones was evidenced that these substances show different pharmacodynamic activities, among them, cytotoxic properties and inhibiting cellular systems repairers, processes in which they act in different ways. As an example, there is oxidative stress that cause deleterious by inducing formation of endogenous bioactive oxygen species derived (ROS). Another remarkable activity of these substances, recently discovered, is the inhibition of the enzyme *topoisomerase II*, an action that triggers the onset of cellular apoptosis.

In this work were synthesized eleven 1,4-naphthoquinone derivatives containing functional groups, nitrogen and sulfur in positions 2 and/or 3 naphthoquinone core in yields ranging 52-89%. Subsequently these compounds had their cytotoxicity evaluated in strains of human lung cancer (H460), triple-negative breast (MDA-MB-231) and ovarian (A2780). Compounds **25f** and **44**, **44** and **25c**, and **25g** and **44** showed a significant anticancer *in vitro* activity for the strains of lung cancer H460, triple-negative breast MDA-MB-231 and ovarian A2780, respectively, showing a great potential as lead compounds for the development of new anticancer agents.

Docking studies of the four most active compounds with therapeutic targets *PI3K* and *topoisomerase II* were performed. Those studies have shown that a

possible therapeutic target of synthesized compounds is *topoisomerase II* enzyme because of the observed enzyme/binder complex stabilizing interactions.



Keyword: 1,4-naphthoquinone, antineoplastic activity, *topoisomerase*, *PI3K*, *docking*.

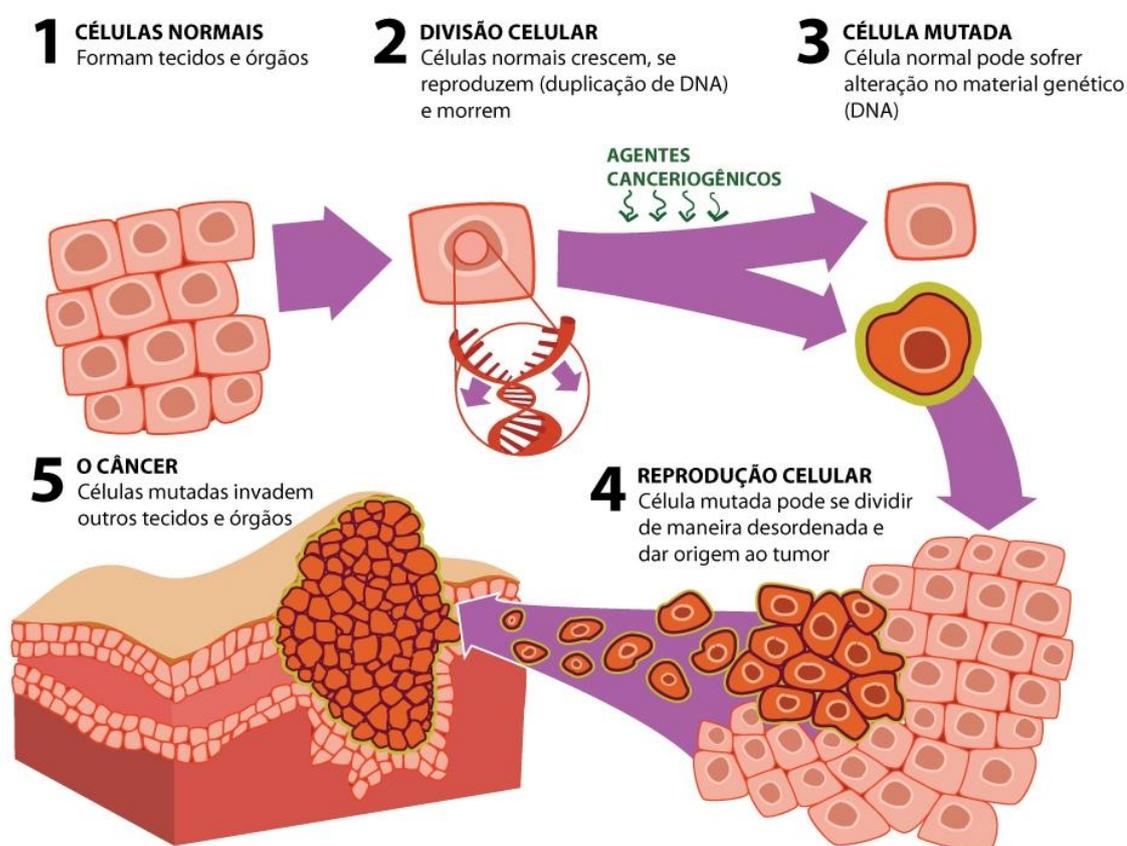
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Mecanismos citotóxicos das quinonas	24
1.1.1 Ciclo Redox dos derivados quinônicos	30
1.2 Os derivados 1,4-naftoquinônicos	33
2. OBJETIVOS.....	37
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	39
3.1 Materiais.....	39
3.2 Métodos.....	39
3.2.1 Cromatografia	39
3.2.2 Ponto de fusão.....	39
3.2.3 Espectroscopia de infravermelho.....	39
3.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C	40
3.2.5 Espectrometria de Massas.....	40
3.3 Procedimento experimental.....	41
3.3.1 Preparação do 2-cloro-3-[(piridin-2-ilmetil)amino]naftoquinona (25a)	41
3.3.2 Preparação do 2-[(3-aminopropil)amino]-3-cloronaftoquinona (25b)	42
3.3.3 Preparação do 2-cloro-3-((2-hidroxiethyl)amino)naftalen-1,4-diona (25c) ..	43
3.3.4 Preparação do 2-cloro-3-((2-hidroxiethyl)amino)naftalen-1,4-diona (25d) ..	44
3.3.6 Preparação do 2,3-dihidronafto[2,3-b][1,4]ditiino-5,10-diona (25e)	45
3.3.5 Preparação do 2-cloro-3-[(mercaptometil)tio]naftoquinona (25f)	46
3.3.7 Preparação do 2,3-bis[(2-hidroxiethyl)tio]naftoquinona (25g)	47
3.3.8 Preparação do 2-metoxinaftaleno-1,4-diona (32).....	48
3.3.9 Preparação do 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]naftoquinona (32a)	49
3.3.10 Preparação do 2-[(3-aminopropil)amino]naftoquinona (32b)	50
3.3.11 Preparação do 2-((2-hidroxiethyl)amino)naftalen-1,4-diona (32c).....	51

3.3.12	Preparação do 2-((2-hidroxietil)tio)naftalen-1,4-diona (44)	52
3.3.13	Avaliação da Atividade Antineoplásica In Vitro	53
3.3.14	Docking	53
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1	Reação de substituição nucleofílica com a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona	55
4.2	Reações de substituição nucleofílica com a 2-metoxi-1,4-naftoquinona	71
4.3	Reações de adição oxidativa 1,4 tipo de Michael com a 1,4-naftoquinona	82
4.4	Atividade antineoplásica <i>in Vitro</i>	88
4.5	Estudos de <i>Docking</i>	93
5.	CONCLUSÃO	101
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

1. INTRODUÇÃO

Conhecido há muitos séculos, o câncer é um conjunto de doenças causadas pela multiplicação descontrolada de células, desencadeada por um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e diferenciação celular. As células que sofrem transformação neoplásica proliferam-se excessivamente, formando tumores locais que podem comprimir ou invadir estruturas normais adjacentes, conforme representado na Figura 1.¹



Fonte: INCA

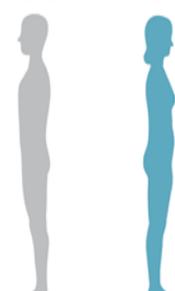
Figura 1. Desenvolvimento celular de tumores sólidos.

A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que, no ano 2030, haja 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse número deverá incidir em países de rendas baixa e média.²

Em países com grande volume de recursos financeiros, predominam os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon. Em países pobres e em desenvolvimento, os cânceres predominantes são os de estômago, fígado, cavidade

oral e colo do útero. Mesmo na tentativa de se criar padrões mais característicos de países ricos em relação aos de baixa e média renda, o padrão está mudando rapidamente, onde se observa um aumento progressivo nos cânceres de pulmão, mama, cólon e reto, os quais, historicamente, não apresentavam essa importância e magnitude.³

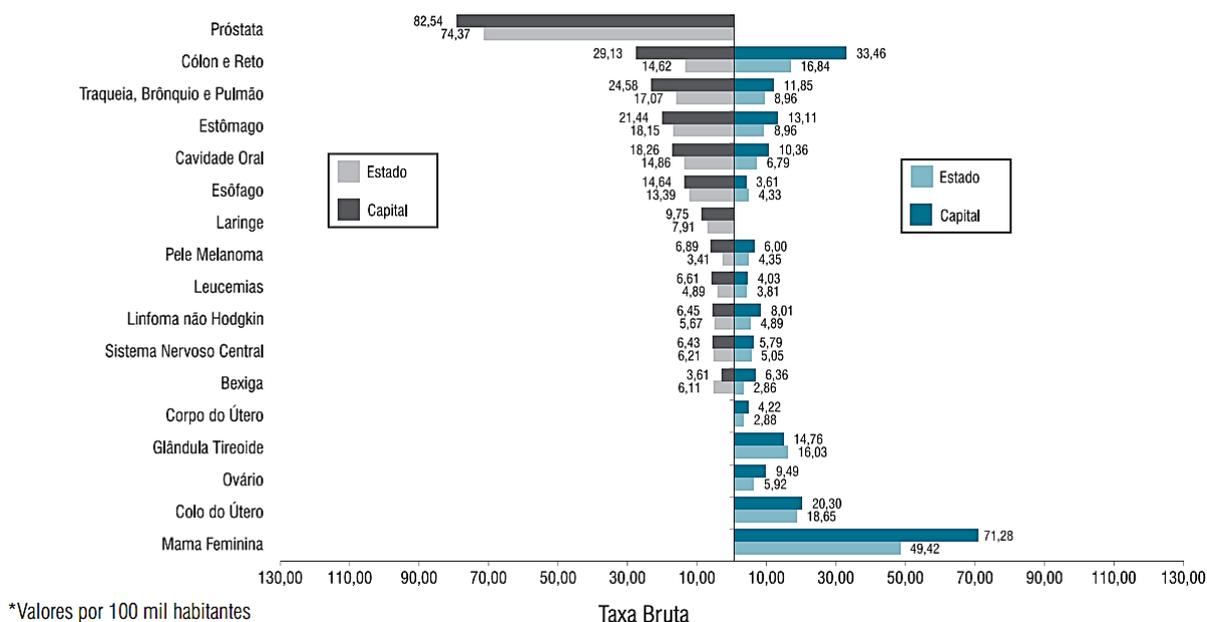
No Brasil, estimativas divulgadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram o perfil dos casos de câncer esperados para várias cidades brasileiras no biênio de 2012/2013 (Figura 2). Espera-se, para o Brasil, 52.680 novos casos de câncer da mama, 60.180 novos casos de câncer da próstata, 17.540 novos casos de câncer do colo do útero e 17.210 novos casos de câncer de pulmão em homens e 10.110 em mulheres, sendo esses os quatro tipos de câncer de maior incidência entre os brasileiros.³

Localização primária	casos novos	percentual		Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens 	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%		Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%		Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%		Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%		Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%		Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%		Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%		Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%		Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%

Fonte: INCA

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2012/2013.

No estado do Espírito Santo e na capital, Vitória, o perfil de casos previstos para esse mesmo período não é muito diferente do observado para o país. A Figura 3 mostra a distribuição de casos segundo o sexo do indivíduo, e nela vemos que os tipos de câncer mais comuns entre os homens deve ser o de próstata, seguido por cólon, reto e câncer no sistema respiratório. Já para as mulheres o que se espera é uma maior incidência de câncer de mama, seguido por cólon, reto e colo do útero.³



Fonte: INCA

Figura 3. Taxas brutas de incidência estimadas para 2012/2013 por sexo no estado do Espírito Santo e na capital, Vitória.

As causas de câncer podem ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores aleatórios podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. Cerca de 80% a 90% dos cânceres associam-se a fatores ambientais, como por exemplo, o cigarro que pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol que pode causar câncer de pele, e alguns vírus que podem causar leucemia. Outros estão em estudo, como alguns componentes dos alimentos que ingerimos, e muitos são ainda completamente desconhecidos.⁴

O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato das células de pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da doença, explica em parte o porquê de o câncer ser mais frequente nesses indivíduos. Os fatores de risco ambientais do câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos. Esses fatores atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células. O surgimento do câncer depende

da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer.⁴

Os três principais tratamentos realizados hoje para tratar e/ou curar o desenvolvimento de um tumor maligno são: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, utilizados separadamente ou em combinação. Atualmente a quimioterapia do câncer utiliza-se tanto de compostos orgânicos quanto compostos inorgânicos para matar as células neoplásicas (Figura 4). No grupo dos inorgânicos podemos citar a cisplatina (1) e a carbonoplatina (2) que vêm desempenhando um papel de grande importância no tratamento de várias neoplasias agressivas desde a descoberta de suas propriedades citotóxicas no final da década de 1960. Entretanto, é a classe dos compostos orgânicos que apresenta a mais vasta gama de candidatos a agentes antineoplásicos, e nela encontram-se fármacos clínicos amplamente utilizados como etoposídeo (3) e taxol (4).⁵⁻⁷

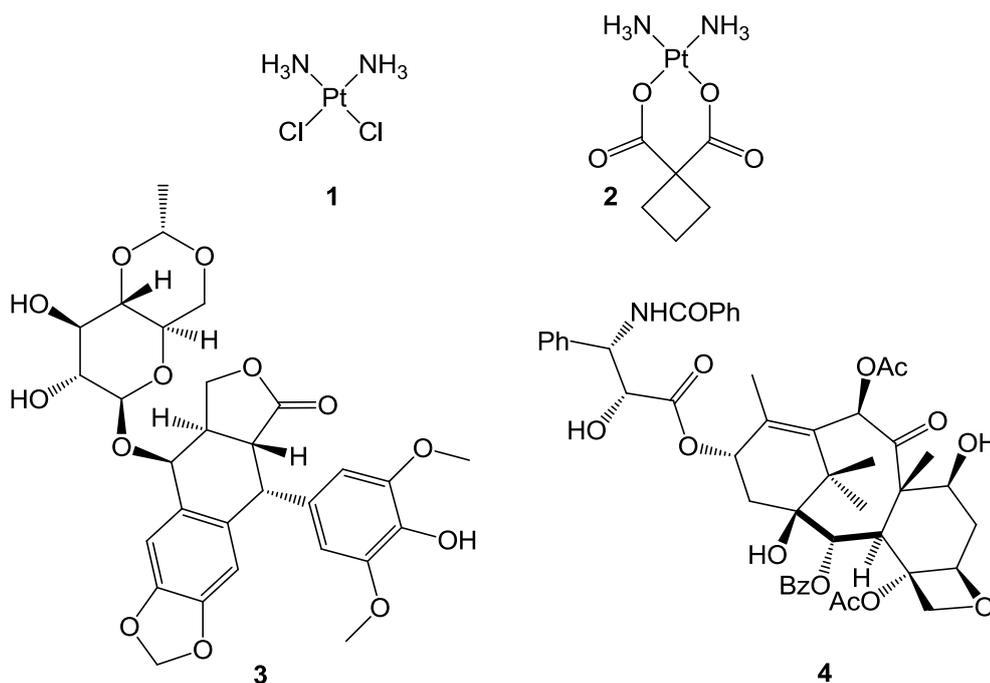


Figura 4. Alguns compostos utilizados no tratamento do câncer.

Muitas dessas substâncias citotóxicas matam a célula cancerosa atuando em fases específicas do ciclo celular e, conseqüentemente, só exercem sua atividade contra células que se encontram em processo de divisão. Os tumores sólidos, que apresentam divisão lenta, tais como carcinomas de pulmão, cólon e mama, respondem pouco aos agentes quimioterápicos. Além disso, outra limitação da

quimioterapia é que a maioria dos fármacos antineoplásicos possui alta toxicidade para as células normais e deve ser administrado com extremo cuidado.¹

Pesquisas na área da terapia do câncer, juntamente com o maior entendimento do mecanismo de ação dos quimioterápicos, a aplicação mais racional desses compostos e o planejamento de novos fármacos têm levado ao desenvolvimento de diversos compostos com atividades antineoplásicas promissoras que apresentam efeitos colaterais minimizados durante a quimioterapia. Dentre estas diversas substâncias naturais ou sintéticas tem lugar de destaque aquelas contendo o núcleo quinônico.

Os compostos quinônicos estão vastamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em plantas e tecidos animais (Figura 5). Eles apresentam características químicas únicas que são de vital importância para o sistema vivo onde estão inseridos. O composto Plastoquinona (5), por exemplo, é bem conhecido por participar da reação de fotossíntese em plantas. A Ubiquinona (6) (Coenzima Q₁₀) é outro exemplo que pode ser citado, este composto atua na cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias e participa da respiração celular aeróbica e na produção de energia. Os derivados quinônicos também são encontrados na forma de algumas vitaminas, como a vitamina K (7), um derivado 2-metílico-1,4-naftoquinônico que desempenha um importante papel no processo de coagulação sanguínea.⁸

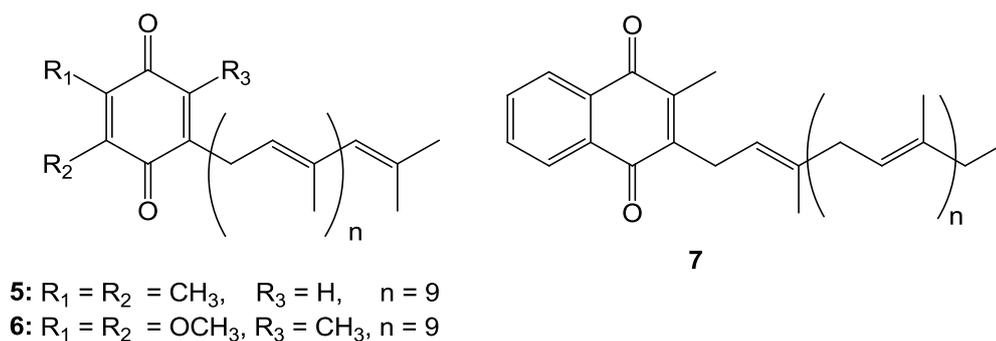


Figura 5. Derivados quinônicos de origem natural.

Além das funções biológicas já citadas, as quinonas vêm sendo largamente utilizadas em práticas clínicas (vide Figura 6 na página 24) e industriais devido sua biodinamicidades, destacando-se dentre muitas, as propriedades antibacteriana, anti-inflamatória, antimalarial, antifúngica, microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores. Essas

muitas propriedades são devidas aos diversos mecanismos distintos de atuação que esses compostos podem realizar quando inseridos no meio celular.⁹⁻¹⁷

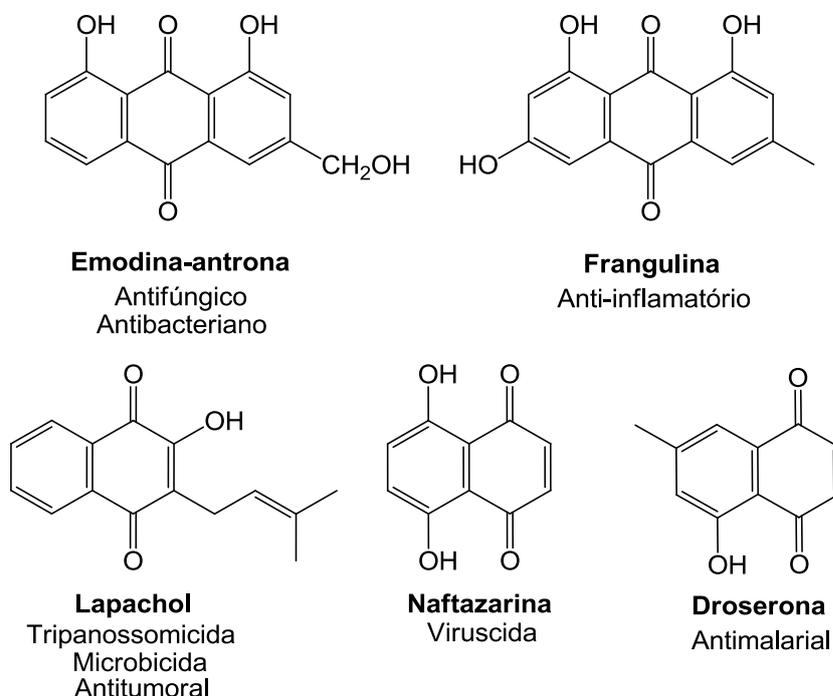


Figura 6. Alguns derivados quinônicos e suas aplicações na medicina.

1.1 Mecanismos citotóxicos das quinonas

As propriedades antineoplásicas e os mecanismos de ação de alguns derivados quinônicos (Figura 7) têm sido amplamente estudados, e é conhecido que eles podem agir como inibidores das enzimas *topoisomerase* e *telomerase*, por intercalação ou alquilação do DNA, inibição da proteína *HSP90* e principalmente mediante indução da citotoxicidade através do estresse oxidativo provocado por espécies oxigenadas reativas (ROS), como por exemplo, superóxido, proveniente da redução do núcleo quinônico por redutases celulares.^{18,19}

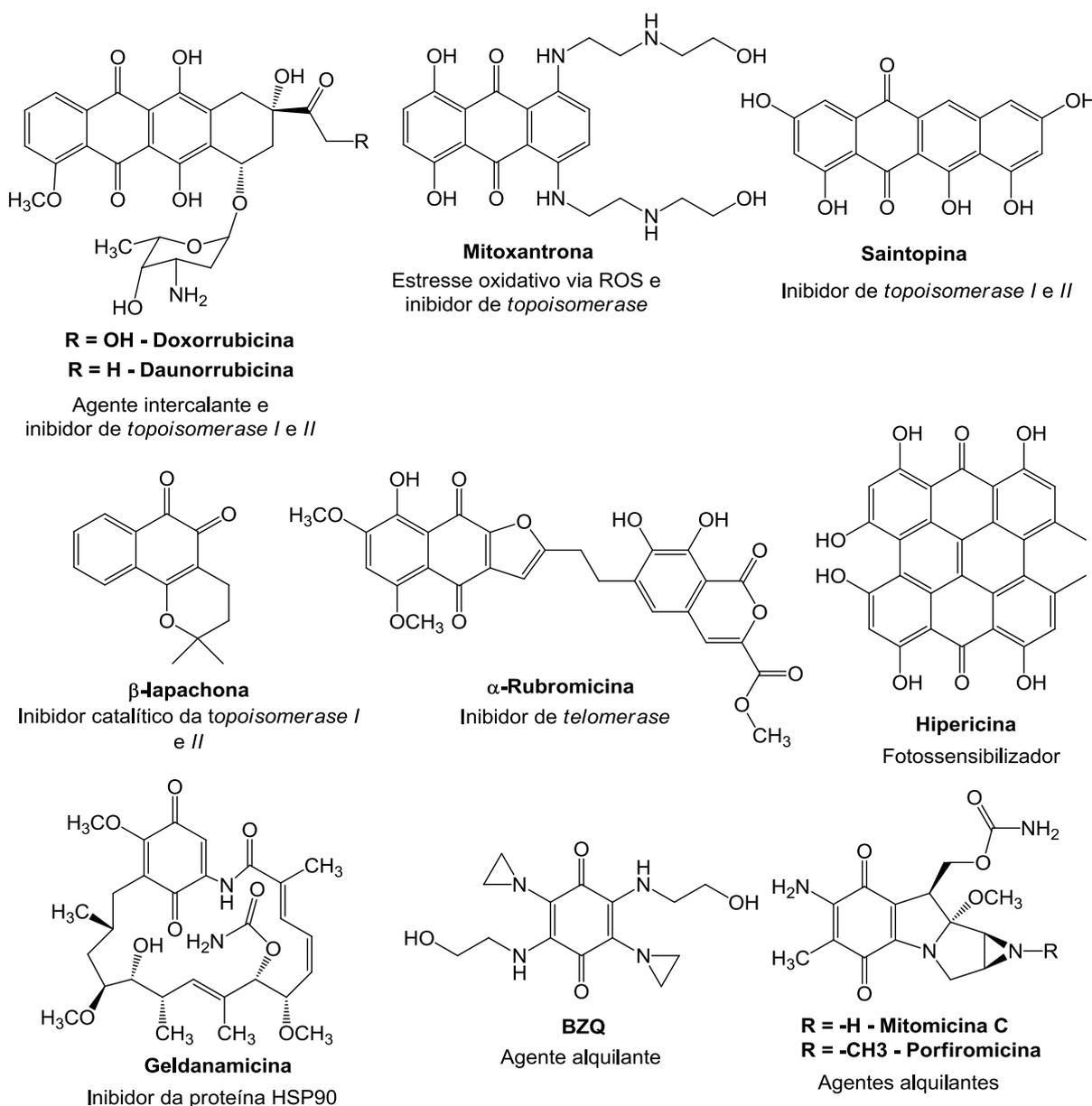


Figura 7. Quinonas com atividade antineoplásica.

As antraciclinas estão entre as classes de derivados quinônicos mais utilizadas como agentes antitumorais, nela encontramos compostos de destaque como a Daunorubicina e a Doxorubicina (Figura 7) que vêm sendo amplamente utilizados no tratamento de leucemias e alguns tipos de tumores sólidos. Estudos sobre o modo de atuação desses compostos mostram que seus principais alvos no combate às neoplasias são o DNA e as enzimas *topoisomerase I e II*. Assim, interagindo com as macromoléculas do DNA celular por intercalação e também com as enzimas *topoisomerase I e II* esses compostos são capazes de interferir no sistema de replicação e transcrição do DNA.²⁰

As *topoisomerases* são enzimas nucleares reguladoras da topologia do DNA através da separação física de suas fitas, transcrição e replicação durante a mitose celular. Quando presentes no processo de divisão celular, as antraciclinas podem converter *topoisomerase II* em uma toxina endógena, estabilizando o complexo *topoisomerase II/DNA* e bloqueando a transcrição e replicação do DNA da célula. Em sequência, ao detectar o problema, a célula inicia o processo de apoptose, ou seja, sua morte programada. Os fármacos que participam desse processo são chamados venenos de *topoisomerase*.^{19,21}

A partir da unidade básica das antraquinonas, conhecidas por suas características favoráveis à intercalação com o DNA, uma série de antracenodionas com atividade antitumoral foram sintetizados, das quais podemos destacar a Mitoxantrona (vide Figura 7 da página 25), um derivado antraquinônico contendo uma diamina como cadeia lateral. Esse composto mostrou-se ativo contra inúmeros tipos de câncer, como leucemia, linfoma e câncer de mama, atividades atribuídas, em grande parte, à sua capacidade de atuar de maneira semelhante às antraciclinas como veneno de *topoisomerase II*.²²

O antibiótico Saintopina (vide Figura 7 da página 25) é uma naftacenoquinona utilizada no tratamento de leucemia, sendo totalmente aromática, esse composto apresenta uma estrutura espacialmente plana favorável ao deslocamento eletrônico e consequente atuação como alquilante de DNA. Entretanto, sua atuação na alquilação e clivagem do DNA, é de pouca significância para a atividade biológica desse fármaco. A Saintopina, assim como as antraciclinas, atua preferencialmente como veneno das *topoisomerase I* e *II*, estabilizando os complexos formados entre DNA e ambas as enzimas, inibindo a replicação do DNA.¹⁹

Outro importante fármaco que atua matando as células cancerosas por intercalação do DNA é a Dinemicina A (Figura 8). Ela possui em sua estrutura um anel formado por 10 átomos de carbono, contendo duas ligações triplas e uma ligação dupla, além de uma antraquinona fundida a esse anel. Após a ativação no meio intracelular, essa substância se liga a uma sequência específica do DNA causando a quebra de sua fita provocando a morte celular.¹⁹

O mecanismo proposto para a ativação desse fármaco é mostrado na Figura 8, e nele vemos que inicialmente o núcleo quinônico da Dinemicina A (**8**) é reduzido para formar a hidroquinona correspondente (**9**). Em seguida, uma das hidroxilas da hidroquinona é oxidada, resultando na quebra de uma das ligações C-O do epóxido

presente na estrutura (**10**), então, o intermediário formado é atacado por nucleófilos existentes no meio celular, como a água, fornecendo, por fim, uma abertura *cis* do epóxido e restituindo a aromaticidade da hidroquinona (**11**). A partir da estrutura formada ocorre a ciclização de Bergman para formar uma espécie bis-radicalar 1,4-benzenóide (**12**) que é capaz de abstrair simultaneamente dois hidrogênios das fitas do DNA (**13**) causando um duplo rompimento delas.

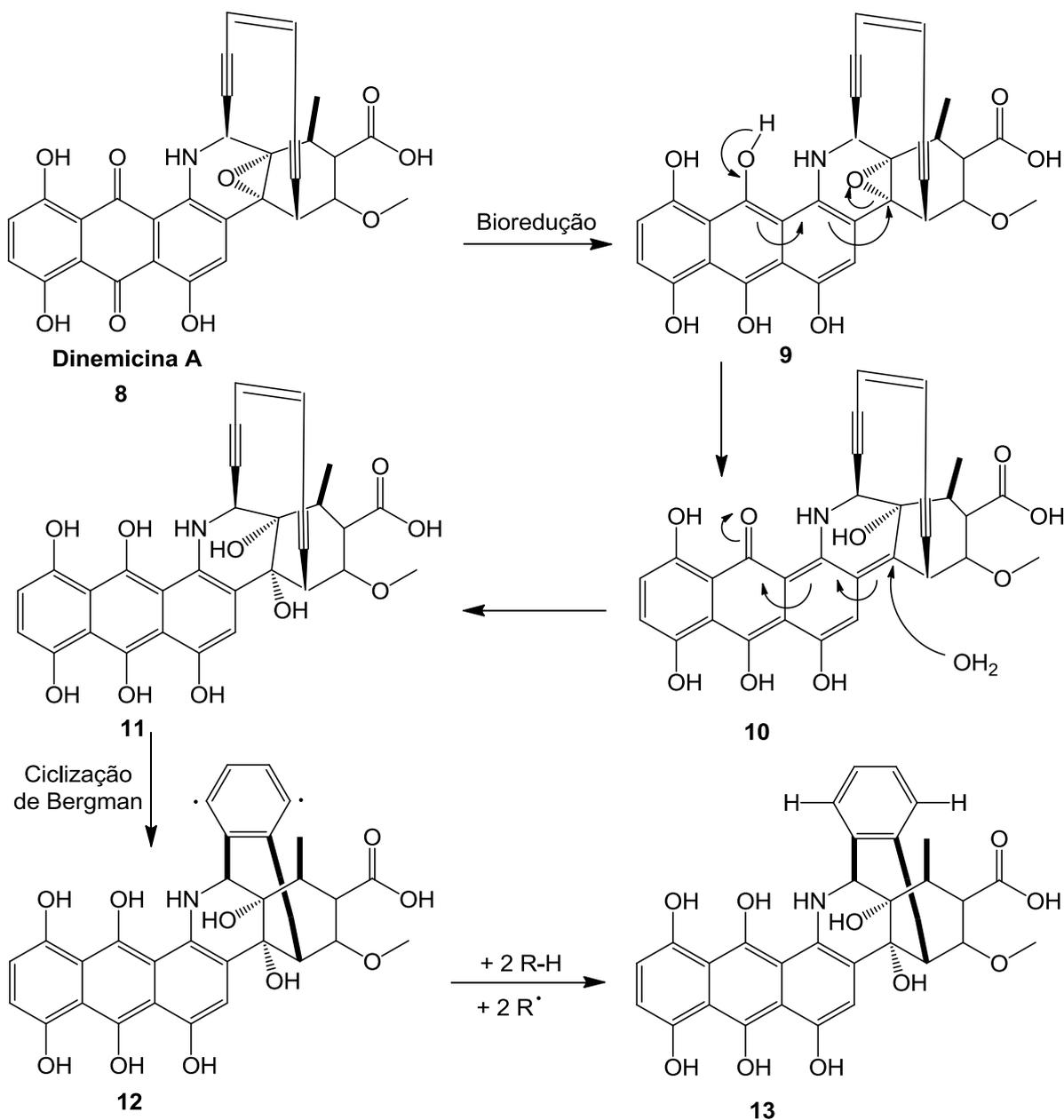


Figura 8. Mecanismo de ativação e atuação do fármaco Dinemicina A.

A β -lapachona (vide Figura 7 da página 25) é uma pirano-orto-naftoquinona que possui uma vasta gama de propriedades farmacológicas incluindo antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitripanossômica e antitumoral. Em combinação com o Taxol (4), a β -lapachona é altamente efetiva contra tumores de ovário e próstata e é um eficiente radiosensibilizador no tratamento de inúmeros tumores humanos.²³

O primeiro alvo da ação antineoplásica da β -lapachona descoberto foi a enzima *topoisomerase I*. Foi observado que o modo de inibição dessa enzima não é o mesmo que o de outros venenos de *topoisomerase*, pois ao invés de estabilizar o complexo enzima/DNA, a β -lapachona supostamente se liga preferencialmente à *topoisomerase I* livre e impede a formação desse complexo, podendo assim, ser classificada como uma substância supressora de *topoisomerase I*. Também é descrito na literatura que a β -lapachona atua inibindo a ação da *topoisomerase II*, impedindo que ela se ligue ao DNA. Esse processo está diretamente relacionado à habilidade redutora do núcleo quinônico em promover uma oxidação irreversível do resíduo de cisteína presente na enzima, grupo de grande importância na formação do complexo *topoisomerase II*/DNA.^{19,24-27}

O fármaco α -Rubromicina (vide Figura 7 da página 25) está entre o grupo de derivados quinônicos que apresentam efeitos inibidores da enzima *telomerase*, uma das responsáveis pela alta capacidade de divisão das células cancerosas e perda da capacidade de apoptose. As substâncias inibidoras dessa enzima têm a capacidade de se ligar as guanidinas presentes nos telômeros dos cromossomos humanos impedindo sua replicação pela ação da *telomerase*.^{19,28}

Um alvo muito interessante no desenvolvimento de novos fármacos anticâncer seletivos é a *Heat Shock Protein 90 (HSP90)*, que têm papel fundamental na estabilização conformacional e no funcionamento de muitas proteínas incluindo alguns sinalizadores oncogênicos responsáveis pelo crescimento e sobrevivência de células cancerosas. Fármacos como a Geldanamicina (vide Figura 7 da página 25) são capazes de se ligarem à *HSP90* promovendo a perda de suas funções, bloqueando os mecanismos de desenvolvimento do tumor canceroso e, por fim, causando a diminuição e degradação das proteínas envolvidas na progressão do câncer.^{19,29-31}

As chamadas quinonas fotossensibilizadoras por terapia fotodinâmica, como a Hipericina (vide Figura 7 da página 25), são fármacos que são utilizadas no

tratamento de tumores superficiais localizados, com bons resultados em tumores sólidos que se desenvolvem em algumas partes específicas do corpo como cabeça, pescoço e pele. Após a administração desses fármacos, o tumor é exposto a uma fonte de radiação com comprimento de onda específico resultando na formação de ânions radicais oxigenados altamente reativos que destruirão a célula cancerosa.^{19,32-34}

A Mitomicina C (vide Figura 7 da página 25) faz parte do grupo dos agentes alquilantes quinônicos biorredutíveis, um grupo de pró-fármacos que necessitam da ativação de suas propriedades alquilantes através da redução do núcleo quinônico. Essa substância tem sido utilizada em quimioterapia no tratamento de vários tipos de tumores sólidos, mas seu uso é limitado em razão dos efeitos colaterais, tais como mielossupressão e danos gastrointestinais. Em razão disso, vários análogos da Mitomicina C têm sido sintetizados buscando diminuir a toxicidade e aumentar a sua eficácia terapêutica.^{1,19,35}

A Porfiromicina (vide Figura 7 da página 25), composto derivado da Mitomicina C, vem sendo estudado desde 1967 mostrando ótimos resultados no tratamento de carcinomas de células escamosas de cérebro e pescoço. Apesar da maior eficácia da Porfiromicina em relação à Mitomicina C, seu uso clínico também é limitado pela mielossupressão que ela provoca.^{1,36,37}

Vários trabalhos mostram que a ativação redutiva da Mitomicina C resulta na formação de um intermediário reativo que se liga ao DNA por meio de ligações cruzadas entre duas fitas complementares. A Figura 9 mostra uma proposta de ativação desse fármaco, onde após a biorredução das carbonilas do núcleo quinônico, o par de elétrons não-ligante do nitrogênio heterocíclico perde a capacidade de conjugação com o carbonila quinônica, tornando-se mais nucleofílica e com isso, favorecendo a eliminação da metoxila (**14**) com conseqüente formação do imínio (**15**). Em seguida, ocorre oxidação da hidroxila fenólica e abertura do anel aziridínico (**16**) para formar uma cetona altamente conjugada (**17**) que funciona como eletrófilo na reação com a base nitrogenada nucleofílica do DNA. Após adição da primeira molécula de DNA para formar (**18**) um processo de decarboxilação e deaminação espontâneo ocorre para formar o imínio conjugado (**19**) que reage com mais uma molécula de DNA para formar (**20**).^{1,19,37,38}

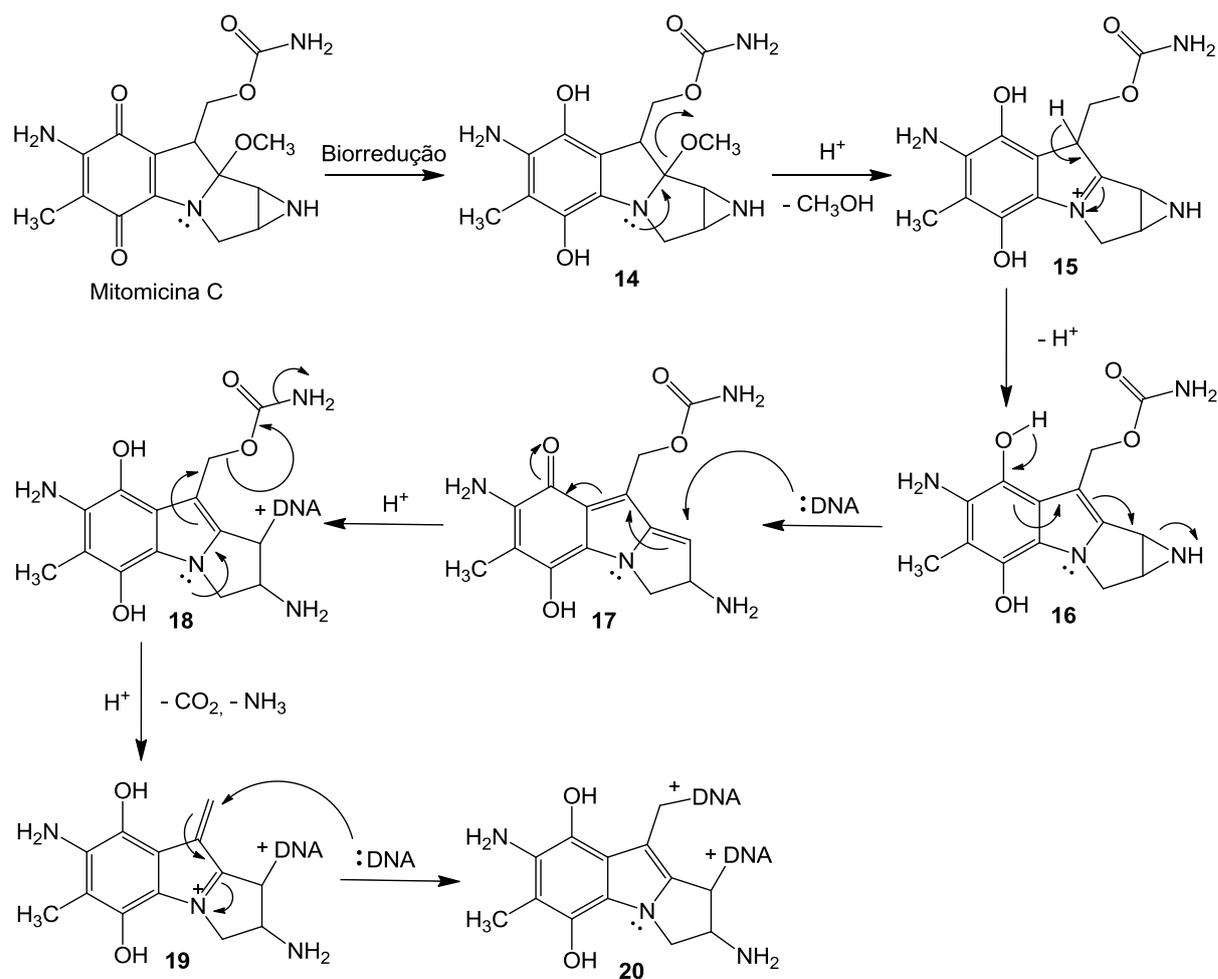


Figura 9. Ativação biorredutiva da Mitomicina C e sua ligação com o DNA.

No meio biológico, os derivados quinônicos sofrem redução bioquímica com o auxílio de enzimas catalisadoras que utilizam NADPH desidrogenase como fonte de elétrons. No caso dos agentes biorredutíveis, após a redução do núcleo quinônicos ele pode reagir com as proteínas do meio celular e desempenhar seu papel antineoplásico, entretanto, quando o oxigênio molecular está presente, a espécie reduzida pode ser oxidada novamente à quinona e gerar ânions radicais altamente reativos que também agirão na destruição da célula. A capacidade das quinonas em gerar espécies reativas oxigenadas será discutida em mais detalhes a seguir.

1.1.1 Ciclo Redox dos derivados quinônicos

A atividade citotóxica dos derivados quinônicos frequentemente está correlacionada ao seu comportamento químico no meio celular. Uma das características mais marcantes dessas espécies é a capacidade de atuarem como

agentes oxidantes de fácil redução para formarem um sistema completamente aromático no núcleo quinônico. Esses derivados podem aceitar um elétron na redução, formando o íon radical semiquinona, em seguida, recebendo outro elétron para formar a hidroquinona (Figura 10).^{19,39,40}

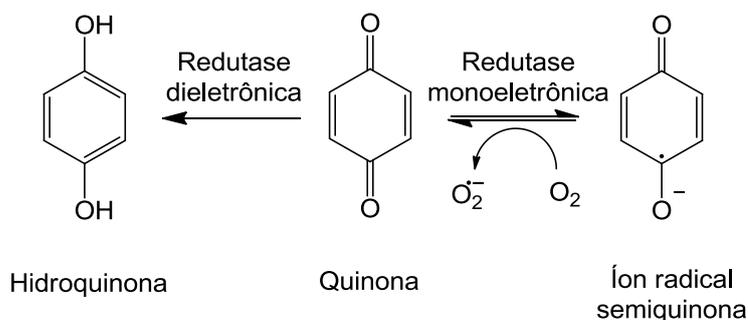


Figura 10: Processo de redução das quinonas.

A capacidade de formar íons radicais após a redução monoeletrônica da quinona é devido à estabilização proporcionada pelo efeito captodativo presente no núcleo quinônico. O efeito captodativo acontece quando grupos doadores e retiradores de elétrons presentes em um composto estabilizam simultaneamente o radical livre. No caso das semiquinonas, o átomo de oxigênio atua como doador de elétrons e a carbonila como retirador de elétrons, resultando em três estruturas de ressonância para a estabilização do íon radical semiquinona (Figura 11).¹⁸

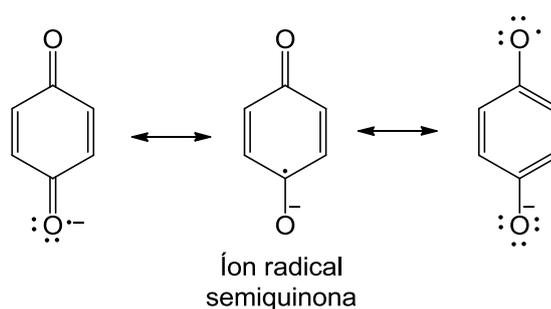


Figura 11. Estabilização captodativa dos radicais semiquinona.

A redução com apenas um elétron para formar o radical semiquinona pode ser catalisado pelo citocromo P450 redutase, citocromo b₅ redutase ou Ubiquinona oxidoredutase. Quando dois elétrons são transferidos para a quinona, a enzima de maior importância no processo é a quinona oxirredutase (DT-diaforase).³⁹⁻⁴¹

Em condições aeróbicas, o radical semiquinônico pode ser oxidado pelo próprio oxigênio molecular em um processo que resulta na formação dos ânions radicais oxigenados. A redução da quinona pela enzima redutase, seguida da oxidação do radical semiquinona pelo oxigênio molecular do meio é chamado “Ciclo redox da quinona”. A hidroquinona não apresenta a mesma facilidade em ser reoxidada e seu papel na produção de ânions radicais no meio biológico não é de grande significância.^{19,39,40}

Os ânions radicais superóxidos são altamente reativos em solução aquosa e podem formar peróxido de hidrogênio com o auxílio da enzima superóxido desmutase (SOD). O peróxido de hidrogênio pode ser particularmente perigoso nessas condições já que possíveis reações subsequentes com o Fe^{II} no meio celular (Reação de Fenton) resultarão na formação de radicais hidroxil que são extremamente tóxicos para a célula (Figura 12).^{9,42}

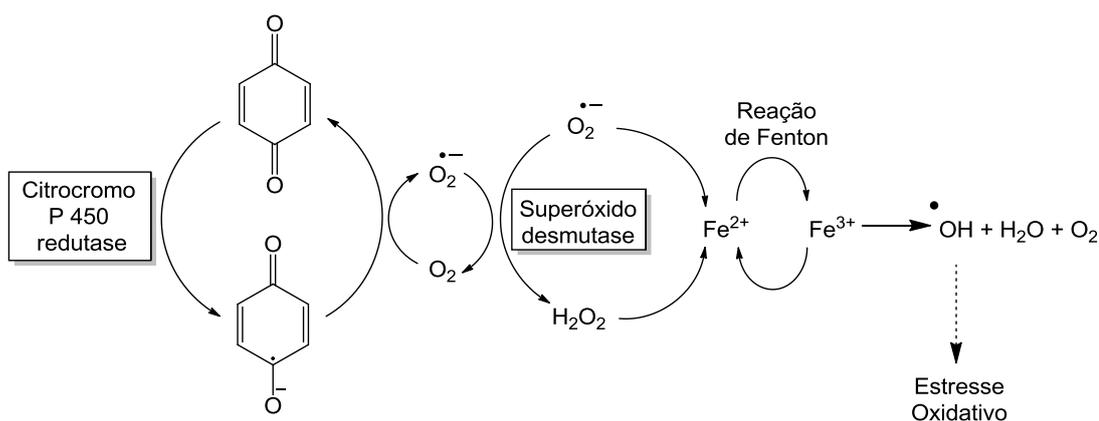


Figura 12. Ciclo redox parcial das quinonas.

Os radicais formados podem, a princípio, reagir e danificar todos os componentes da célula, desde proteínas, carboidratos e lipídios até ácidos nucléicos. Como a formação dessas espécies altamente reativas, depende apenas da quantidade de oxigênio molecular disponível, o ciclo redox da quinona continuará até que todo oxigênio do meio seja consumido, fazendo com que todo sistema de defesa antioxidante da célula seja sobrepajado promovendo o estresse oxidativo e, conseqüentemente, inúmeros danos ocorram, principalmente ao DNA da célula.¹⁹

1.2 Os derivados 1,4-naftoquinônicos

O grupo farmacofórico 1,4-naftoquinona é uma das mais amplas classes de compostos da família das quinonas e tem sido destaque por seus diversos efeitos biológicos pronunciados, como por exemplo, atividades antitumorais, antiproliferativa, antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, antimalarial, antiviral, antifúngica e antileishmaniose. Nos últimos anos, compostos como menadiona (**21**), juglona (**22**), plumbagina (**23**) e 1,4-naftoquinona (**24**) tem ganhado grande importância devido sua atividade anticâncer (Figura 13).⁹⁻¹⁷

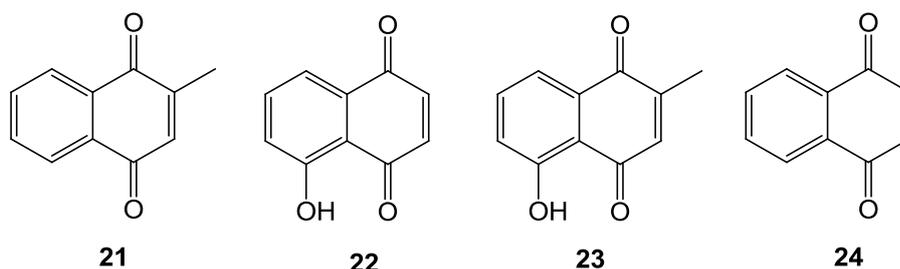


Figura 13. Derivados quinônicos contendo o grupo farmacofórico 1,4-naftoquinônico.

Inúmeros derivados naftoquinônicos contendo variados substituintes nas posições C₂ e C₃ vêm sendo sintetizados a fim de estudar a relação estrutural destas espécies com a atividade antineoplásica. A incorporação de átomos de enxofre, oxigênio e nitrogênio nos carbonos C₂ e C₃ do núcleo 1,4-naftoquinônico têm mostrado resultados promissores quanto a ação citotóxica em células tumorais.^{10,43-46}

A 2,3-dicloro-1,4-naftoquinonas (**25**) (Figura 14) têm sido frequentemente utilizada como substrato de partida para a obtenção de derivados 1,4-naftoquinônicos 2,3-substituídos a partir de reações de substituição nucleofílica com inúmeras espécies nitrogenadas, oxigenadas e sulfuradas. É bem descrito na literatura que a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona reage com nucleófilos de maneira a formar produtos mono e dissubstituídos e mais comumente uma mistura de ambos, dependendo da nucleofilicidade dos nucleófilos empregados.⁴⁷

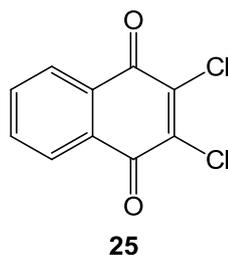


Figura 14. Estrutura química da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona.

Reações entre a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona e nucleófilos contendo grupos doadores de elétrons, como aminas, normalmente substituem apenas um dos átomos de cloro da naftoquinona devido ao aumento da densidade eletrônica no núcleo naftoquinônico. Para que a segunda substituição aconteça, um efeito retirador de elétrons deve ser imposto sobre o anel da naftoquinona ou um catalisador, normalmente contendo paládio, deve ser empregado.^{44,47-55}

As tentativas descritas na literatura para a substituição do segundo átomo de cloro no produto monossustituído são: (i) utilização de espécies mais nucleofílicas na segunda substituição, principalmente aminas, fenóis e compostos sulfurados como em **26** (Figura 15),^{43,44,52,53,56-59} (ii) imposição de um efeito retirador de elétrons sobre o núcleo naftoquinônico, como por exemplo, realizar uma reação de acilação no átomo de nitrogênio do produto monossustituído como em **27**,⁵⁴ (iii) fazer uma nitroação no átomo de nitrogênio, como no composto **28**,⁵⁴ (iv) formar o sal piridínio como em **29** a partir da 2,3-dicloronaftoquinona para em seguida substituir o segundo átomo de cloro,^{60,61} e (v) utilizar substituintes fortemente atratores de elétrons como, por exemplo, grupo nitro que diminuirá a densidade eletrônica no núcleo naftoquinônico, como em **30**.⁵⁴ Wang e colaboradores também relataram uma nova metodologia para realizar a segunda substituição do átomo de cloro nos derivados 3-cloro-1,4-naftoquinônicos contendo substituinte no átomo de carbono C₂ utilizando um complexo PdCl₂(dppf) como catalisador.⁶²

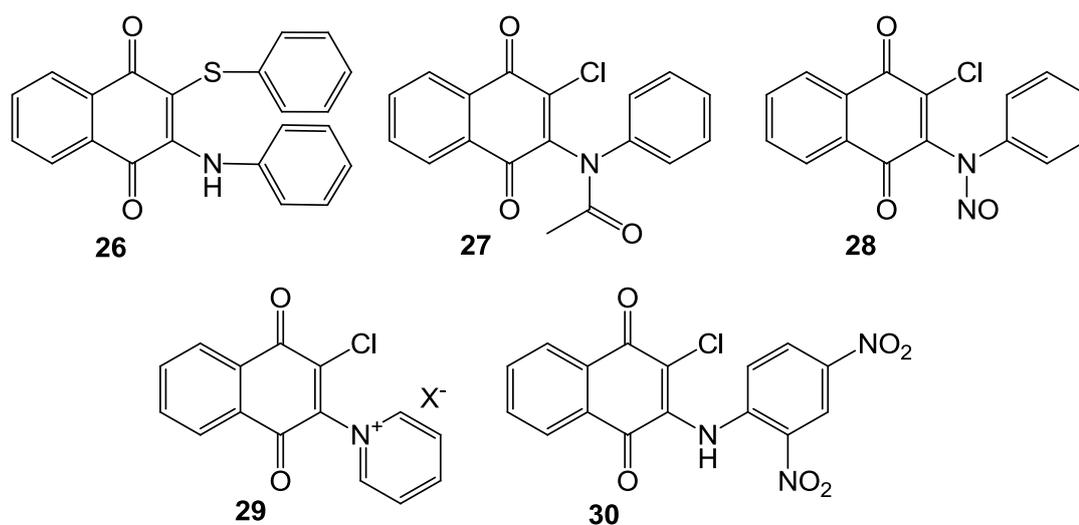


Figura 15. Metodologias para dissustituir a 2,3-dicloronaftoquinona.

Outra classe de derivados 1,4-naftoquinônicos vastamente descrita na literatura, é a série de compostos 2-amino-1,4-naftoquinona. De maneira geral, existem duas metodologias simples e rápidas para a obtenção desse produto: (i) substituição nucleofílica da 2-halogênio-1,4-naftoquinona (**31**) ou da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**) utilizando alquil e arilaminas e (ii) Adição oxidativa da amina à 1,4-naftoquinona (**24**) (Figura16).^{60,63,64}

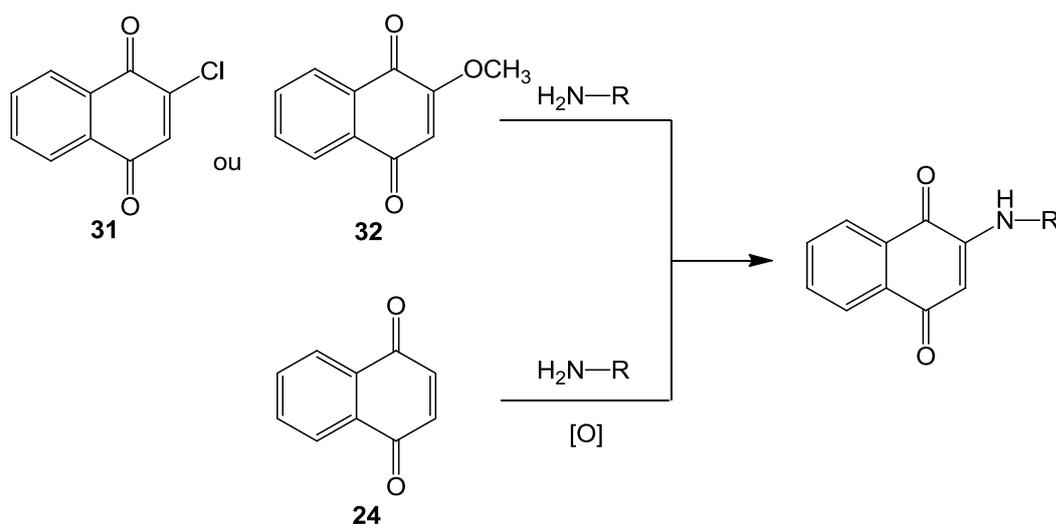


Figura 16. Metodologias para obtenção de compostos 2-amino-1,4-naftoquinônicos.

A 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**) pode ser facilmente preparada através da metilação da 2-hidróxi-1,4-naftoquinona, sob aquecimento, em meio metanólico contendo ácido clorídrico, conforme descrito na literatura.⁶⁵ Esse substrato pode ser

utilizado na síntese de vários derivados 1,4-naftoquinônicos por ter a capacidade de ter o grupo metoxila substituído por um nucleófilo (Figura 17). Ademais, o átomo de carbono C₃ eletrofílico é suscetível à adição oxidativa de Michael.

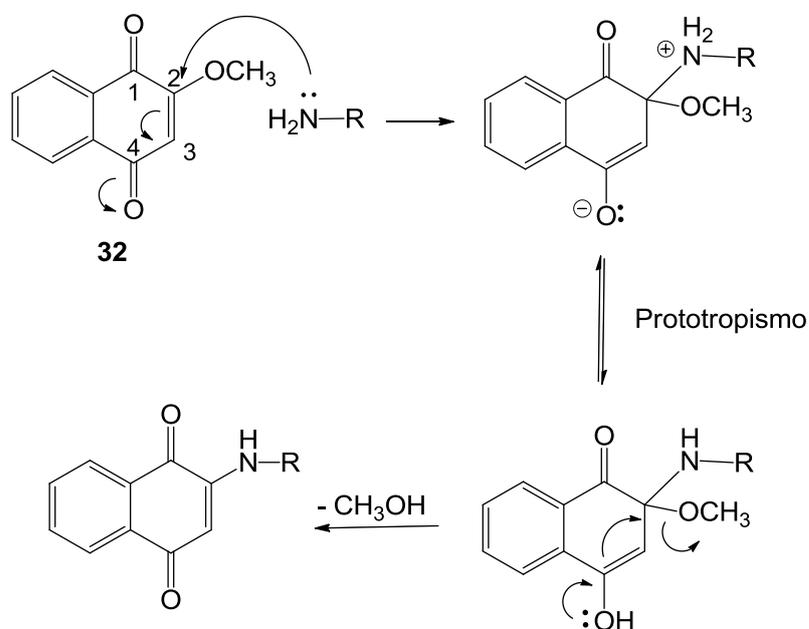


Figura 17. Mecanismo de substituição nucleofílica com a 2-metóxi-1,4-naftoquinona.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver novos derivados 1,4-naftoquinônicos contendo substituintes com átomos de nitrogênio, oxigênio e enxofre nos carbonos C₂ e C₃ do núcleo naftoquinônico a partir da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**), da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**) e da 1,4-naftoquinona (**24**) (Figura 18), a fim de promover uma hibridização molecular entre o núcleo naftoquinônico e a cadeia lateral da Mitoxantrona com potencial atividade antineoplásica que possam atuar por vias celulares múltiplas com a finalidade de se evitar a aquisição de fenótipo resistente à quimioterapia pelas células tumorais.

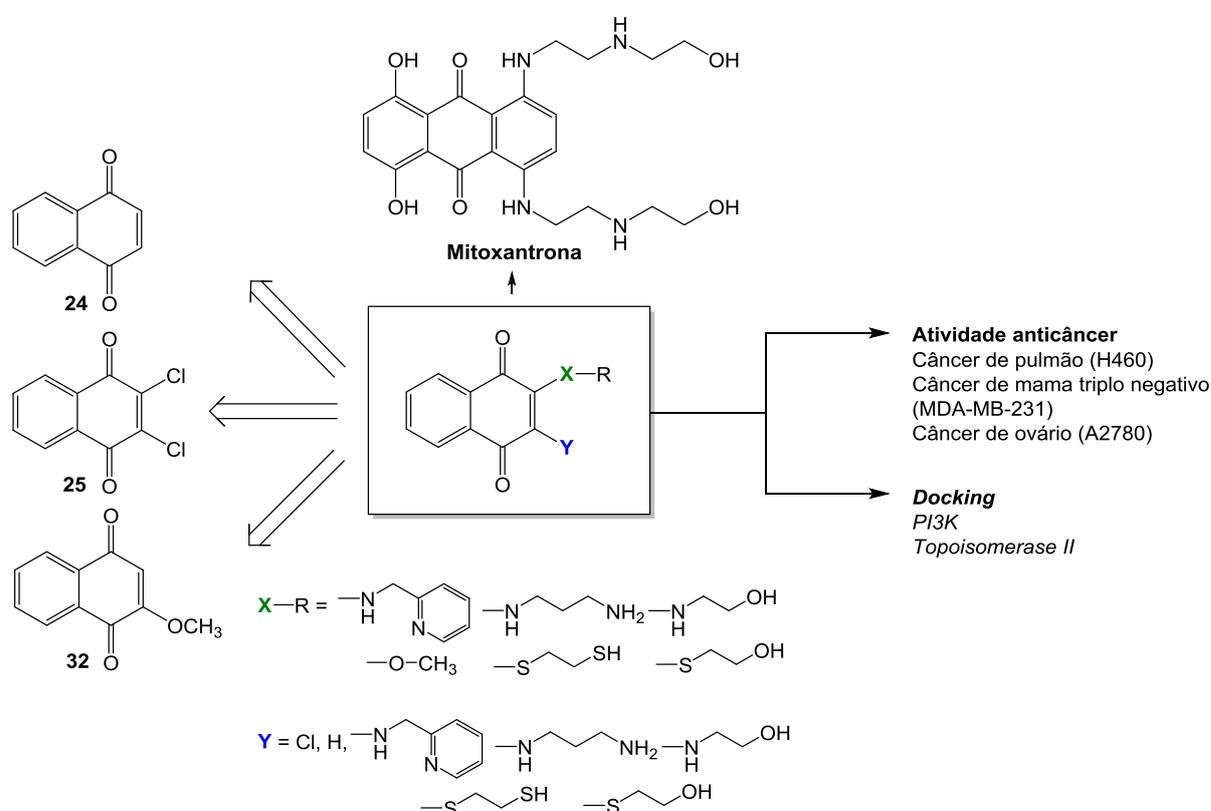


Figura 18. Planejamento do trabalho experimental e dos estudos posteriores.

Outro objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade dos derivados naftoquinônicos nas linhagens de câncer humano de pulmão (H460), mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e ovário (A2780). Uma vez realizado o *screening in vitro* dos compostos sintetizados poder-se-á verificar também a relação estrutura/atividade no que diz respeito aos substituintes das posições C₂ e C₃ do núcleo naftoquinônico.

Os testes de atividade antineoplásica foram realizados no **Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano** do departamento de Ciências Farmacêuticas CCS/UFES em parceria com a Prof^a. Dr^a. Leticia Batista Azevedo Rangel.

Por fim, estudos de *docking* (ancoragem molecular) entre os compostos mais ativos determinados através do *screening in vitro* e os alvos da terapêutica antineoplásica *PI3K* e *topoisomerase II* foram realizados com o objetivo de determinar prováveis mecanismos de ação dos derivados naftoquinônicos sintetizados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Foram utilizados nesse trabalho os reagentes e os substratos 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona 98% (Aldrich), 2-hidroxi-1,4-naftoquinona 97% (Sigma-Aldrich), 1,4-naftoquinona, picolilamina 99% (Aldrich), 1,3-diaminopropano 99% (Aldrich), 1,2-etanoditiol 98% (Sigma-Aldrich), 2-mercaptoetanol 99% (Vetec), 2-aminoetanol 99% (Vetec) e trietilamina 99% (Vetec) .

Como solvente foram utilizados água destilada, metanol P.A. 99.9% (Vetec), acetona P.A. 99.5% (Vetec), hexano P.A. 98.5% (Vetec) e acetato de etila P.A. 99.5% (Vetec) sem qualquer tratamento prévio.

3.2 Métodos

3.2.1 Cromatografia

As análises de cromatografia em camada fina foram realizadas utilizando cromatofolhas de alumínio recobertas com sílica gel UV254 (250 μm , 20x20 cm). As amostras foram diluídas em diclorometano e sua revelação foi efetuada por exposição à luz ultravioleta (250 e 300 nm).

O eluente utilizado na análise cromatográfica foi preparado misturando-se uma proporção em volume 1:1 e 4:1 dos solventes acetato de etila e hexano, sem qualquer tratamento prévio.

3.2.2 Ponto de fusão

A determinação do ponto de fusão sem correção das substâncias sintetizadas foi realizada utilizando o equipamento digital Fisatom 430D.

3.2.3 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho dos compostos **25a**, **25b**, **25e**, **25f** e **32a** foram obtidos utilizando o espectrômetro modelo FTLA2000-102-ABB do fabricante ABB Bomem com acessório de janela de KBr de 32mm de largura e 3mm de espessura. Todas as medidas foram efetuadas no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com médias de 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

Os espectros de infravermelho dos compostos **32**, **25c**, **25d**, **25g**, **32b** e **32c** foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer, modelo Spectrum 400. A aquisição dos espectros de MIR ocorreu através de uma célula horizontal de ATR constituída de ZnSe 45° fabricado pela Pike Technologies. Foram coletados 16 scans em cada amostra com resolução de 4 cm⁻¹.

3.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (¹H) e de carbono (¹³C) foram obtidos utilizando o espectrômetro *Varian 400 MHz* e sonda de 5 mm *Broadband 1H/X/D*. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em ppm em relação ao padrão interno. Foi utilizado CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno.

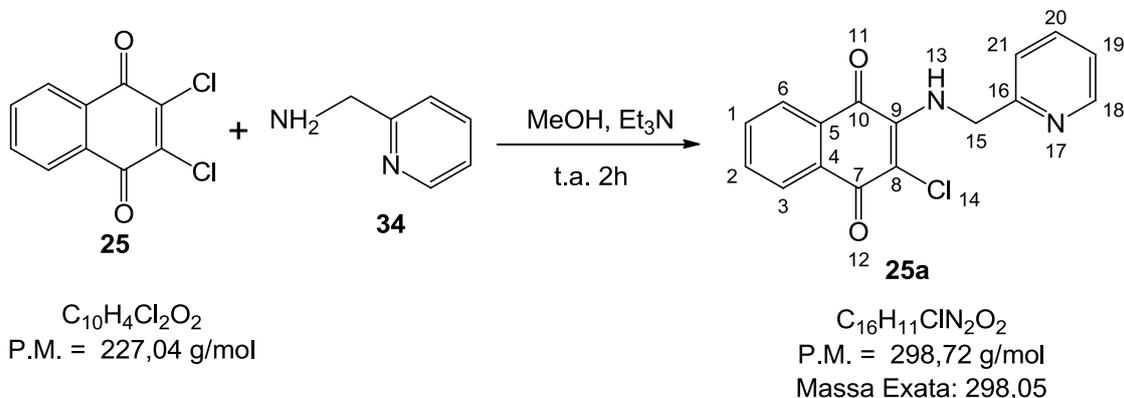
Em todos os espectros de RMN de ¹H, observou-se um sinal de uma impureza em $\delta = 1,55-1,70$ ppm (s), a qual foi atribuída à presença de água no solvente utilizado para a análise, tal como descrito por Gottlieb e colaboradores.⁶⁶ Além disso, dois outros sinais de impureza foram observados nos espectros de RMN de ¹H dos compostos **25b**, **25c**, **32c** e **44**, $\delta = 1,26$ ppm (s), 0,86 ppm (m), de acordo com a mesma referência, atribuídos a contaminação por graxa provavelmente da linha de alto vácuo durante a secagem das amostras

3.2.5 Espectrometria de Massas

Os espectros de Massa foram obtidos no espectrômetro de alta resolução (modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), operado em modos de ionização positivo e negativo com eletrospray ionizante, ESI(+) and ESI(-)-FT-ICR (MS). A aquisição dos espectros de FT-ICR MS foi realizada com poder de resolução de $m/\Delta m_{50\%} \approx 500000$, onde $\Delta m_{50\%}$ é o pico inteiro com m/z 400 sendo metade da altura máxima e acurácia de massa < 1 ppm.

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Preparação do 2-cloro-3-[(piridin-2-ilmetil)amino]naftoquinona (**25a**)



Uma suspensão da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) (0,2270 g, 1,0 mmol) em metanol (10 mL) com picolilamina (**34**) 155 μ L (1,5 mmol) e trietilamina (153 μ L, 1,1 mmol) foi agitada por 2 h à temperatura ambiente. O precipitado obtido foi filtrado e lavado com metanol gelado para obter o produto (**25a**) como um sólido de coloração laranja (0,2624 g, 88%) e p.f. = 156-157 °C.

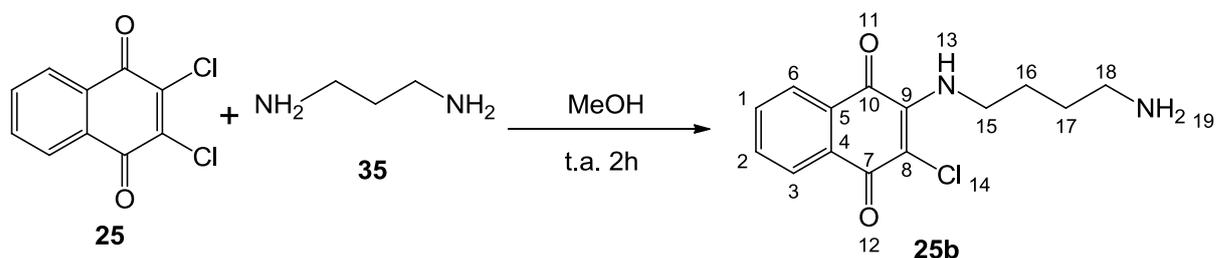
I.V. ν_{max} (cm^{-1} , pastilha de KBr): 3253 (ν N-H), 3067 (ν C-H), 1683 (ν C=O), 1605 (ν C=C), 1566 (δ N-H), 1295 (ν C-N), 719 (ν C-Cl).

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 8,65 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, H_{18}), 8,15 (dd, $J = 7,7, 1,3$ Hz, 1H, H_6), 8,06 (dd, $J = 7,6, 1,4$ Hz, 1H, H_3), 7,82 (s, 1H, H_{13}), 7,75 – 7,69 (m, 2H, H_1 e H_2), 7,63 (td, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H, H_{20}), 7,29 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H_{21}), 7,30 – 7,22 (m, 1H, H_{19}), 5,19 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H, H_{15}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 180,57 (C_7), 176,78 (C_{10}), 155,10 (C_{16}), 149,04 (C_{18}), 144,39 (C_9), 136,87 (C_{20}), 134,77 (C_1), 132,65 (C_2), 132,40 (C_4, C_5), 129,96 (C_3), 126,77 (C_6), 126,71 (C_{21}), 122,66 (C_{19}), 121,72 (C_8), 48,60 (C_{15}).

FTMS ESI(+)-FT-ICR MS [$C_{16}H_{11}ClN_2O_2 + H$] $^+$ com $m/z = 299,05827$, erro = - 0,29 ppm e DBE = 12.

3.3.2 Preparação do 2-[(3-aminopropil)amino]-3-cloronaftoquinona (**25b**)



$C_{10}H_4Cl_2O_2$
P.M. = 227,04 g/mol

$C_{14}H_{15}ClN_2O_2$
P.M. = 278,73 g/mol
Massa exata: 278,08

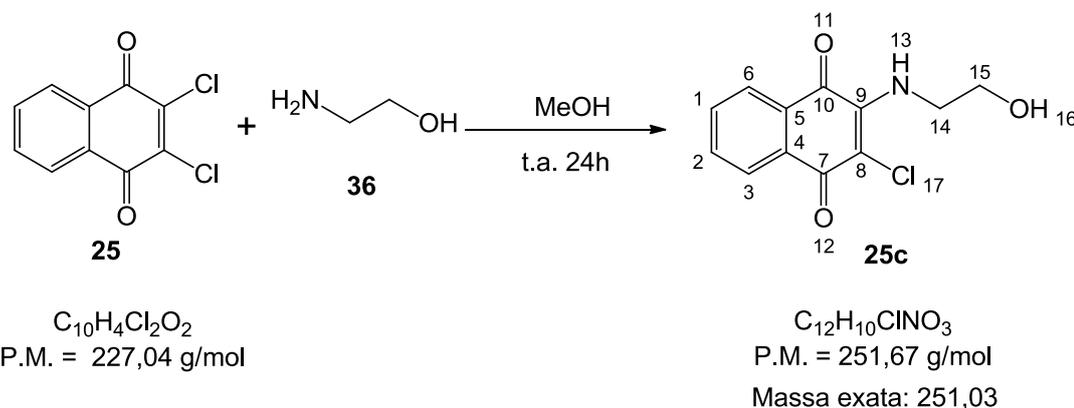
Uma suspensão da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) (0,2270 g, 1,0 mmol) em metanol (10 mL) com 1,3-diaminopropano (**35**) (167 μ L, 2 mmol) foi agitada por 7 h à temperatura ambiente. O precipitado obtido foi filtrado e lavado com metanol gelado para obter o produto (**25b**) como um sólido de coloração laranja avermelhado (0,2356 g, 89%) e p.f. = 215 °C (com decomposição).

I.V. ν_{max} (cm^{-1} , pastilha de KBr): 3270 (ν N-H), 1676 (ν C=O), 1602 (ν C=C), 1573 (δ N-H), 1293 (ν C-N), 720 (ν C-Cl) .

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 8,14 (dd, $J = 7,6, 1,0$ Hz, 1H, H_6), 8,02 (dd, $J = 7,7, 1,0$ Hz, 1H, H_3), 7,73 (td, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H, H_2), 7,63 (td, $J = 7,5, 1,2$ Hz, 1H, H_1), 6,13 (bs, 1H, H_{13}), 4,00 (dd, $J = 13,5, 6,8$ Hz, 2H, H_{16a} e H_{16b}), 3,72 (dd, $J = 14,0, 7,0$ Hz, 1H, H_{14a}), 2,91 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, H_{14b}), 2,12 (dt, $J = 13,9, 7,1$ Hz, 1H, H_{15a}), 1,83 (dt, $J = 12,9, 6,6$ Hz, 1H, H_{15b}).

FTMS ESI(+)FT-ICR MS [$C_{13}H_{13}ClN_2O_2 + H$] $^+$ com $m/z = 265,07387$, erro = - 0,14 ppm e DBE = 8.

3.3.3 Preparação do 2-cloro-3-((2-hidroxiethyl)amino)naftalen-1,4-diona (**25c**)



Uma suspensão da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) (0,2270 g, 1,0 mmol) em metanol (10 mL) com 2-aminoetanol (**36**) (121 μ L, 2,0 mmol) foi agitada por 24 h à temperatura ambiente. O precipitado obtido foi filtrado e lavado com água gelada para obter o produto (**35**) de coloração laranja (0,2240 g, 89%) e p.f. = 139-140 °C.

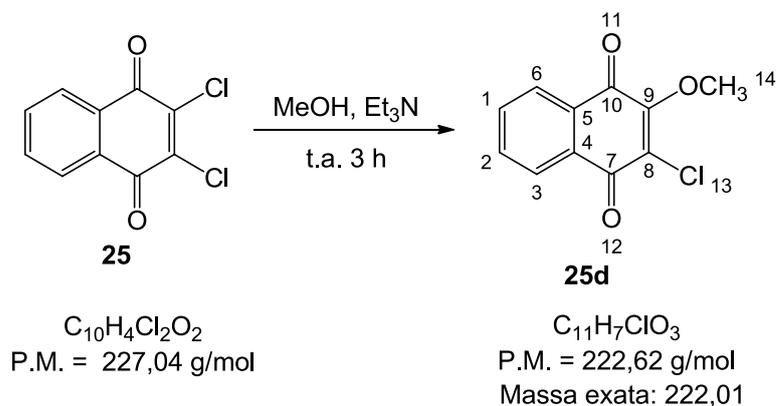
I.V. ν_{max} (cm^{-1} , ATR): 3470 (ν O-H), 3301 (ν N-H), 3067 (ν C-H), 3035 (ν C-H), 2905 (ν C-H), 2881 (ν C-H), 1682 (ν C=O), 1601 (ν C=C), 1565 (δ N-H), 1297 (ν C-N), 1073 (ν C-OH) 724 (ν C-Cl).

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 8,14 (dd, $J = 7,7, 0,9$ Hz, 1H, H_6), 8,03 (dd, $J = 7,7, 1,0$ Hz, 1H, H_3), 7,73 (td, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H, H_1), 7,63 (td, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H, H_2), 6,42 (s, 1H, H_{13}), 4,06 (dt, $J = 10,7, 5,3$ Hz, 1H, H_{15}), 3,93 (dd, $J = 10,1, 5,0$ Hz, 1H, H_{14}), 1,81 (t, $J = 4,7$ Hz, 1H, H_{16}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 180,42 (C_7), 176,86 (C_{10}), 144,42 (C_9), 134,92 (C_1), 132,58 (C_2), 132,51 (C_4 e C_5), 129,81 (C_8), 126,84 (C_3), 126,82 (C_6), 61,97 (C_{15}), 46,57 (C_{16}).

FTMS ESI(+)-FT-ICR MS [$C_{12}H_{10}ClNO_3 + H$] $^+$ com $m/z = 252,0419$, erro = 1,23 ppm; [$C_{12}H_{10}ClNO_3 + Na$] $^+$ com $m/z = 274,0238$, erro = 1,30 ppm, e DBE = 8.

3.3.4 Preparação do 2-cloro-3-((2-hidroxietil)amino)naftalen-1,4-diona (**25d**)



Uma suspensão da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) (0,2270 g, 1,0 mmol) em metanol (10 mL) com trietilamina (153 μL , 1,1 mmol) foi agitada por 3 h à temperatura ambiente. O precipitado obtido foi filtrado e lavado com água gelada para obter o produto (**25d**) de coloração amarela (0,1794 g, 81%) e p.f. = 144-147 °C.

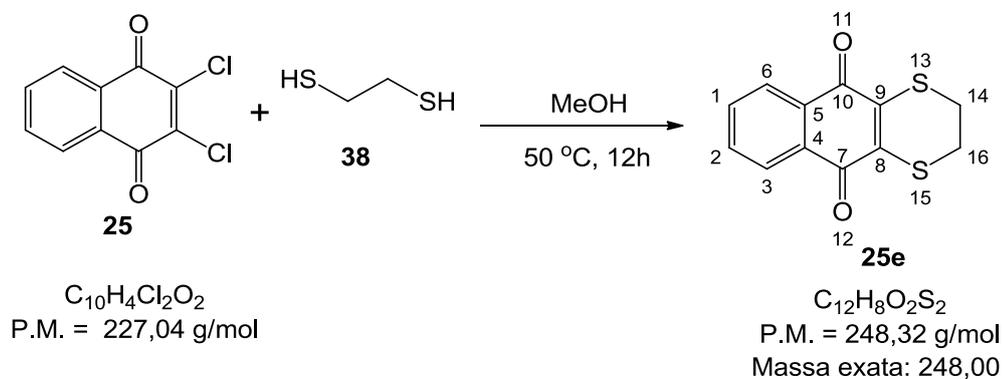
I.V. ν_{max} (cm^{-1} , ATR): 3325 (ν C-H), 3083 (ν C-H), 3027 (ν C-H), 2960 (ν C-H), 2855 (ν C-H), 1674 (ν C=O), 1590 (ν C=C), 1255 ($\nu_{\text{assim.}}$ C-O-C), 1045 ($\nu_{\text{sim.}}$ C-O-C), 716 (ν C-Cl).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,17 – 8,12 (m, 1H, H_6), 8,11 – 8,07 (m, 1H, H_3), 7,79 – 7,72 (m, 2H, H_1 e H_2), 4,32 (s, 3H, H_{14}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 179,68 (C_{10}), 178,59 (C_7), 156,76 (C_9), 134,35 (C_1), 133,92 (C_2), 131,03 (C_5), 130,78 (C_4), 128,29 (C_8), 126,97 (C_6), 126,86 (C_3), 61,87 (C_{14}).

FTMS ESI(+)-FT-ICR MS [$\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClO}_3 + \text{Na}$] $^+$ com $m/z = 244,9972$, erro = 1,49 ppm e DBE = 8.

3.3.6 Preparação do 2,3-dihidronafto[2,3-b][1,4]ditiino-5,10-diona (**25e**)



Uma suspensão de 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) (0,2270 g, 1,0 mmol) em metanol (10 mL) com 1,2-etanoditiol (**38**) (149 μL , 2,0 mmol) foi agitada por 12 h à 50 °C. Deixou-se a solução esfriar e o produto obtido foi filtrado e lavado com metanol gelado para obter o produto (**25e**) como um sólido de coloração vermelho escuro (0,1522 g, 62%) e p.f. > 230 °C.

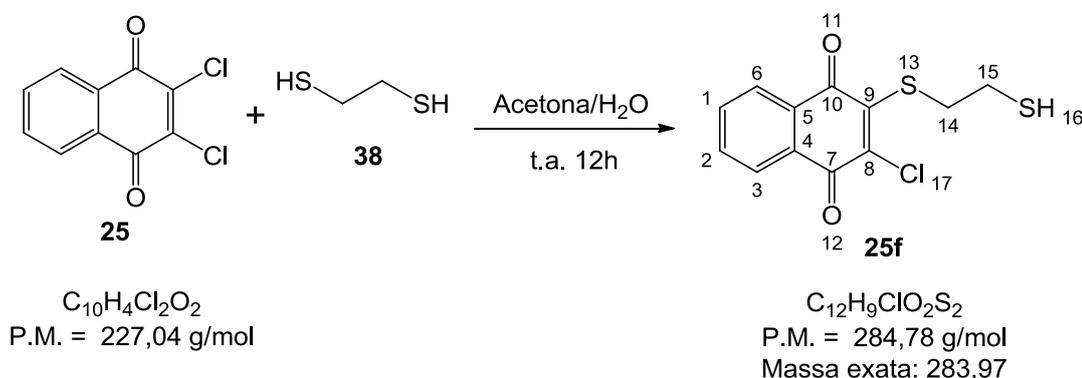
I.V. ν_{max} (cm^{-1} , pastilha de KBr): 2911 (ν C-H), 1641 (ν C=O), 1587 (ν C=C), 694 (ν C-S).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,07 (dd, $J = 5,7, 3,3$ Hz, 2H, H_6 e H_3), 7,69 (dd, $J = 5,7, 3,3$ Hz, 2H, H_1 e H_2), 3,30 (s, 4H, H_{14} e H_{16}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 178,60 (C_7 e C_{10}), 140,74 (C_8 e C_9), 133,74 (C_1 e C_2), 131,56 (C_4 e C_5), 126,90 (C_3 e C_6), 26,99 (C_{14} e C_{16}).

FTMS ESI(+)-FT-ICR MS [$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2 + \text{H}$] $^+$ com $m/z = 249,0037$, erro = 0,23 ppm; [$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2 + \text{Na}$] $^+$ com $m/z = 270,9856$, erro = 0,16 ppm; [$2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2) + \text{Na}$] $^+$ com $m/z = 518,9824$, erro = -0,06 ppm; e DBE = 9.

3.3.5 Preparação do 2-cloro-3-[(mercaptometil)tio]naftoquinona (**25f**)



Uma suspensão da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) (0,2270 g, 1,0 mmol) em acetona (5 mL) com 1,2-etanoditiol (**38**) (210 μL , 2,5 mmol) foi agitada por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se água (15 mL) lentamente e agitou-se por 12h. O precipitado obtido foi filtrado e lavado com água gelada para obter o produto (**25f**) como um sólido de coloração roxa (0,2164 g, 66%) e p.f. = 125 °C (com decomposição.).

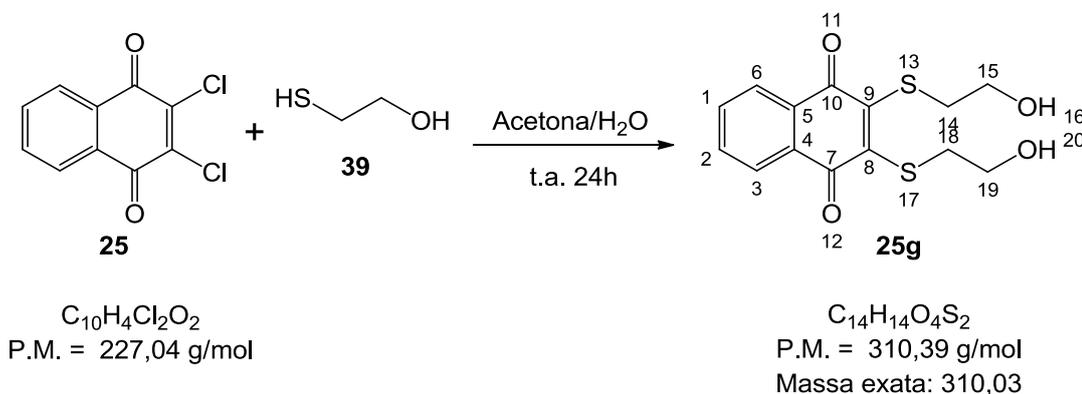
I.V. ν_{max} (cm^{-1} , pastilha de KBr): 3069 (ν C-H), 3028 (ν C-H), 2989 (ν C-H), 2928 (ν C-H), 1699 (ν C=O), 1646 (ν C=C conjugado), 1588 (ν C=C), 807 (ν C-Cl), 666 (ν C-S).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,22 – 8,17 (m, 2H, H_6 e H_3), 8,15 – 8,10 (m, 2H, H_1 e H_2), 3,59 – 3,42 (m, 4H, H_{14} e H_{15}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 186,55 (C_{10}), 186,44 (C_7), 135,08 (C_9), 134,81 (C_4 e C_5), 133,55 (C_1 e C_2), 131,17 (C_8), 128,44 (C_3), 128,42 (C_6), 42,40 (C_{15}), 39,84 (C_{14}).

FTMS ESI(+)-FT-ICR MS [$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClO}_2\text{S}_2 + \text{H}$] $^+$ com $m/z = 284,9804$, erro = 0,30 ppm e DBE = 8.

3.3.7 Preparação do 2,3-bis[(2-hidroxiethyl)tio]naftoquinona (**25g**)



Uma suspensão da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) (0,2270 g, 1,0 mmol) em acetona (5 mL) com 2-mercaptoetanol (**39**) (210 μL , 2,0 mmol) foi agitada por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se água (10 mL) lentamente e agitou-se por 24h. O precipitado obtido foi filtrado e lavado com água gelada para obter o produto (**25g**) de coloração laranja (0,1614 g, 52%) e p.f. = 111-113 °C.

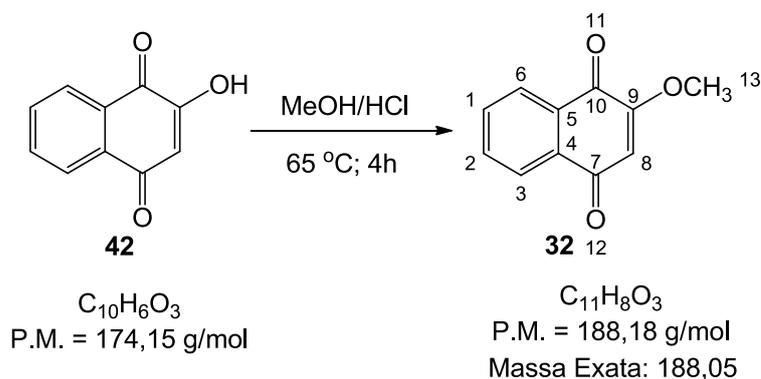
I.V. ν_{max} (cm^{-1} , pastilha de KBr): 3278 (ν O-H), 1654 (ν C=O), 1588 (ν C=C), 1137 (ν C-OH), 699 (ν C-S).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,07 (dd, $J = 5,7, 3,3$ Hz, 2H, H_6 e H_3), 7,72 (dd, $J = 5,7, 3,3$ Hz, 2H, H_1 e H_2), 3,79 (q, $J = 4,9$ Hz, 4H, H_{15} e H_{19}), 3,47 – 3,37 (m, 4H, H_{14} e H_{18}), 2,71 (s, 2H, H_{16} e H_{20}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 178,88 (C_7 e C_{10}), 148,99 (C_8 e C_9), 133,81 (C_1 e C_2), 132,85 (C_4 e C_5), 127,18 (C_3 e C_6), 61,94 (C_{15} e C_{19}), 38,20 (C_{14} e C_{18}).

FTMS ESI(+)-FT-ICR MS [$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}_2 + \text{H}$] $^+$ com $m/z = 309,0260$, erro = 0,30 ppm e DBE = 8.

3.3.8 Preparação do 2-metoxinaftaleno-1,4-diona (**32**)

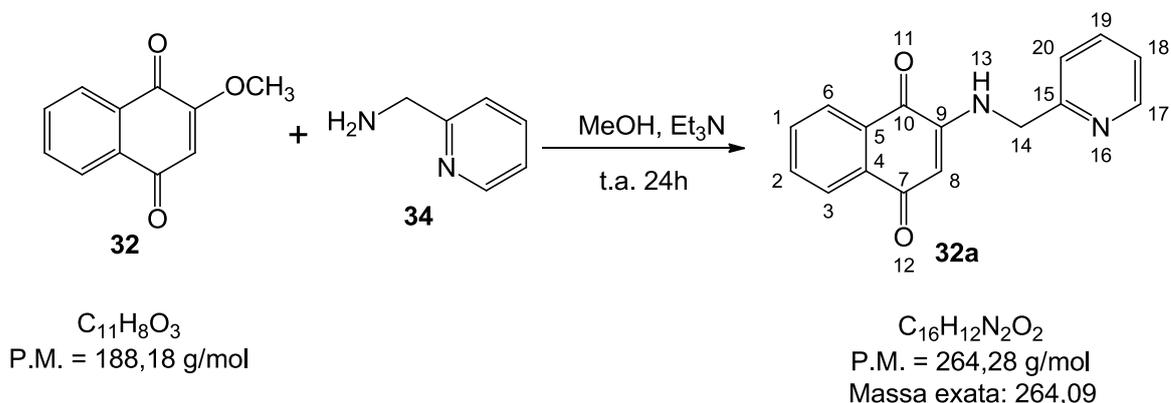


Em um balão de 100 mL foi dissolvido a 2-hidroxi-1,4naftoquinona (**42**) (1,000 g, 5,7 mmol) em metanol absoluto (50 mL) com ácido clorídrico concentrado (0,8 mL). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 4h. Em seguida, deixou-se atingir a temperatura ambiente e o produto (**32**) foi filtrado, recristalizado em água quente para obter um sólido amarelo claro (0,7937g, 73%) e p.f. = 179-180 °C.

I.V. ν_{max} (cm^{-1} , pastilha de KBr): 3049 (ν C-H), 2991 (ν C-H), 2852 (ν C-H), 1682 (ν C=O), 1648 (ν C=C conjugado), 1605 (ν C=C), 1244 ($\nu_{\text{assim.}}$ C-O-C).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,19 – 8,04 (m, 2H, H_6 e H_3), 7,81 – 7,68 (m, 2H, H_1 e H_2), 6,19 (s, 1H, H_8) 3,92 (s, 3H, H_{13}).

3.3.9 Preparação do 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]naftoquinona (**32a**)



Uma suspensão da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**) (0,0941 g, 0,5 mmol) em metanol (10 mL) com picolilamina (**34**) (180 μ L, 2,0 mmol) e trietilamina (84 μ L, 0,6 mmol) foi agitada por 24 h à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se água (20 mL) e o precipitado formado foi filtrado e lavado com metanol gelado para obter o produto (**32a**) de coloração laranja (0,0766 g, 58%) e p.f. = 146-148 °C.

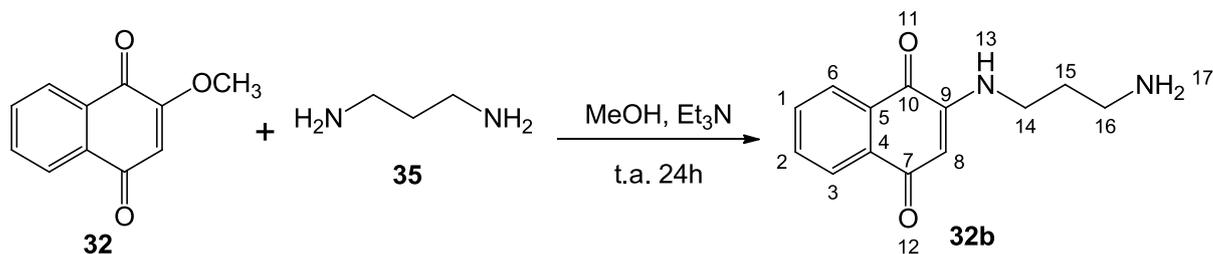
I.V. ν_{max} (cm^{-1} , pastilha de KBr): 3067 (ν C-H), 3061 (ν C-H), 3049 (ν C-H), 1677 (ν C=O), 1607 (ν C=C conjugado), 1593 (ν C=C), 1569 (δ , N-H), 1264 (ν C-N).

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 8,63 (dd, $J = 4,9, 0,7$ Hz, 1H, H_{17}), 8,12 – 8,07 (m, 2H, H_6 e H_3), 7,78 – 7,66 (m, 2H, H_1 e H_2), 7,63 (td, $J = 7,5, 1,2$ Hz, 1H, H_{19}), 7,29 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H_{20}), 7,29 – 7,22 (m, 1H, H_{18}), 7,16 (s, 1H, H_{13}), 5,78 (s, 1H, H_8), 4,49 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H, H_{14a} e H_{14b}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 183,08 (C_7), 181,70 (C_{10}), 154,51 (C_{15}), 149,49 (C_{17}), 147,76 (C_9), 136,91 (C_1), 134,67 (C_2), 133,57 (C_4), 132,04 (C_{19}), 130,60 (C_5), 126,31 (C_6), 126,17 (C_3), 122,81 (C_{18}), 121,67 (C_{12}), 101,74 (C_{20}), 47,03 (C_{14}).

FTMS ESI(+)/FT-ICR MS [$C_{16}H_{12}N_2O_2 + H$] $^+$ com $m/z = 265,0971$, erro = 0.29 ppm e DBE = 12.

3.3.10 Preparação do 2-[(3-aminopropil)amino]naftoquinona (**32b**)



$C_{11}H_8O_3$
P.M. = 188,18 g/mol

$C_{13}H_{14}N_2O_2$
P.M. = 230,26 g/mol
Massa exata: 230,11

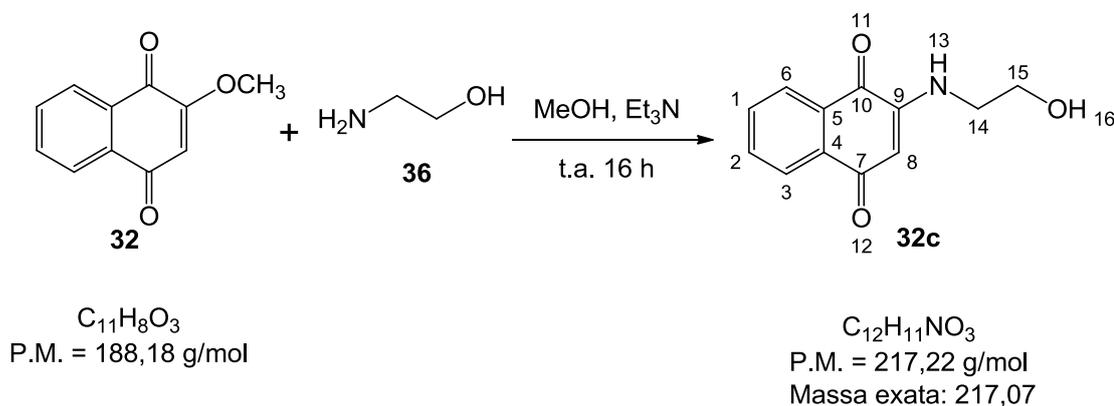
Uma suspensão da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**) (0,0941 g, 0,5 mmol) em metanol (10 mL) com 1,3-diaminopropano (**35**) (83 μ L, 1 mmol) e trietilamina (84 μ L, 0,6 mmol) foi agitada por 24 h à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se água (20 mL) e o precipitado foi filtrado e lavado com metanol gelado para obter o produto (**32b**) como um sólido de coloração laranja (0,0921 g, 80%) e p.f. = 124-126 °C.

I.V. ν_{max} (cm^{-1} , ATR): 3392 (ν N-H), 3353 (ν N-H), 1672 (ν C=O), 1632 (ν C=C conjugado), 1596 (ν C=C), 1569 (δ N-H), 1242 (ν C-N).

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 8,10 (dd, $J = 7,7, 1,2$ Hz, 1H, H_6), 8,05 (dd, $J = 7,7, 1,2$ Hz, 1H, H_3), 7,74 (td, $J = 7,6, 1,4$ Hz, 1H, H_2), 7,63 (td, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H, H_1), 5,91 (s, 1H, H_{13}), 5,76 (s, 1H, H_8), 3,35 (dd, $J = 6,6$ Hz, 2H, H_{16a} e H_{16b}), 2,11 (dt, $J = 6,9$ Hz, 2H, H_{14a} e H_{14b}), 1,25 (s, 2H, H_{15a} e H_{15b}).

FTMS ESI(+)/FT-ICR MS [$C_{13}H_{14}N_2O_2 + H$]⁺ com $m/z = 231,1126$, erro = 0,44 ppm e DBE = 8.

3.3.11 Preparação do 2-((2-hidroxi)etil)amino)naftalen-1,4-diona (32c)



Uma suspensão da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**) (0,1881 g, 1,0 mmol) em metanol (10 mL) com 2-aminoetanol (**36**) (121 μL , 2,0 mmol) e trietilamina (153 μL , 1,1 mmol) foi agitada por 16 h à temperatura ambiente. A solução foi resfriada, o produto foi filtrado e lavado com metanol gelado para obter o produto (**32c**) como um sólido de coloração laranja (0,1803 g, 83%) e p.f. = 156-157 °C.

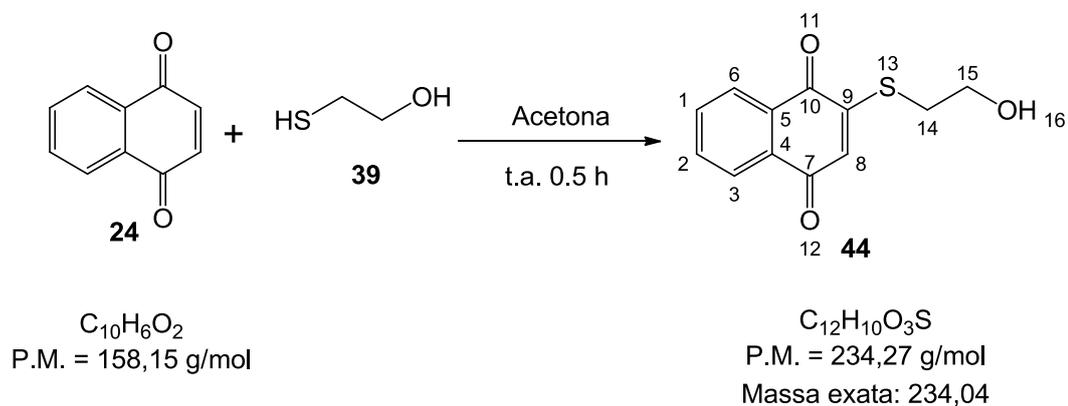
I.V. ν_{max} (cm^{-1} , ATR): 3338 (ν N-H), 3058 (ν C-H), 2935 (ν C-H), 2913 (ν C-H), 1673 (ν C=O), 1590 (ν C=C), 1551 (δ N-H), 1218 (ν C-N), 1071 (ν C-OH).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,10 (dd, $J = 7,7, 1,2$ Hz, 1H, H_6), 8,05 (dd, $J = 7,7, 1,2$ Hz, 1H, H_3), 7,73 (td, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H, H_2), 7,62 (td, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H, H_1), 6,22 (s, 1H, H_{13}), 5,77 (s, 1H, H_8), 3,93 (dd, $J = 10,2, 5,0$ Hz, 2H, H_{15a} e H_{15b}), 3,37 (dd, $J = 10,8, 5,5$ Hz, 2H, H_{14a} e H_{14b}), 1,79 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H, H_{16}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 183,10 (C_7), 181,73 (C_{10}), 148,09 (C_9), 134,77 (C_1), 133,52 (C_2), 132,06 (C_4), 130,50 (C_5), 126,33 (C_6), 126,19 (C_3), 101,16 (C_8), 60,05 (C_{15}), 44,39 (C_{14}).

FTMS ESI(+)-FT-ICR MS [$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3 + \text{Na}$] $^+$ com $m/z = 240,0628$, erro = 1,45 ppm; [$2(\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3) + \text{Na}$] $^+$ com $m/z = 457,1364$, erro = 1,24 ppm e DBE = 8.

3.3.12 Preparação do 2-((2-hidroxiethyl)tio)naftalen-1,4-diona (**44**)



Uma solução da 1,4-naftoquinona (**24**) (0,0941 g, 0,5 mmol) em acetona (2,5 mL) com 2-mercaptoetanol (**39**) (70 μL , 1,0 mmol) foi agitada por 0,5 h à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi aplicada diretamente em uma coluna cromatográfica de sílica gel que foi eluída inicialmente com uma solução de hexano e acetato de etila 15% passando em seguida para 25%. O produto (**24a**) foi obtido como um sólido de coloração amarela. (0,0449 g, 77%) e p.f. = 124-127 °C.

I.V. ν_{max} (cm^{-1} , ATR): 3323 (ν O-H), 2923 (ν C-H), 2852 (ν C-H), 1666 (ν C=O), 1650 (ν C=C conjugado), 1588 (ν C=C), 1121 (ν C-OH), 666 (ν C-S).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,14 – 8,04 (m, 2H, H_3 e H_6), 7,79 – 7,66 (m, 2H, H_1 e H_2), 6,71 (s, 1H, H_8), 3,98 (dd, $J = 10,7, 5,4$ Hz, 2H, H_{15}), 3,10 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, H_{14}), 2,06 (s, 1H, H_{16}).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 182,04 (C_7), 181,59 (C_{10}), 154,21 (C_9), 134,42 (C_1), 133,40 (C_2), 132,09 (C_6), 131,84 (C_3), 127,44 (C_8), 126,92 (C_4), 126,59 (C_5), 59,73 (C_{15}), 33,26 (C_{14}).

FTMS ESI(+)FT-ICR MS [$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3\text{S} + \text{Na}$] $^+$ com $m/z = 257,0244$, erro = -0,28 ppm; [$2(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3\text{S}) + \text{Na}$] $^+$ com $m/z = 491,0596$, erro = -0,57 ppm; e DBE = 8.

3.3.13 Avaliação da Atividade Antineoplásica In Vitro

As linhagens celulares de câncer humano de pulmão (H460), mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e ovário (A2780), foram cultivadas em garrafas de 75 cm², com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução estabilizada de Penicilina-Estreptomicina (10000 unidades de Penicilina e 10 mg de Estreptomicina por mL) e 0,5% de Fungizone - Anfotericina B a 250 µg/mL; em estufa umedecida a 37°C e com atmosfera de 5% de CO₂ até a subconfluência. Para a realização dos tratamentos, ajustou-se à concentração de células desejada (10e5 células/mL). Assim que se obteve o estágio de subconfluência, as células passaram por um período de incubação de 24 horas, e então as placas foram lavadas com tampão PBS 1X. Avaliou-se a proliferação celular frente ao tratamento com os ligantes naftoquinônicos, além dos quimioterápicos cisplatina, etoposídeo e vimblastina. Cada experimento foi realizado em quádruplicata. Após as 24 horas de incubação com os compostos listados, o meio foi removido e 15 µL de MTT (5 mg/mL) adicionados em cada poço. A incubação com MTT deu-se por 4 horas e, em seguida, adicionou-se 70 µL de SDS 10% p/v para dissolução dos cristais de formazan formados. A leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro (MR-96 A, Bioclin, Minas Gerais, Brasil) no comprimento de onda de 600 nm. A determinação dos valores da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC50) foi efetuada a partir da curva dose resposta feita para cada substância.

3.3.14 Docking

A ancoragem dos ligantes foi realizada no software Autodock Vina com as proteínas *PI3K* e *topoisomerase II* obtidas no Protein Data Bank (PDB) sob os códigos 1E7U e 1QZR, respectivamente. As estruturas 3D das substâncias foram obtidas no software Gaussian03 após otimização com o método semi-empírico PM3. Inicialmente o ligante da *PI3K*, Wortmannin, e da *topoisomerase II*, Dexrazoxana, e as respectivas proteínas foram preparados conforme descrito na literatura.⁶⁷ Em seguida, uma caixa (grid box) com dimensões 18x10x12 Å e coordenadas, x = 23.426, y = 62.986 e z = 20.716, para *PI3K*, e x = 28.166, y = 33.408 e z = 32.263, para *topoisomerase II*, centradas nos respectivos ligantes, foi criada para cobrir o sítio ativo das enzimas. Assim, os ligantes cristalográficos de cada enzima foram redocados nos respectivos receptores, a fim de validar a eficiência dos cálculos de

docking.

Na sequência, após otimização de todas as estruturas dos compostos sintetizados, dos fármacos controle e da validação da metodologia estudos de *docking* foram realizados com as proteínas-alvos, obtendo como resultado das superposições dos ligantes nos sítios ativos as energias de interação ligante/receptor.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reação de substituição nucleofílica com a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona

Conforme descrito anteriormente, a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) é bastante utilizada para a obtenção de derivados 2,3-substituídos por ser suscetível à reações de substituição nucleofílica com inúmeras espécies nucleofílicas. O mecanismo de substituição proposto inicia com a adição do nucleófilo ao carbono C₂ e/ou C₃, ambos ligeiramente eletrofílicos, para formar o oxiânion (**33**) como intermediário (Figura 19). Posteriormente ocorre a eliminação do átomo de cloro, o grupo de saída, para regenerar a carbonila α,β -insaturada termodinamicamente mais estável. Normalmente a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona reage com nucleófilos para formar uma mistura de produtos mono e dissustituídos dependendo da nucleofilicidade dos nucleófilos empregados.⁴⁷

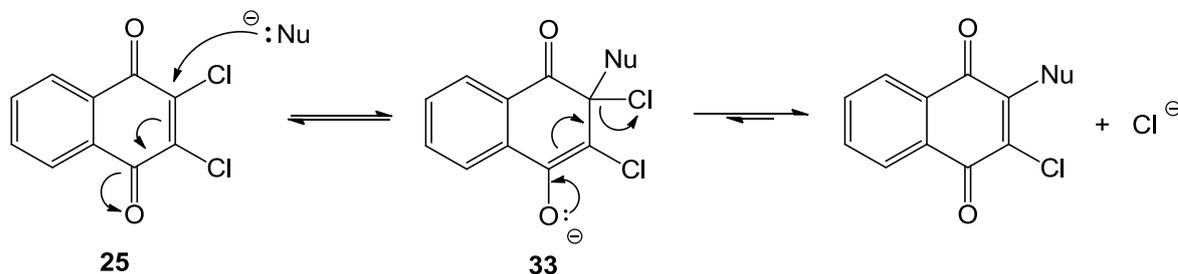


Figura 19. Mecanismo da reação de substituição nucleofílica na 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona.

A introdução de grupos doadores de elétrons, como por exemplo, aminas, normalmente substituem apenas um dos átomos de cloro da naftoquinona, pois o aumento da densidade eletrônica no núcleo naftoquinônico promovido pelo efeito mesomérico do par de elétrons não ligante do heteroátomo, formando um sistema altamente deslocalizado, diminui a eletrofilicidade do átomo de carbono ligado ao segundo átomo de cloro (Figura 20).⁴⁸

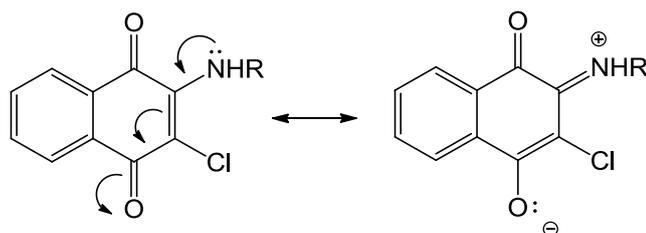


Figura 20. Explicação para a redução da eletrofilicidade do átomo de carbono ligado ao cloro.

Para que a segunda substituição aconteça, um efeito retirador de elétrons deve ser imposto sobre o anel da naftoquinona ou um catalisador, normalmente contendo paládio, deve ser empregado.⁴⁸⁻⁵⁵

Desta forma, neste trabalho foi explorado inicialmente a reação de monossustituição nucleofílica entre a 2,3-dicloronaftoquinona (**25**) e os nucleófilos nitrogenados picolilamina (**34**), 1,3-diaminopropano (**35**) e 2-aminoetanol (**36**). Posteriormente, metanol (**37**) foi utilizado como nucleófilo oxigenado, e ainda os nucleofílicos sulfurados 1,2-ditioletano (**38**) e o 2-mercaptoetanol (**39**), conforme mostrados na Figura 21.

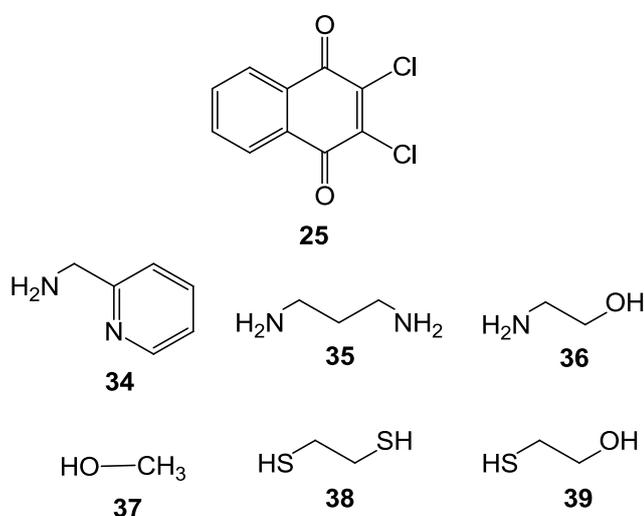
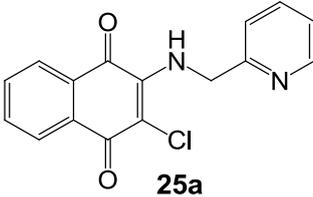
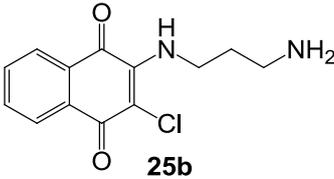
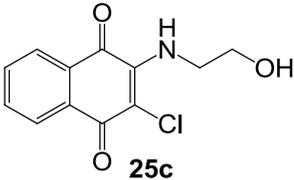
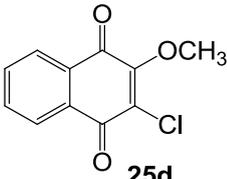
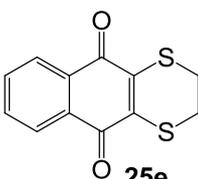
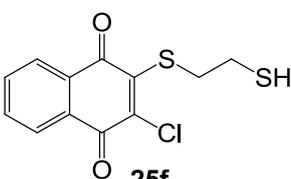
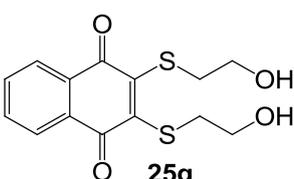


Figura 21. Reagentes utilizados nas tentativas de síntese dos compostos 2-substituído-3-cloro-1,4-naftoquinona e 2,3-substituído-1,4-naftoquinona.

Os compostos obtidos após a reação de substituição com aminas e também com o metanol, foram todos produtos de monossustituição. Quando a reação foi realizada com os nucleófilos sulfurados (**38**) e (**39**), observou-se a formação de uma mistura de produtos monossustituído e dissustituído. As reações testadas foram otimizadas neste trabalho conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Síntese dos derivados naftoquinônicos dissustituídos a partir da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**).

Entrada	Nucleófilo	Solvente	Base	Tempo	Produto	Rend.
1	34	MeOH	Et ₃ N	2h	 25a	88%
2	35	MeOH	-	7h	 25b	89%
3	36	MeOH	-	24h	 25c	89%
4	37	MeOH	Et ₃ N	3h	 25d	81%
5	38	MeOH	-	12h	 25e	62%
6	38	(CH ₃) ₂ CO/ H ₂ O	-	12h	 25f	66%
7	39	(CH ₃) ₂ CO/ H ₂ O	-	24h	 25g	52%

Os sólidos obtidos após a filtração e lavagem com metanol gelado foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C, e espectrometria de massa de alta resolução.

Para a síntese de **25a** (entrada 1 da Tabela 1), algumas modificações experimentais foram realizadas a partir da metodologia descrita por Elango e colaboradores, sendo necessário utilizar Et₃N, excesso de nucleófilo e um tempo reacional de 2 horas, superior ao tempo descrito na metodologia usada pelos autores supracitados.⁶⁸ A síntese de **25b**, composto inédito (entrada 2 da Tabela 1), composto ainda não descrito em trabalhos anteriores, foi realizada utilizando uma metodologia semelhante, porém não foi necessário empregar Et₃N como base na reação.

A caracterização estrutural de **25a** por espectroscopia de infravermelho em pastilha de KBr mostrou bandas características em 3253 cm⁻¹ e 1566 cm⁻¹ atribuídas à deformação axial e angular da ligação N-H, em 1683 cm⁻¹ devido à deformação axial C=O, em 1605 cm⁻¹ correspondente às deformação axial C=C, em 1295 cm⁻¹ resultante do estiramento da ligação C-N e, finalmente, uma banda em 719 cm⁻¹ atribuída ao estiramento C-Cl.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 22) do composto **25a** mostrou um dubleto em 5,19 ppm, atribuído aos hidrogênios metilênicos (-CH₂) da picolilamina. Um singlete largo foi observado em 7,82 ppm, sinal que corresponde ao hidrogênio -NH do substituinte. Os sinais em 8,65, 7,63, 7,29 e 7,26 ppm correspondem aos hidrogênios do anel piridínico.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do íon protonado [C₁₆H₁₁ClN₂O₂ + H]⁺ com relação massa/carga m/z = 299.05827 (erro = -0.29 ppm) e índice de instauração igual a 12 ratificando a determinação estrutural do composto **25a** com fórmula mínima C₁₆H₁₀ClN₂O₂.

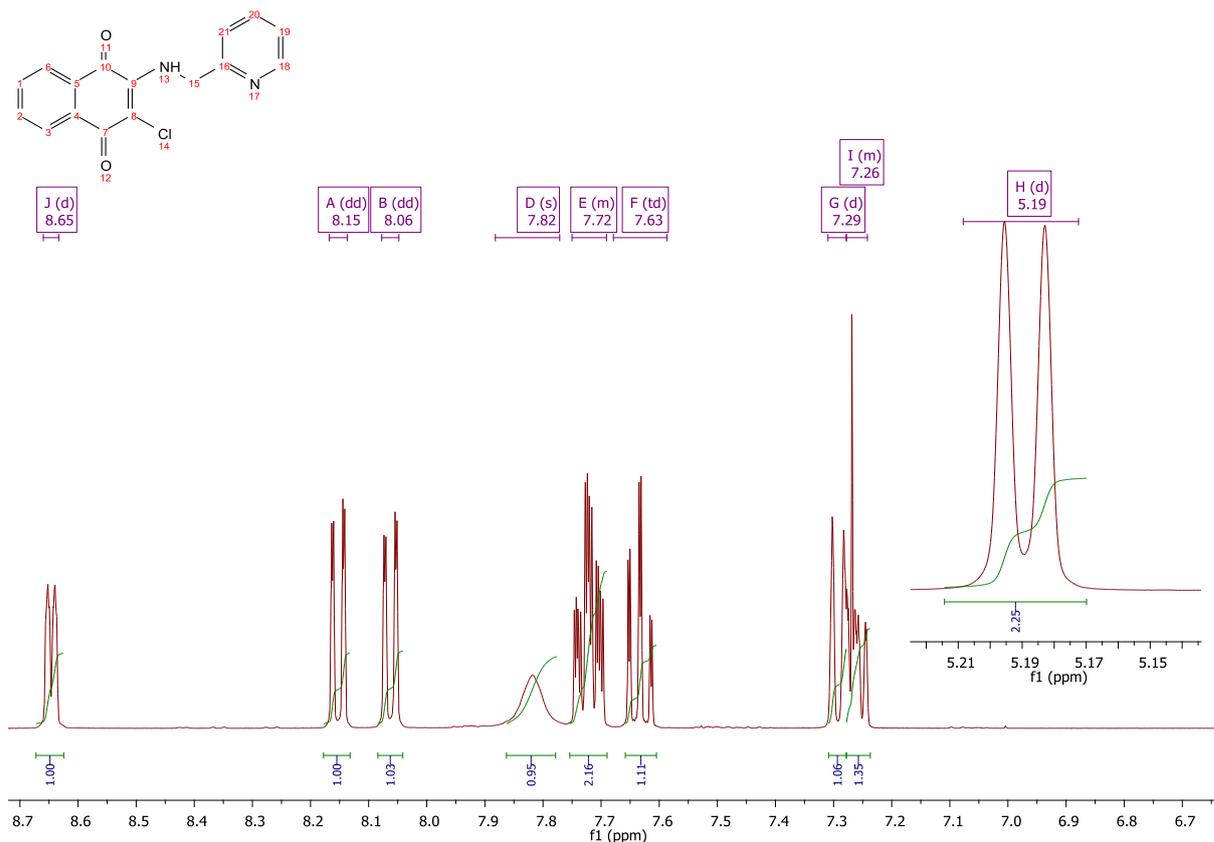


Figura 22. Expansão do espectro de RMN de ¹H do composto **25a**.

O composto **25b** foi caracterizado de maneira semelhante. Seu espectro na região do infravermelho mostrou bandas em 3270 cm⁻¹ e em 1573 cm⁻¹, características da deformação axial e angular de N-H. Foi observado também bandas em 1676 cm⁻¹ e 1602 cm⁻¹ correspondentes aos estiramentos C=O e C=C, em 1293 cm⁻¹ devido a deformação axial da ligação C-N e em 720 cm⁻¹, referente à deformação axial da ligação C-Cl.

A análise do composto **25b** por RMN de ¹H foi dificultada devido à baixa solubilidade do produto nos solventes mais comuns utilizados em RMN, como por exemplo, CDCl₃ e DMSO-*d*. Entretanto, pode-se confirmar a estrutura do produto através dos sinais da região alifática (Figura 23). O singlete alargado em 6,13 ppm corresponde ao átomo de hidrogênio H₁₃ em -NH da amina secundária. Além desse, os sinais em 4,00 ppm, 3,72 ppm, 2,91 ppm, 2,12 ppm e 1,83 ppm correspondentes aos hidrogênios metilênicos no substituinte, confirmam a formação do produto.

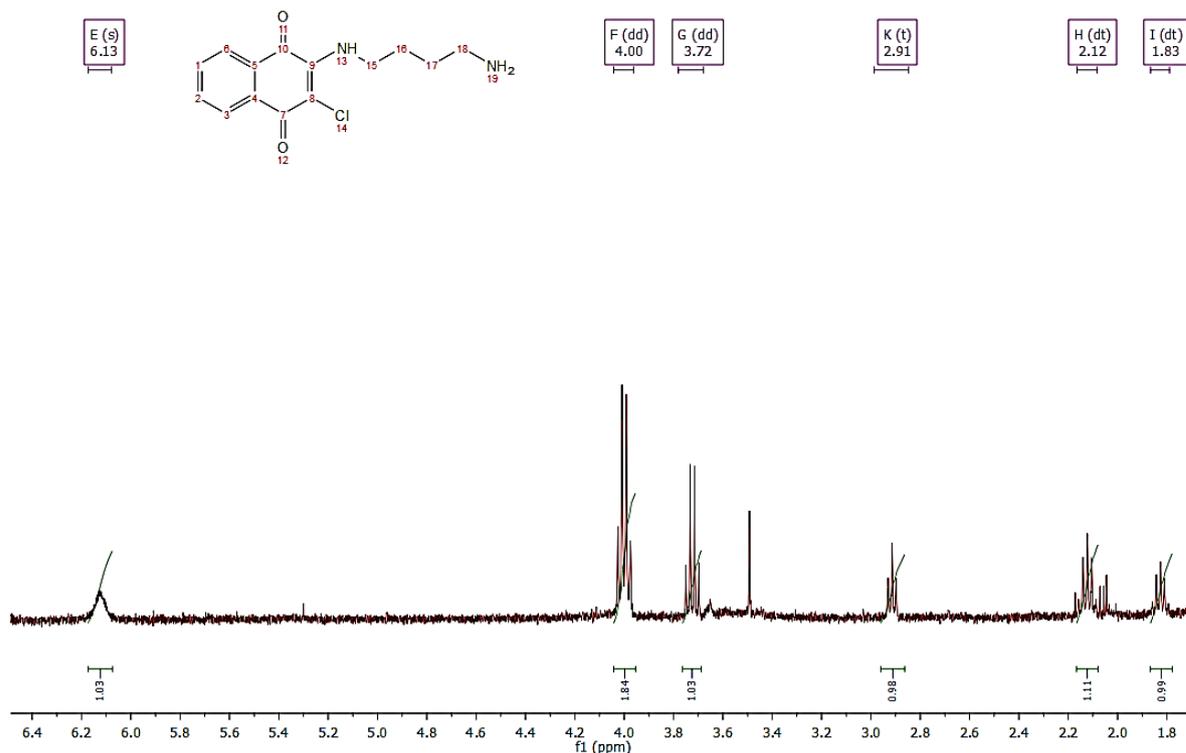


Figura 23. Expansão na região alifática do espectro de RMN de ¹H do composto **25b**.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do íon protonado $[C_{13}H_{13}ClN_2O_2 + H]^+$ com relação massa/carga $m/z = 265.07387$ (erro = -0.14 ppm) e índice de instauração igual a 8 ratificando a determinação estrutural do composto **25b** com fórmula mínima $C_{13}H_{13}ClN_2O_2$.

A preparação de **25c** (vide entrada 3 da Tabela 1 na página 57) e **25d** (vide entrada 4 da Tabela 1 na página 57) foi realizada em condições mais brandas do que aquelas descritas em trabalhos anteriores e com melhores resultados. Brun e colaboradores prepararam anteriormente o composto **25c** a partir da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona em solução de éter etílico com Et_3N , obtendo rendimentos de aproximadamente 46%.⁵⁶ Em nosso trabalho, o mesmo produto foi obtido com 89% de rendimento, utilizando metanol como solvente e excesso do nucleófilo.

A síntese de **25d** foi descrita anteriormente por Sarhan e colaboradores, através da reação da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona com metóxido de sódio em metanol sob refluxo por 8h, obtendo o produto com 77% de rendimento.⁶⁹ A mesma reação foi realizada neste trabalho empregando uma solução de 2,3-dicloro-1,4-

naphthoquinona, metanol e Et_3N . O composto **25d** foi obtido com 81% de rendimento.

O espectro de infravermelho do composto **25c** em ATR mostrou uma banda intensa em 3470 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação O-H, em 2905 cm^{-1} e 2881 cm^{-1} bandas de estiramento C-H alifático. Em 3301 cm^{-1} e 1565 cm^{-1} , foram observadas as bandas de estiramento axial e angular da ligação N-H. Observou-se também bandas de deformação axial da ligação C=O e C=C em 1682 cm^{-1} e 1601 cm^{-1} , respectivamente, referente ao núcleo naftoquinônico. A banda referente ao estiramento da ligação de C-OH, característica de álcoois primários é registrada em 1073 cm^{-1} e em 724 cm^{-1} tem-se a banda de deformação axial da ligação C-Cl.

O espectro de RMN de ^1H do composto **25c** apresentou na região alifática (Figura 24 na Página 62) um singlete alargado em 6.42 ppm correspondente ao hidrogênio -NH do grupo amina da etanolamina. Em 4,06 ppm e 3,93 ppm observou-se um duplo-triplete e um duplo-dublete atribuídos as hidrogênios metilênicos H_{15} e H_{14} da cadeia alifática, respectivamente. Por fim, o triplete largo em 1,81 ppm foi atribuído à hidroxila etanólica do aminoetanol e o acoplamento foi confirmado pelo espectro de RMN 2D $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do íon protonado $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3 + \text{H}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 252.0419$ (erro = 1.23 ppm), o complexo $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3 + \text{Na}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 274.0238$ (erro = 1.30 ppm) e índice de instauração igual a 8 ratificando a determinação estrutural do composto **25c** com fórmula mínima $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$.

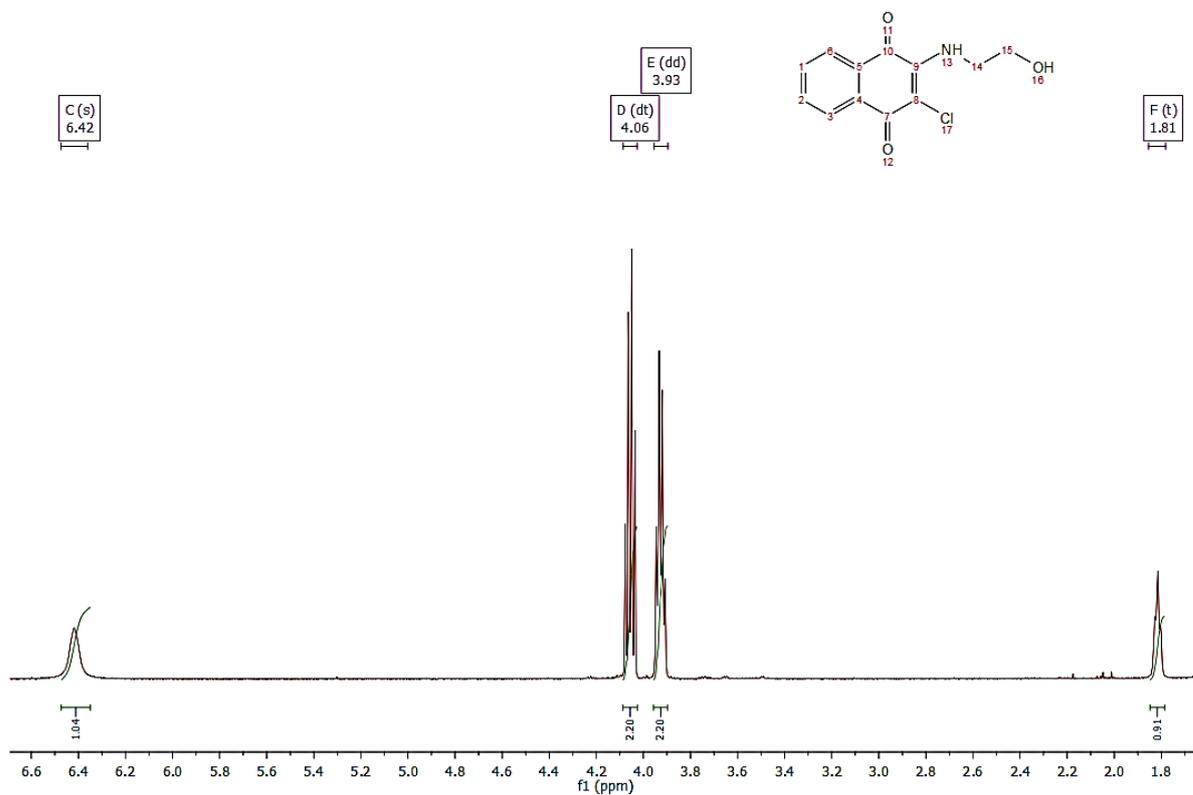


Figura 24. Expansão na região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto **25c**.

Para o composto **25d**, o espectro de infravermelho em ATR mostrou bandas em 2960 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} referentes aos estiramentos axiais C-H metílico, uma banda em 1674 cm^{-1} e outra em 1590 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos das ligações C=O e C=C. As bandas em 1255 cm^{-1} e em 1045 cm^{-1} são características de estiramento assimétrico e simétrico das ligações C-O-C de enol éter. Tem-se em 716 cm^{-1} a banda de estiramento da ligação C-Cl.

No espectro de RMN de ^1H do composto **25d** (Figura 25 na Página 63) foi observado um singleto em $4,32\text{ ppm}$ referente aos hidrogênios do grupo metil. Além desse sinal, na região aromática são encontrados os sinais referentes aos hidrogênios da naftoquinona, em $8,15\text{ ppm}$ e $7,75\text{ ppm}$.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do complexo $[\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClO}_3 + \text{Na}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 244.9972$ (erro = 1.490 ppm) e índice de instauração igual a 8 ratificando a determinação estrutural do composto **25d** com fórmula mínima $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClO}_3$.

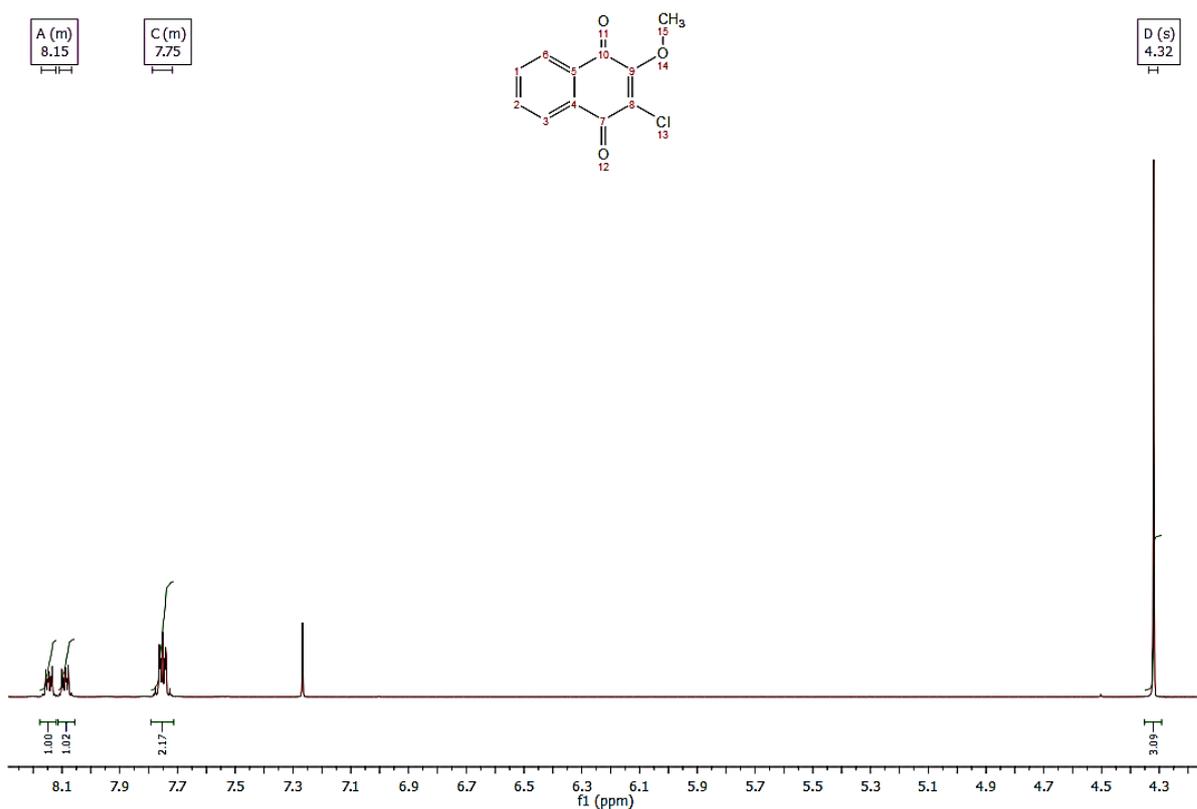


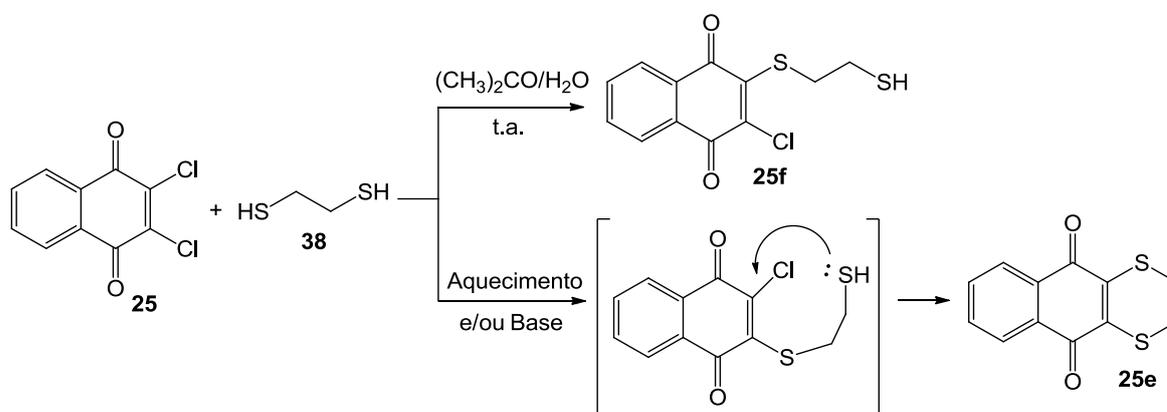
Figura 25. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto **25d**.

A preparação do produto **25f** (vide entrada 6 da Tabela 1 na página 57) a partir da reação com 1,2-ditioetano (**38**) foi especialmente desafiadora, uma vez que tentou-se reproduzir a metodologia de substituição nucleofílica em água descrita na literatura, mas não foi obtido sucesso.⁴⁸ Diversas modificações experimentais foram tentadas a fim de se obter o produto **25f**, tais como: uso de diferentes solventes (água, etanol, metanol e acetona), realizadas as reações a temperatura ambiente, sob aquecimento e com refluxo; bases como Et_3N e K_2CO_3 foram utilizadas, tempos reacionais que variaram de 1 a 48 horas foram testadas, como pode ser visto na Tabela 2. A utilização de AgNO_3 foi realizada numa tentativa de aumentar a eletrofilicidade do carbono C_2 do núcleo naftoquinônico mediante complexação do íon Ag^+ com o átomo de cloro, facilitando a sua eliminação na forma de AgCl insolúvel no meio reacional,

Tabela 2. Metodologias testadas para a obtenção de **25f**.

Entrada	Solvente	Temperatura	Tempo de Reação	Base	Catalisador	Produto
1	H ₂ O	Ambiente	48h	-	-	-
2	H ₂ O	Ambiente	12h	Et ₃ N	-	25e
3	H ₂ O	50 °C	12h	Et ₃ N	-	25e
4	H ₂ O	Ambiente	48h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
5	H ₂ O	50 °C	12h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
6	H ₂ O	Ambiente	12h	K ₂ CO ₃	-	25e
7	CH ₃ OH/ H ₂ O	Ambiente	48h	-	AgNO ₃	25e
8	CH ₃ OH/ H ₂ O	Ambiente	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
9	CH ₃ OH/ H ₂ O	65 °C	12h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
10	C ₂ H ₅ OH/ H ₂ O	Ambiente	48h	-	AgNO ₃	25e
11	C ₂ H ₅ OH / H ₂ O	Ambiente	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
12	C ₂ H ₅ OH / H ₂ O	78 °C	12h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
13	(H ₃ C) ₂ CO	Ambiente	24h	-	-	-
14	(H ₃ C) ₂ CO/ H ₂ O	Ambiente	12h	-	-	25f

Contudo, devido à moleza e a alta nucleofilicidade dos átomos de enxofre no nucleófilo **38** foi obtido sistematicamente o produto dissustituído ciclizado **25e** (vide entrada 5 da Tabela 1 na página 57) proveniente de uma substituição nucleofílica intramolecular (Figura 26). Temperaturas acima da ambiente, assim como a utilização de base (Et₃N), favoreceram a obtenção deste produto. O composto desejado **25f** só foi obtido quando a reação foi realizada numa mistura de acetona/água a temperatura ambiente sem base e com excesso do nucleófilo. Cabe ressaltar que esta metodologia foi desenvolvida neste trabalho.

Figura 26. Síntese do derivado naftoquinônico **25e** e **25f**.

A caracterização estrutural de **25e** por espectroscopia de infravermelho em KBr mostrou uma banda em 2911 cm^{-1} referente ao estiramento C-H dos metilenos do substituinte, uma banda em 1641 cm^{-1} e outra em 1587 cm^{-1} devido ao estiramento das ligações C=O e C=C, respectivamente, e uma banda em 694 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento da ligação C-S. Observa-se ainda a ausência de qualquer banda característica da ligação C-Cl, sendo outro indício da ciclização do produto.

A região alifática do espectro de RMN de ^1H obtido para o derivado naftoquinônico **25e** (Figura 27) mostra apenas um singlete em 3,31 ppm característico dos hidrogênios alicíclicos do produto. Na região aromática, tem-se os sinais dos hidrogênios naftoquinônico em 8,07 ppm e 7,69 ppm.

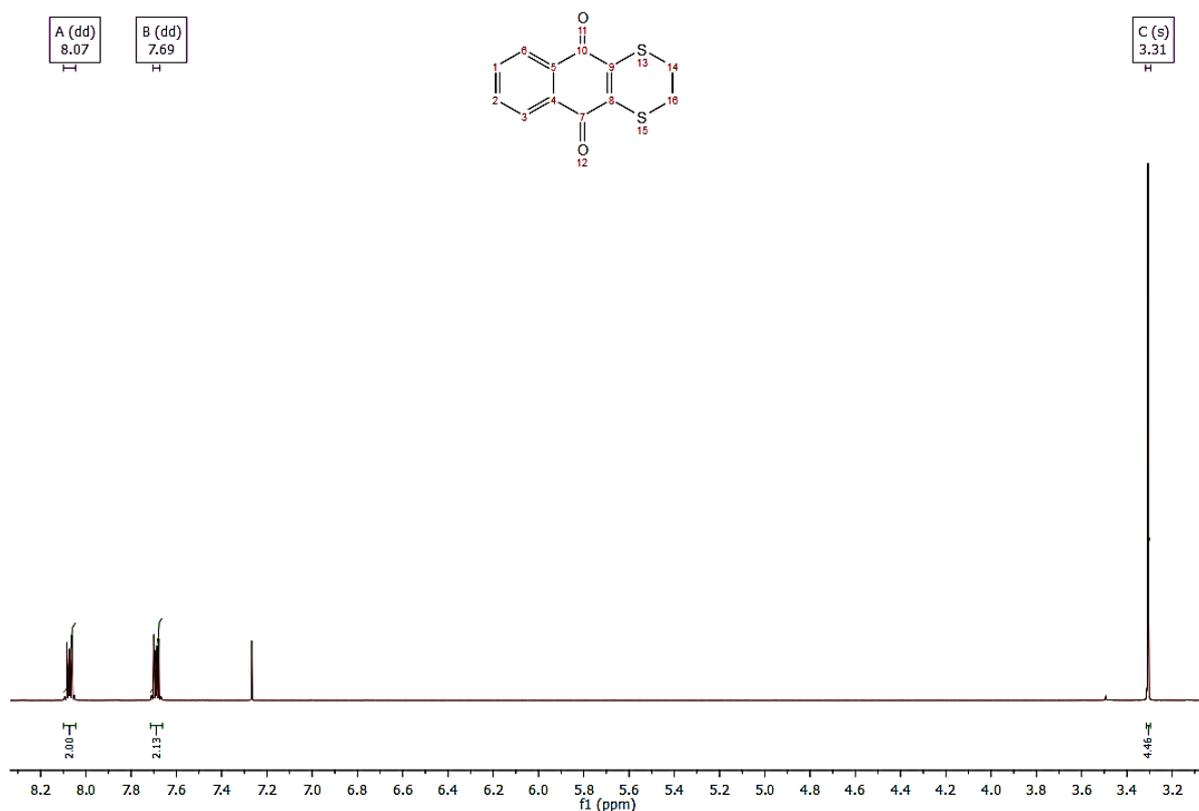


Figura 27. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto **25e**.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do íon protonado $[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2 + \text{H}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 249.0037$ (erro = 0.23 ppm), o complexo $[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2 + \text{Na}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 274.9856$ (erro = 0.16 ppm), do complexo $[2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2) + \text{Na}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 518.9824$ (erro = -0.06 ppm) e índice de

instauração igual a 9 ratificando a determinação estrutural do composto **25e** com fórmula mínima $C_{12}H_8O_2S_2$.

O composto **25f** apresentou bandas de absorção no infravermelho em KBr, em 3069 cm^{-1} e 3028 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações C-H do anel aromático e em 2989 cm^{-1} e 2928 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações C-H alifáticas da molécula. Apresentou, também, bandas em 1699 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} e 1588 cm^{-1} atribuídas ao estiramento das ligações C=O, C=C conjugado à carbonila e C=C aromática, respectivamente. Observa-se ainda bandas de estiramento da ligação C-Cl em 807 cm^{-1} e da ligação C-S em 666 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H do composto **25f** (Figura 28) verificou-se um multiplete em 3,50 ppm atribuído aos hidrogênios metilênicos do ditioletano. Na região aromática foi observado os sinais característicos dos hidrogênios da naftoquinona em 8,20 ppm, 8,12 ppm e 7,82 ppm.

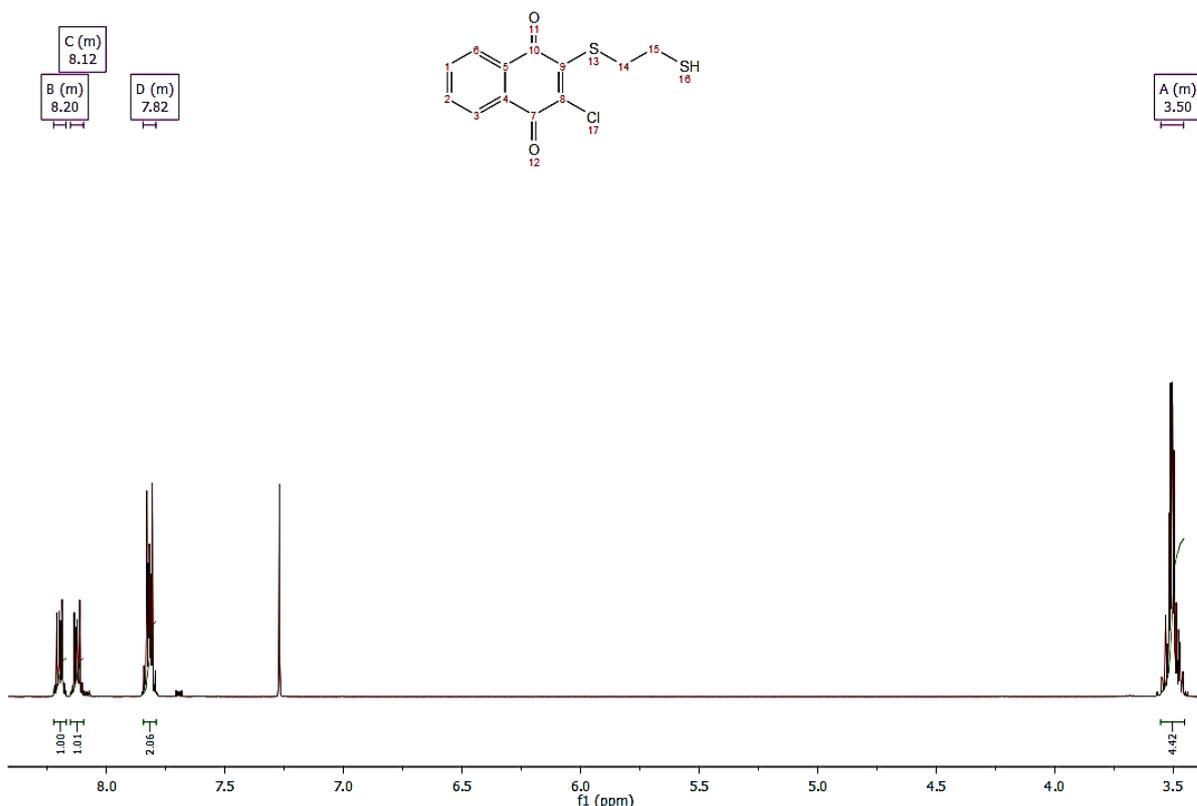


Figura 28. Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto **25f**.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do íon protonado $[C_{12}H_9ClO_2S_2 + H]^+$ com relação massa/carga

$m/z = 284.9804$ (erro = 0.30 ppm) e índice de instauração igual a 8 ratificando a determinação estrutural do composto **25f** com fórmula mínima $C_{12}H_9ClO_2S_2$.

Posteriormente, com o objetivo de se obter o composto monossustituído a partir da reação da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (**25**) com a 2-mercaptoetanol (**39**), foi realizada a reação nas mesmas condições reacionais otimizadas, conforme descrito anteriormente, para a formação de **25f**, contudo, foi obtido exclusivamente o produto dissustituído **25g** (vide entrada 7 da Tabela 1 na página 57) proveniente de uma dupla substituição nucleofílica intermolecular. Nenhum produto alicíclico foi obtido, provavelmente, devido a maior dureza e menor nucleofilicidade da hidroxila terminal presente no 2-mercaptoetanol.

O espectro de infravermelho de **25g** em ATR mostrou uma banda alargada em 3278 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação O-H da hidroxila do mercaptoetanol. Em 1654 cm^{-1} e 1588 cm^{-1} tem-se as bandas referentes ao estiramento das ligações C=O e C=C do núcleo naftoquinônico. A banda referente ao estiramento da ligação C-OH, característica de álcoois primários foi registrada em 1137 cm^{-1} e em 699 cm^{-1} verificou-se a banda de deformação axial da ligação C-S.

A análise do espectro de RMN de ^1H de **25g** mostrou na região alifática (Figura 29 na página 68) os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos do mercaptoetanol introduzidos nas posições C_2 e C_3 do núcleo naftoquinônico. Os hidrogênios metilênicos ligados à hidroxila apresentaram maiores deslocamentos químicos, sendo observados em 3,79 ppm. Em 3,42 ppm temos o sinal dos hidrogênios dos carbonos ligados aos átomos de enxofre. Por fim, a região alifática ainda apresenta em 2,71 ppm o sinal referente aos hidrogênio do grupo hidroxila.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do íon protonado $[C_{14}H_{14}O_4S_2 + H]^+$ com relação massa/carga $m/z = 309.0260$ (erro = 0.30 ppm) e índice de instauração igual a 8 ratificando a determinação estrutural do composto **25g** com fórmula mínima $C_{14}H_{14}O_4S_2$.

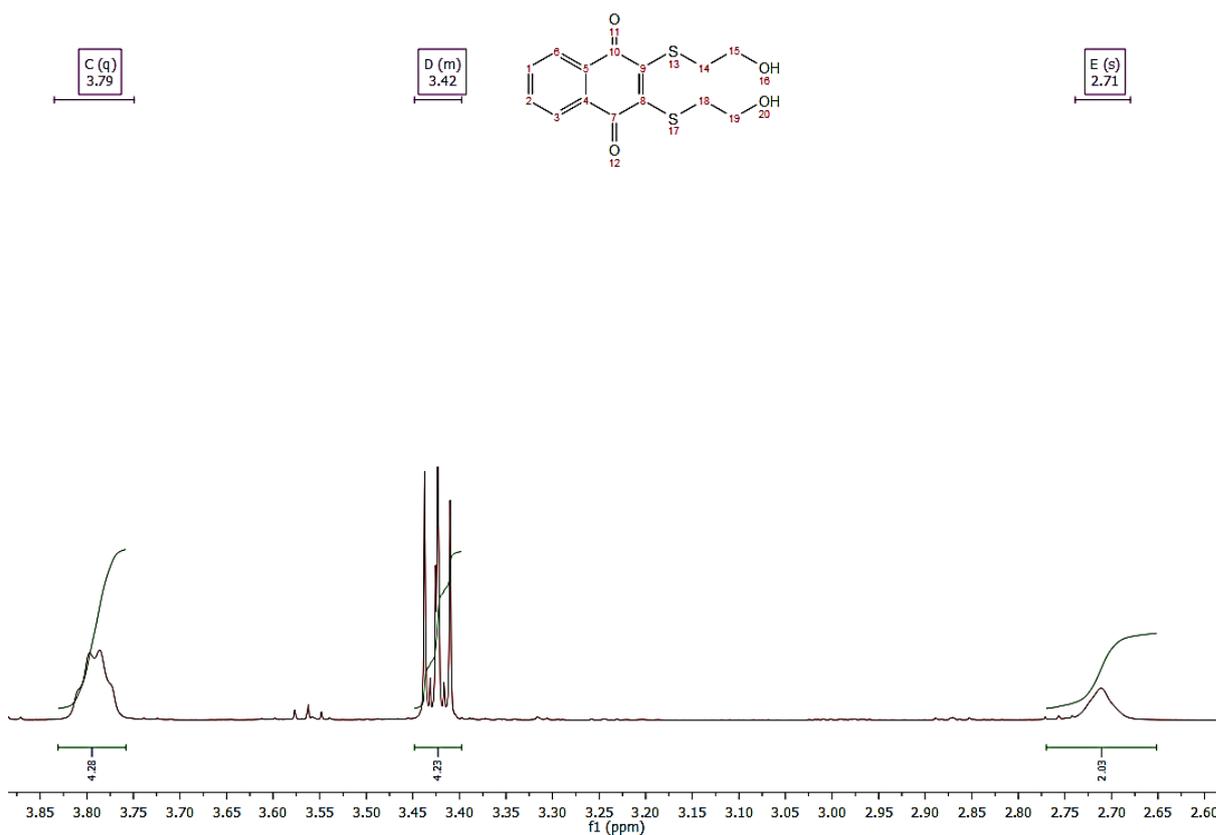
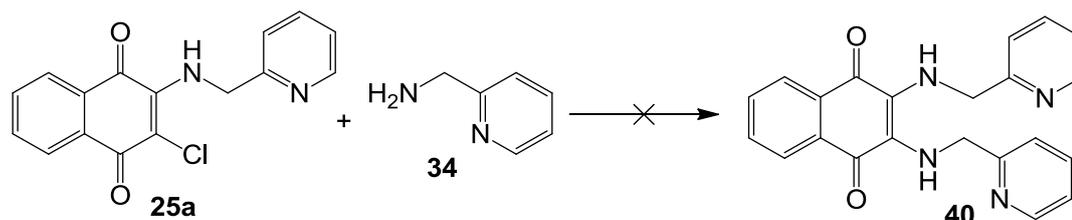


Figura 29. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ¹H do composto **25g**.

Uma vez preparados os compostos monossustituídos **25a-g**, em seguida foram testadas diversas metodologias para obter os respectivos produtos de dissustituição, usando como reação modelo a substituição nucleofílica de **25a** com a picolilamina (**34**) (Esquema 1). Entretanto, alterações das condições reacionais como a variação do solvente, temperatura e tempo de reação, assim como a utilização de base e catalisadores, não se mostraram adequados para esta reação.



Entrada	Solvente	Temperatura	Tempo de Reação	Base	Catalisador	Produto
1	CH ₃ OH	Ambiente	1h	Et ₃ N	-	-
2	CH ₃ OH	Ambiente	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	-
3	CH ₃ OH	65 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	Mistura complexa
4	C ₂ H ₅ OH	Ambiente	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	-
5	C ₂ H ₅ OH	78 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	Mistura complexa
6	H ₂ O	Ambiente	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	Mistura complexa
7	H ₂ O	50 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	Mistura complexa
8	CH ₃ OH/ H ₂ O	50 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	Mistura complexa
9	C ₂ H ₅ OH / H ₂ O	50 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	Mistura complexa
10	H ₂ O	Ambiente	24h	Et ₃ N	AlCl ₃	-
11	H ₂ O	50 °C	24h	Et ₃ N	AlCl ₃	-
12	H ₂ O	50 °C	24h	Et ₃ N	CeCl ₃ ·7H ₂ O	-
13	(H ₃ C) ₂ CO	56 °C	72h	-	AlCl ₃	-
14	H ₃ CCN	Ambiente	24h	-	AlCl ₃	-
15	H ₃ CCN	Ambiente	12h	-	CeCl ₃ /NaI	Mistura complexa
16	H ₃ CCN	82 °C	24h	-	CeCl ₃ /NaI	Mistura complexa
17	(H ₃ C) ₂ CO	56 °C	24h	-	CeCl ₃ /NaI	-

Esquema 1. Metodologias testadas para a obtenção do produto dissubstituído **40**.

A dificuldade de realizar a segunda substituição no composto **25a** é consequência da presença de uma espécie doadora de elétrons, neste caso, uma amina, capaz de aumentar a densidade eletrônica no anel da quinona, inibindo a dissubstituição em condições normais. O AgNO₃ foi adicionado numa tentativa de aumentar a eletrofilicidade do carbono C₃ do núcleo naftoquinônico (segundo sítio de substituição) mediante complexação do íon Ag⁺ com o átomo de cloro (Entradas 2-9 do Esquema 1) facilitando a sua eliminação na forma de AgCl insolúvel no meio reacional (Figura 30). Posteriormente foi utilizado o CeCl₃, ácido de Lewis oxofílico a fim de impor um efeito retirador de elétrons sobre o anel da quinona através da complexação com a carbonila e com isso aumentar a eletrofilicidade de C₃, facilitando o ataque do nucleófilo (Entrada 14 do Esquema 1). Tentou-se usar

também o AlCl_3 , ácido de Lewis com afinidade por átomos de oxigênio e halogênio, com o objetivo de diminuir a densidade eletrônica do anel quinônico mediante complexação com as carbonilas e ainda aumentar a habilidade do átomo de cloro como grupo de saída através da sua coordenação com o átomo de alumínio do ácido de Lewis (entradas 10-13 do Esquema 1). Contudo, as duas metodologias se mostram insatisfatórias. Por último tentou-se fazer a segunda substituição nucleofílica nas condições de Finkelstein usando o NaI para substituir o átomo de cloro remanescente pelo iodo, que é melhor grupo de saída (entradas 15-17 do Esquema 1). Entretanto, os produtos dissustituídos desejados não foram obtidos.

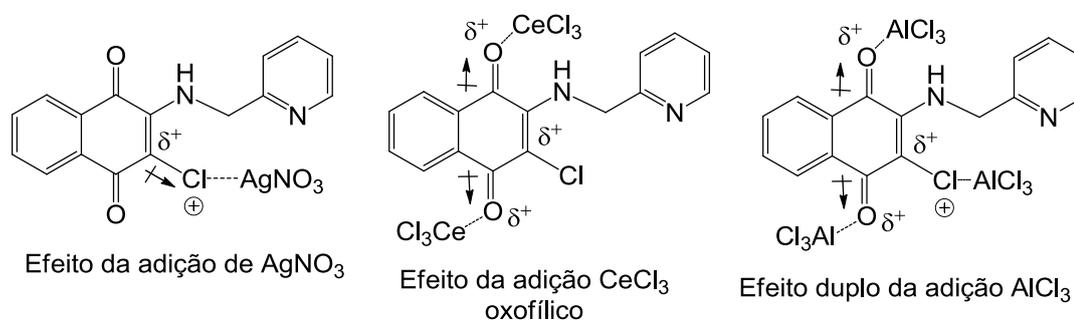
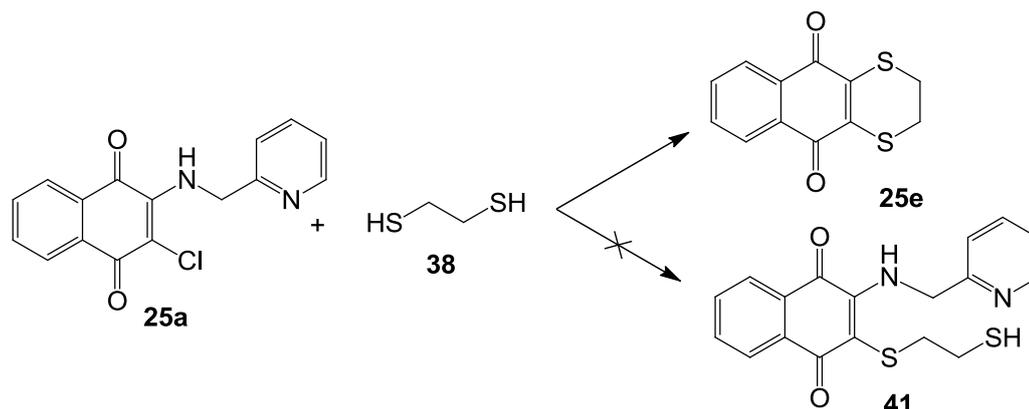


Figura 30. Efeito eletrônico esperado sob o derivado naftoquinônico **25a** ao utilizar AgNO_3 , CeCl_3 e AlCl_3 .

Diante dos insucessos descritos anteriormente para as reações usando a picolilamina como nucleófilo, foi estudado também a reação de substituição nucleofílica entre o composto **25a** e o 1,2-ditioetano (**38**), um nucleófilo sulfurado, mais nucleofílico do que a picolilamina. Para tal, tentou-se diferentes condições reacionais, conforme descrito no Esquema 2. Quando a reação foi processada sob aquecimento, o produto obtido foi sempre o ciclizado **25e**, provavelmente por um processo de substituição nucleofílica do átomo de cloro com subsequente substituição intramolecular da picolilamina. Quando a reação foi realizada a temperatura ambiente, o material de partida não foi consumido e a utilização de trietilamina como base mostrou-se inadequada já que a formação do produto ciclizado foi favorecida novamente.



Entrada	Solvente	Temperatura	Tempo de Reação	Base	Catalisador	Produto
1	H ₂ O	Ambiente	24h	-	-	-
2	H ₂ O	Ambiente	24h	Et ₃ N	-	25e
3	H ₂ O	Ambiente	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
4	H ₂ O	50 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
5	H ₂ O	100 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
6	CH ₃ OH/ H ₂ O	Ambiente	72h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
7	CH ₃ OH/ H ₂ O	65 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
8	C ₂ H ₅ OH / H ₂ O	50 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
9	C ₂ H ₅ OH/ H ₂ O	78 °C	24h	Et ₃ N	AgNO ₃	25e
10	(H ₃ C) ₂ CO/ H ₂ O	Ambiente	48h	-	-	-

Esquema 2. Metodologias testadas para a obtenção de **41** a partir do produto monossustituído **25a** com 1,2-etanoditiol (**38**).

4.2 Reações de substituição nucleofílica com a 2-metoxi-1,4-naftoquinona

Considerando que um dos objetivos deste trabalho é avaliar a importância dos substituintes nas posições C₂ e C₃ do núcleo naftoquinônico para a atividade antineoplásica em linhagens de células de câncer humano foi realizado nesta etapa do trabalho reações de substituição nucleofílica na 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**) para obtenção de derivados 1,4-naftoquinônicos contendo substituintes apenas na posição C₂ e, conseqüentemente, hidrogênio no carbono C₃. A correlação da estrutura/atividade destes compostos com os monossustituídos **25a-d** e **25f**, e os dissustituídos **25e** e **25g** derivados da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona nos permitirá avaliar a importância do átomo de cloro, bem como da substituição do carbono C₃ do núcleo naftoquinônico.

Inicialmente a 2-metoxi-1,4-naftoquinona (**32**) foi sintetizada através da metilação da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (**42**), sob aquecimento, em meio metanólico contendo ácido clorídrico, conforme descrito na literatura (Figura 31).⁶⁵ O produto foi obtido como um sólido amarelo claro em 73% de rendimento após recristalização em água com ponto de fusão igual 180-182 °C (P.f. da literatura = 183°C).

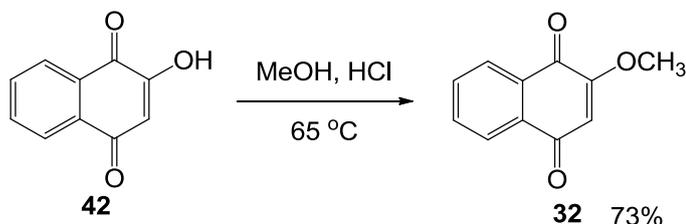


Figura 31. Preparação da 2-metoxi-1,4-naftoquinona.

O espectro de RMN de ¹H obtido para este composto apresentou sinais condizentes com os descritos na literatura⁶⁵, onde foram observados dois singletos, um em 3.92 ppm referente aos hidrogênios metílicos da metoxila e outro em 6.19 ppm correspondente ao átomo de hidrogênio do carbono C₃ do núcleo naftoquinônico (Figura 32). Os hidrogênios característicos do anel aromático da naftoquinona apresentaram deslocamentos químicos iguais a 7.74 ppm e 8.11 ppm.

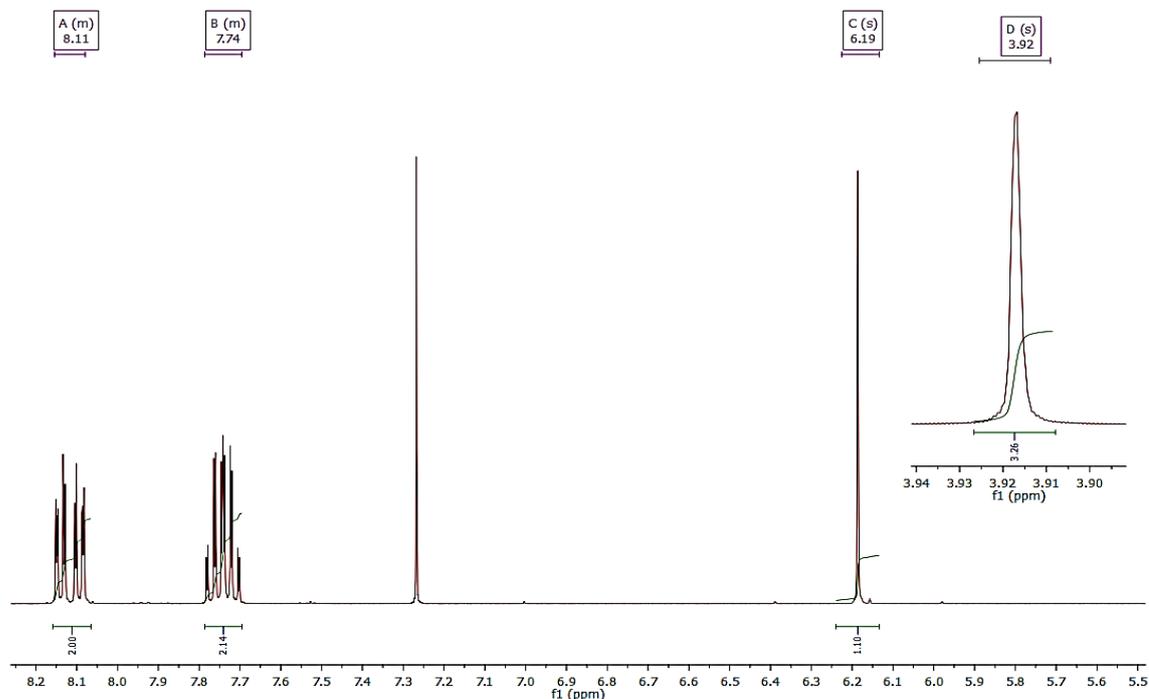
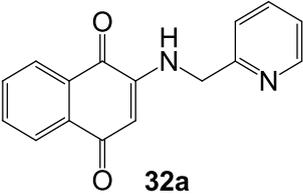
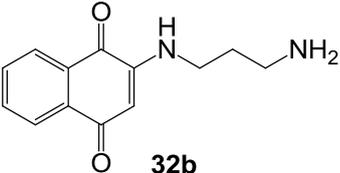
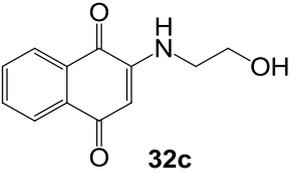


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H do composto **32**.

Em seguida, foram realizadas as reações de substituição nucleofílica na 2-metoxi-1,4-naftoquinona (**32**) usando as aminas primárias picolilamina (**34**), 1,3-diaminopropano (**35**) e 2-aminoetanol (**36**). As condições reacionais para a preparação das respectivas 1,4-naftoquinonas substituídas no carbono C₂ são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Síntese dos produtos **32a-c** a partir da 2-metoxi-1,4-naftoquinona **32**.

Entrada	Nucleófilo	Solvente	Base	Tempo	Produto	Rend.
1	34	MeOH	Et ₃ N	24h	 32a	58%
2	35	MeOH	Et ₃ N	24h	 32b	80%
3	36	MeOH	Et ₃ N	32h	 32c	83%

Os compostos **32a** (Entrada 1 da Tabela 3) e **32c** (Entrada 3 da Tabela 3) são descritos na literatura e foram preparados anteriormente por adição oxidativa de Michael com a 1,4-naftoquinona e o respectivo nucleófilo, usando metanol ou etanol como solvente, oxigênio como agente oxidante e excesso do nucleófilo no caso de **32c**.^{70,71} Neste trabalho, os mesmos compostos foram preparados com rendimentos de 58% e 83%, respectivamente, por substituição nucleofílica da metoxila da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (Figura 33).

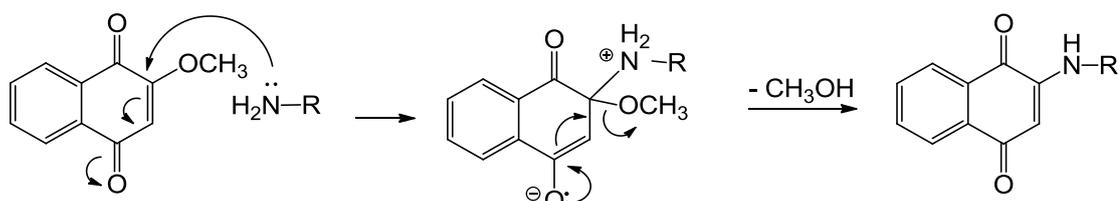


Figura 33. Mecanismo de substituição nucleofílica da 2-metoxilausona.

O composto **32b** inédito (Entrada 2 da Tabela 3) foi sintetizado seguindo a mesma metodologia, mas utilizando 1,3-diaminopropano como nucleófilo e metanol como solvente à temperatura ambiente.

A caracterização estrutural de **32a** por espectroscopia de infravermelho mostrou bandas características em 3067 cm^{-1} , 3061 cm^{-1} e 3049 cm^{-1} características dos estiramentos das ligações C-H na molécula. Observou-se também bandas em 1677 cm^{-1} devido à deformação axial C=O, em 1607 cm^{-1} correspondente a deformação axial da ligação C=C conjugada a carbonila, em 1593 cm^{-1} correspondente a deformações axial C=C de anel aromático, em 1569 cm^{-1} característico da deformação angular da ligação N-H e, finalmente, uma em 1295 cm^{-1} resultante do estiramento da ligação C-N.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 34) do composto **32a** mostrou um dubleto em 4,49 ppm atribuído aos hidrogênios metilênicos da picolilamina. Um singleto em 5,78 ppm foi observado, sinal que corresponde ao hidrogênio metílico da quinona (H_8), outro singleto largo foi observado em 7,16 ppm, atribuído ao hidrogênio em -NH do substituinte. Os sinais em 8,63, 7,63, 7,29 e 7,26 ppm correspondem aos hidrogênios do anel piridínico.

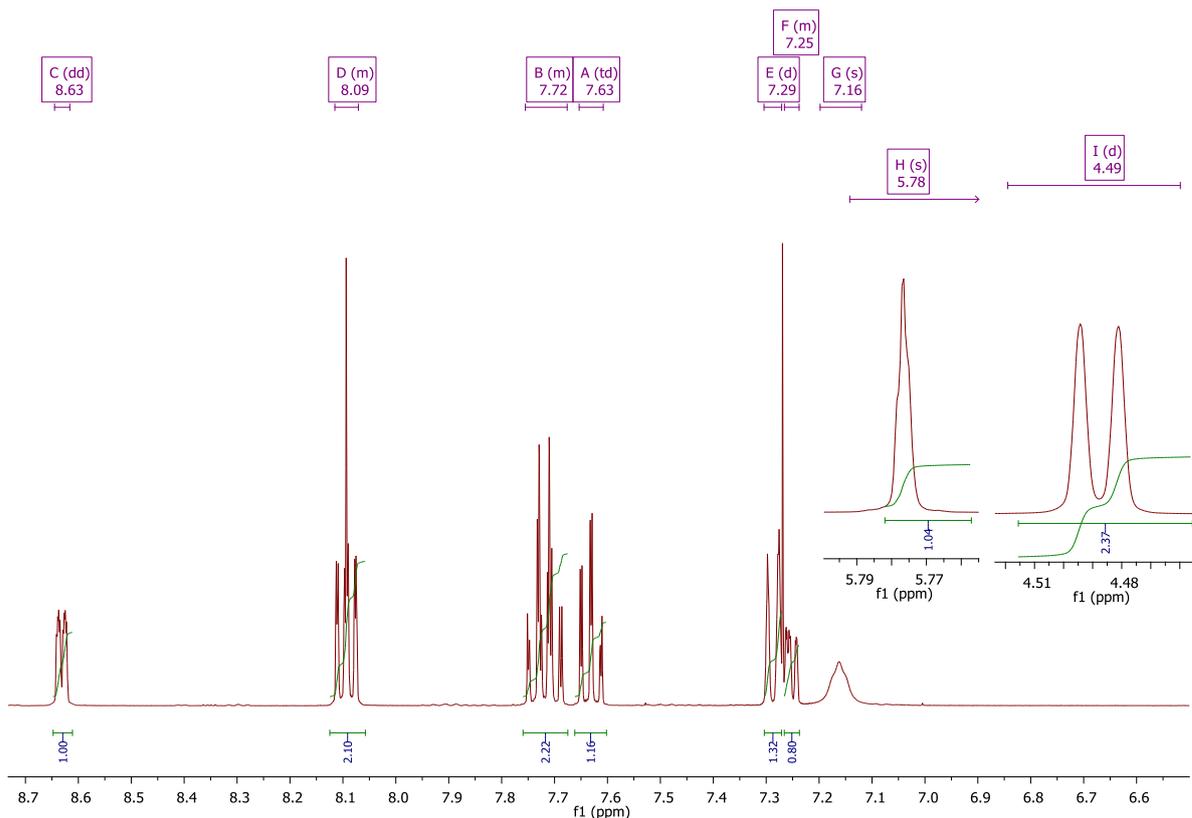


Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ¹H do composto **32a**.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do íon protonado $[C_{16}H_{12}N_2O_2 + H]^+$ com relação massa/carga $m/z = 265.0971$ (erro = 0.29 ppm) e índice de instauração igual a 12 ratificando a determinação estrutural do composto **32a** com fórmula mínima $C_{16}H_{12}N_2O_2$.

O composto **32b** forneceu um espectro na região do infravermelho com bandas em 3392 cm^{-1} e 3353 cm^{-1} , características da deformação axial N-H, e em 1569 cm^{-1} correspondente à deformação angular N-H. Pode ser observada também uma banda em 1672 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O e em 1632 cm^{-1} e 1596 cm^{-1} devido ao estiramento C=C conjugado a carbonila e C=C aromático, respectivamente. Por fim, em 1242 cm^{-1} observa-se a deformação axial da ligação C-N.

A análise do composto **32b** por RMN de ¹H, assim como seu análogo **25b**, foi dificultada devido à baixa solubilidade do produto nos solventes mais comuns utilizados em RMN, como por exemplo, $CDCl_3$ e $DMSO-d_6$. Entretanto, pôde-se confirmar a estrutura do produto através dos sinais da região alifática (Figura 35 na Página 76). Observou-se um singlete alargado em 5,91 ppm correspondente ao H_{13}

da amina secundária do grupo diaminopropano e um singlete em 5,76 ppm referente ao hidrogênio H₈ ligado ao carbono C₃ do núcleo naftoquinônico. Os sinais em 3,35 ppm, 2,11 ppm e 1,25 ppm correspondem aos hidrogênios metilênicos H₁₄, H₁₅ e H₁₆ no substituinte. Por fim, na região aromática, os sinais em 8,10 ppm, 8,05 ppm, 7,74 ppm e 7,63 ppm foram atribuídos aos hidrogênios do anel aromático da naftoquinona.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do íon protonado [C₁₃H₁₄N₂O₂ + H]⁺ com relação massa/carga m/z = 231.1126 (erro = 0.44 ppm) e índice de instauração igual a 8 ratificando a determinação estrutural do composto **32b** com fórmula mínima C₁₃H₁₄N₂O₂.

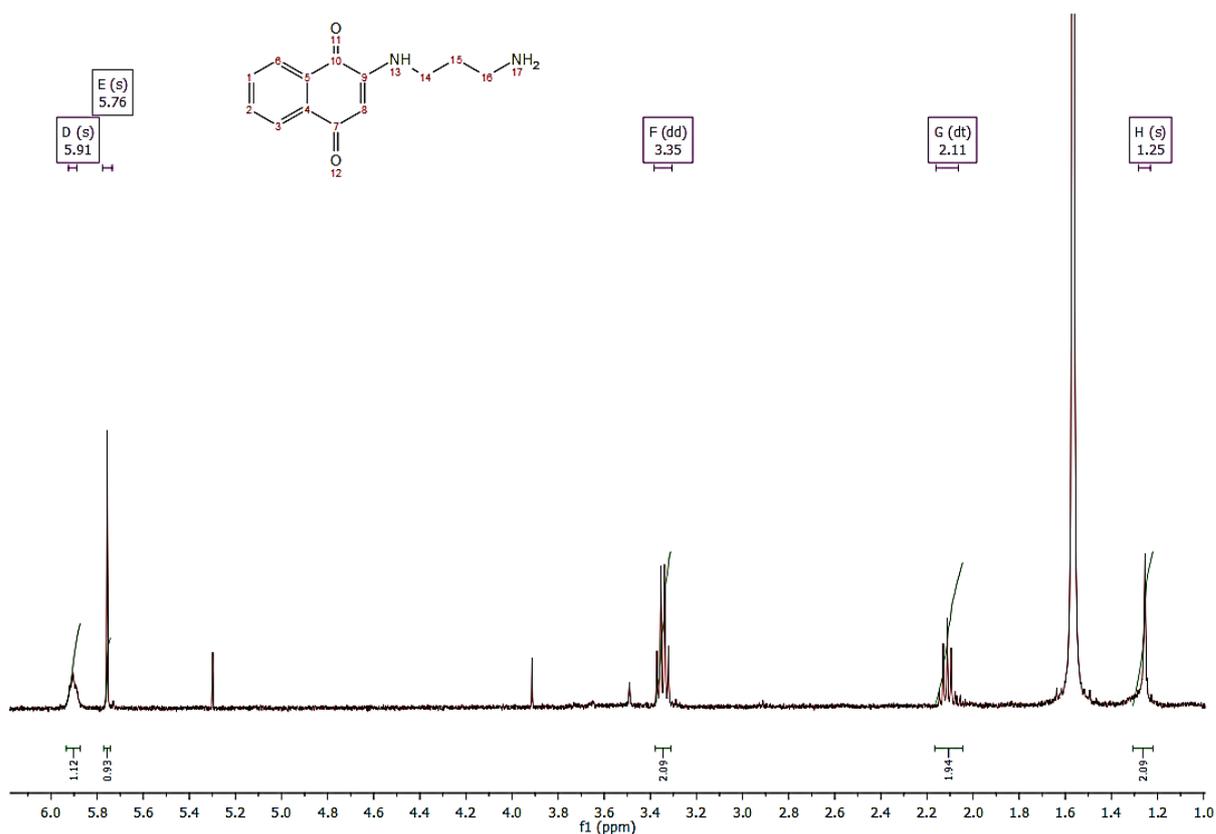


Figura 35. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ¹H do composto **32b**.

A estrutura do produto **32c** foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho em ATR cujas bandas em 3338 cm⁻¹ e 1551 cm⁻¹ referem-se ao estiramento axial e angular da ligação N-H. Em 3058 cm⁻¹ observam-se as bandas de estiramento das ligações C-H aromáticas, e em 2935 cm⁻¹ e 2913 cm⁻¹ bandas de

estiramento das ligações C-H alifáticas. Observa-se também bandas de deformação axial da ligação C=O e C=C em 1673 cm^{-1} e 1590 cm^{-1} , respectivamente. A banda referente ao estiramento da ligação C-N pode ser identificada em 1218 cm^{-1} e a banda de estiramento C-OH, característica de álcoois primários é registrada em 1071 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H do composto **32c** mostra na região alifática (Figura 36) um singlete alargado em 6.22 ppm correspondente ao hidrogênio -NH do substituinte e outro singlete em 5,77 ppm referente ao hidrogênio H₈ ligado ao carbono C₃ do núcleo naftoquinônico. Em 3,93 ppm e 3,37 ppm foram observados dois duplos-dubletos referentes aos hidrogênios H₁₅ e H₁₄, respectivamente do grupo aminoetanol. Por fim, em 1,79 ppm observou-se um tripleto alargado referente à hidroxila do substituinte.

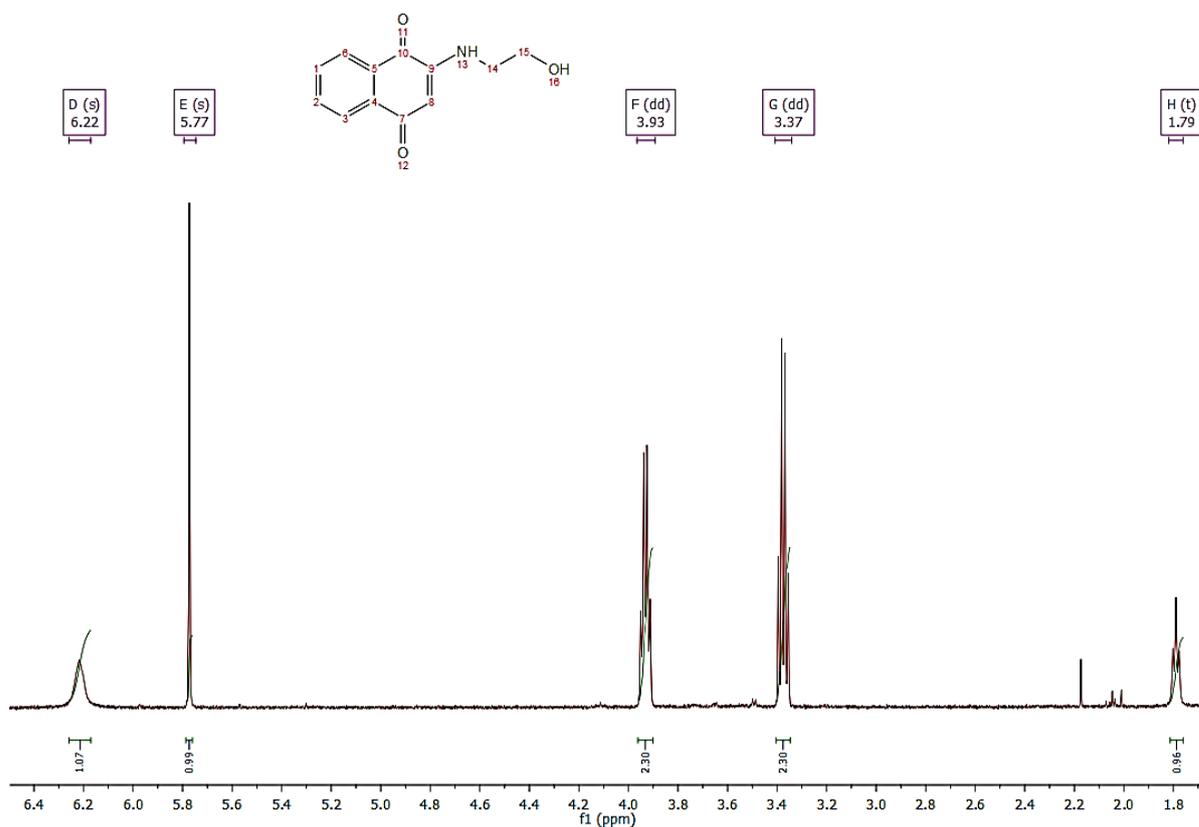


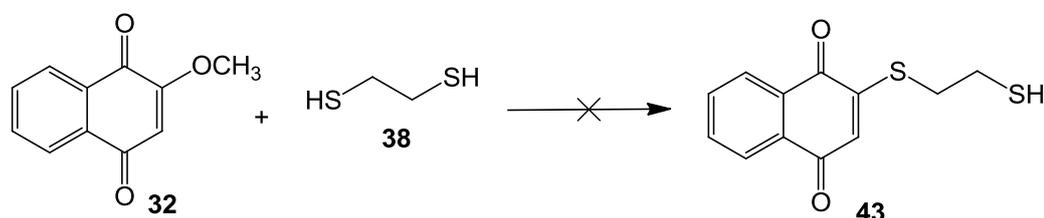
Figura 36. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto **32c**.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do complexo $[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3 + \text{Na}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 240.0628$ (erro = 1.45 ppm), do complexo $[2(\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3) + \text{Na}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 457.1364$ (erro = 1.24 ppm) e índice de instauração igual a 8

ratificando a determinação estrutural do composto **32c** com fórmula mínima $C_{12}H_{11}NO_3$.

A reação da 2-metóxi-1,4-naftoquinona também foi testada com os nucleófilos sulfurados (**38**) e (**39**), entretanto, diferentemente do que foi observado com os nucleófilos nitrogenados, estas reações não formaram os produtos de substituição esperados. Várias condições reacionais foram testadas conforme descrito nos Esquemas 3 e 4.

Na primeira tentativa de realizar a reação entre o ditioletano (**38**) e a 2-metoxi-1,4-naftoquinona (**32**) em metanol a temperatura ambiente, o material de partida foi recuperado na íntegra (entrada 1 do Esquema 3).

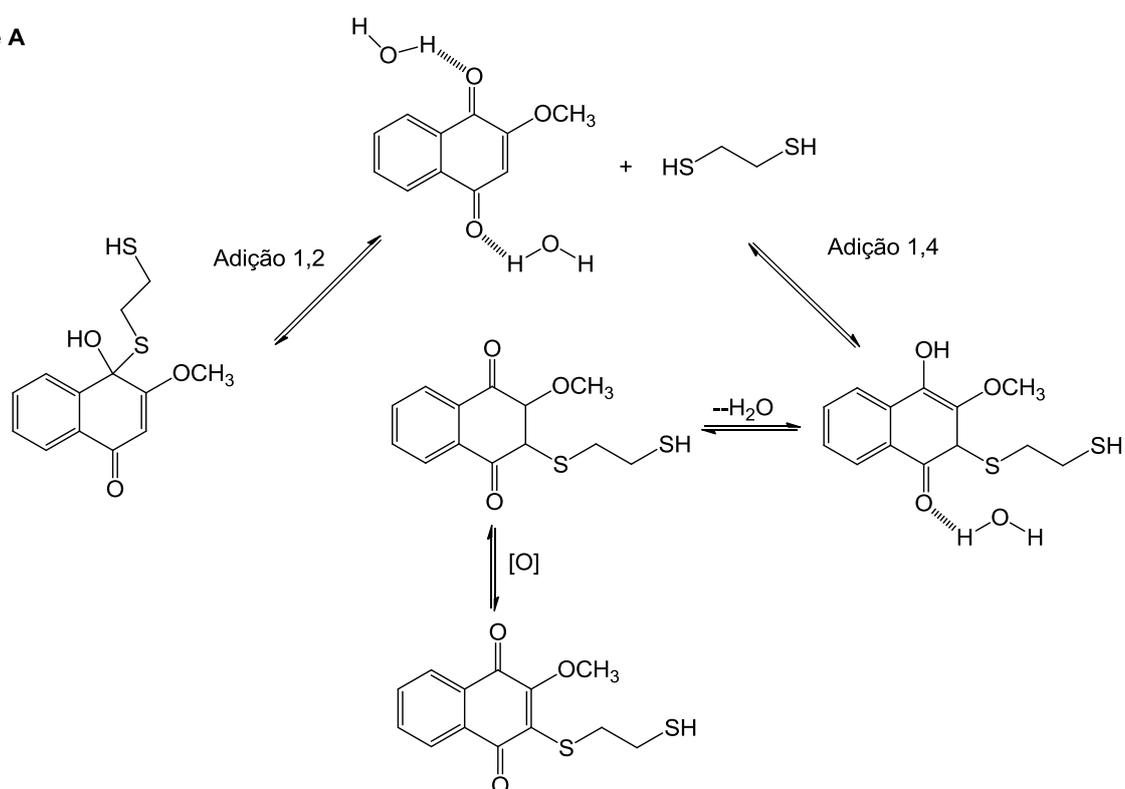


Entrada	Solvente	Temperatura	Base	Produto
1	MeOH	Ambiente	-	-
2	MeOH	Ambiente	Et ₃ N	25e
3	Acetona/Água	Ambiente	-	Mistura complexa
4	Acetona	Ambiente	Et ₃ N	25e
5	Acetona	Ambiente	K ₂ CO ₃	25e
6	Acetona	Ambiente	NaHCO ₃	25e

Esquema 3. Metodologias testadas para obtenção de **43** a partir da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**).

Quando utilizou-se uma mistura dos solventes acetona/água (entrada 3 do Esquema 3), após longo tempo reacional (5 dias) o material de partida não foi totalmente consumido e uma mistura complexa de produtos foi formada. Neste caso, a água pode estar funcionando como solvente e como catalisador ácido⁷² fazendo com que parte do material de partida sofra, por exemplo, reação de adição de Michael oxidativa e adição nucleofílica na carbonila (Figura 37 – parte A). Contudo, longos tempos reacionais favorece a formação de subprodutos oriundos de reações colaterais que podem ser: reação de adição Michael intra- e intermolecular oxidativa ou não, processos oxidativos e reações de substituição nucleofílica (Figura 37 – parte B).⁷³

Parte A



Parte B

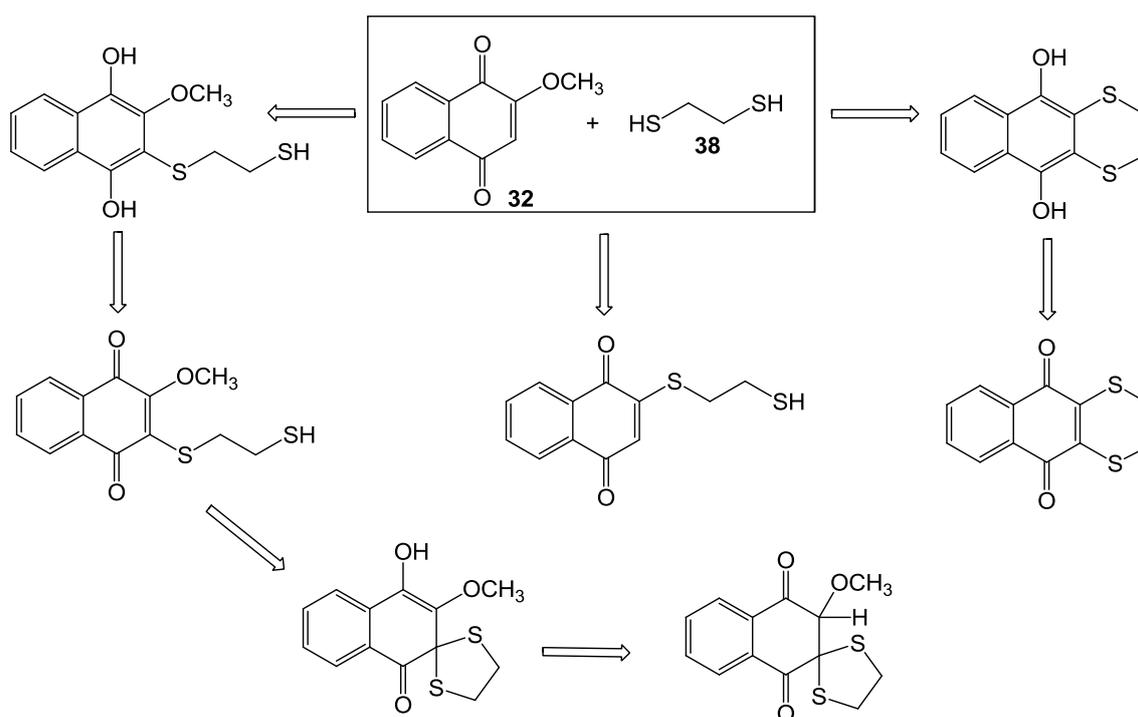


Figura 37. Possíveis reações colaterais entre a 2-metoxi-1,4-naftoquinona (32) e o 1,2-ditioetano

(38).

Nas reações usando bases (entradas 2, 4, 5 e 6 do Esquema 3) o produto ciclizado **25e** foi exclusivamente formado. Provavelmente, o nucleófilo bidentado primeiro reagiu substituindo a metoxila do substrato e, em seguida, ocorreu uma adição de Michael oxidativa intramolecular (Figura 38). É possível que o aumento da reatividade do nucleófilo se deva a formação do ânion tiolato obtido pela reação entre o ditioneolano e uma base, como, por exemplo, a trietilamina.⁷³

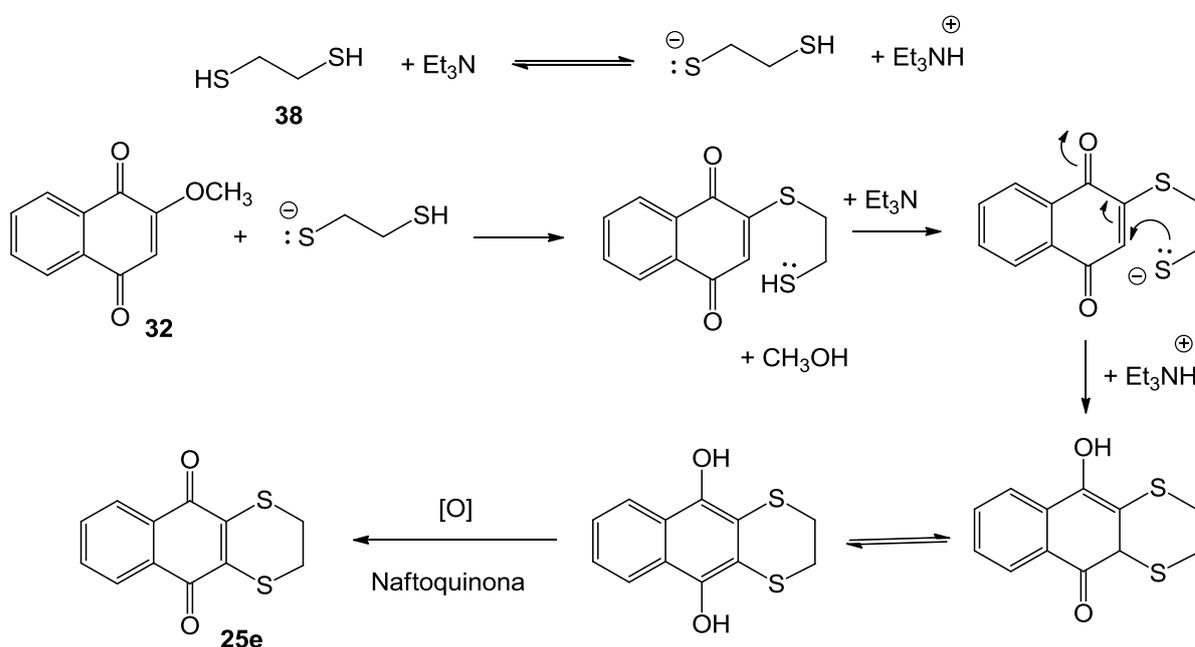
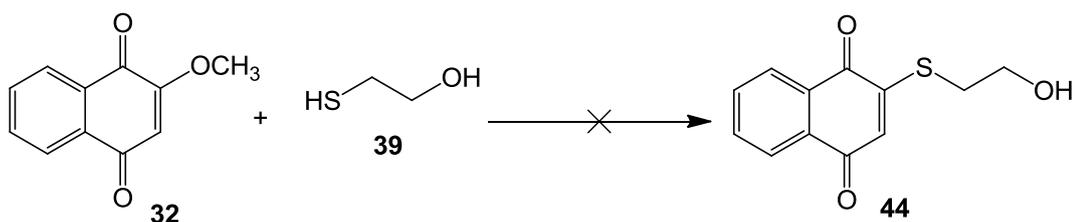


Figura 38. Reação entre a 2-metoxi-1,4-naftoquinona (**32**) e o 1,2-ditioneolano (**38**) em meio básico.

Cabe ressaltar que todas as tentativas de purificação da mistura de produtos formada nas reações anteriormente descritas por cromatografia em coluna, usando gel de sílica como fase estacionária se mostraram infrutíferas, pois, provavelmente ocorreu degradação do produto bruto mesmo quando a acidez da sílica foi neutralizada com trietilamina.

Após as tentativas frustradas de substituir a metoxila da 2-metóxi-1,4-naftoquinona com o 1,2-ditioneolano, tentou-se fazer a reação com a 2-mercaptoetanol (**39**), pois, este nucleófilo apresenta apenas um átomo de enxofre altamente nucleofílico em sua estrutura o que deve desfavorecer, pelo menos em teoria, a formação do produto ciclizado. Mais uma vez, várias metodologias foram testadas

conforme mostrado no esquema 4.



Entrada	Solvente	Temperatura	Catalisador/Base	Produto
1	MeOH	Ambiente	-	Mistura complexa
2	MeOH	Ambiente	K ₂ CO ₃	Mistura complexa
3	Acetona	Ambiente	-	-
4	Acetona	60 °C	-	Mistura complexa
5	Acetona/Água	Ambiente	-	-
6	Acetona/Água	60 °C	-	Mistura complexa
7	Acetona	Ambiente	Et ₃ N	Mistura complexa
8	Acetona	Ambiente	K ₂ CO ₃	Mistura complexa
9	Acetona	Ambiente	NaHCO ₃	Mistura complexa
10	DMSO	Ambiente	K ₂ CO ₃	Mistura complexa

Esquema 4. Metodologias testadas para obtenção de **44** a partir da 2-metóxi-1,4-naftoquinona (**32**).

As metodologias testadas foram semelhantes aquelas utilizadas para o 1,2-ditioletano (**38**), e os resultados não foram diferentes dos observados anteriormente, onde uma mistura complexa de produtos sempre foi obtida. O material de partida foi totalmente consumido apenas nas reações onde se utilizou metanol ou acetona como solvente e base (entradas 2, 7 - 9 do Esquema 4).

Como a 2-mercaptoetanol (**39**) apresentava menor chance de uma reação intramolecular, a influência da temperatura também foi testada nos casos onde a reação não se completava (entradas 4 e 6 do Esquema 4), porém novamente o produto desejado não foi obtido.

Considerando que é descrito na literatura reações de substituição nucleofílica em derivados naftoquinônicos halogenados com nucleófilos contendo enxofre acredita-se que a menor reatividade da 2-metoxi-1,4-naftoquinona frente a estes nucleófilos se deva ao fato de a metoxila ser um grupo de saída pior do que os halogênios.⁴⁹ Com isso, longos tempos reacionais são necessários para que a reação comece a se processar propiciando a ocorrência de reações colaterais indesejáveis e ainda a degradação do material de partida.

Outro ponto a se destacar é o fato de que as reações de substituição na 2-metoxi-1,4-naftoquinona com nucleófilos nitrogenados foram mais eficientes do que as reações com nucleófilos sulfurados. Essa diferença pode ser explicada pela teoria de Pearson onde o enxofre, um átomo com elevada polarizabilidade, é um nucleófilo mole e tende a reagir por adição de Michael com o átomo de carbono C₃ do núcleo naftoquinônico da 2-metoxi-1,4-naftoquinona, visto que a metoxila aumenta a concentração de carga no átomo de carbono C₂ por efeito mesomérico, tornando-o mais duro do que o carbono C₃. Em contrapartida, nucleófilos nitrogenados tendem a reagir por substituição nucleofílica no átomo de carbono C₂ duro, com subsequente eliminação da metoxila, por se tratar de espécies mais duras do que as sulfuradas.

4.3 Reações de adição oxidativa 1,4 tipo de Michael com a 1,4-naftoquinona

Além da substituição nucleofílica da 2-metoxi-1,4-naftoquinona para obtenção de compostos 1,4-naftoquinônicos substituídos no carbono C₂, algumas metodologias descritas na literatura utilizam a adição oxidativa de Michael com a 1,4-naftoquinona (**24**). De acordo com o mecanismo proposto (Figura 39) após o ataque do nucleófilo ao carbono C₂ da 1,4-naftoquinona, a dupla ligação é deslocada e o átomo de oxigênio da carbonila recebe um par de elétrons formando o intermediário **45**. Após a ocorrência de prototropismo, têm-se a protonação do oxigênio da carbonila reduzida e a formação da hidroquinona (**46**) e (**47**). A oxidação de **47** na presença de oxigênio molecular ou excesso de **24** resultará em **48**.

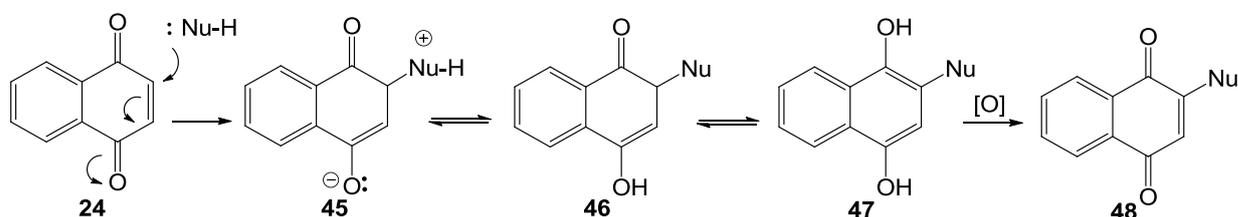


Figura 39. Mecanismo de adição oxidativa tipo Michael na 1,4-naftoquinona.

As metodologias descritas na literatura realizam a adição oxidativa de Michael na 1,4-naftoquinona com aminas, em geral aromáticas, por serem mais moles do que as aminas alifáticas devido à conjugação do par de elétrons não ligante do nitrogênio com os orbitais p dos átomos de carbono adjacentes do anel benzênico.

Normalmente são empregados sais de Cério (III), Cobre (II), Níquel (II) ou Ouro(III) como agentes oxidantes. Os produtos obtidos nestas reações apresentam rendimentos que variam de moderados a bons quando aminas primárias, secundárias, alifáticas e aromáticas são utilizadas.^{50,63,74-76}

Estudos publicados por Ji e colaboradores, e Garden e colaboradores, demonstram que os melhores catalisadores para realizar a reação de adição de Michael oxidativa na 1,4-naftoquinona com aminas são iodo e acetato de cobre, onde este último vem sendo amplamente utilizado.^{77,63}

Os íons cobre (II) são conhecidos por oxidar as hidroquinonas às respectivas quinonas. Na Figura 40, a adição de Michael de um nucleófilo (Nu-H) a **24** pode ser facilitada pela protonação de **24** ou pela complexação entre **24** e o íon Cu^{II}. No segundo caso, o complexo de cobre e a hidroquinona resultante (**50**) pode (i) interagir diretamente com o oxigênio molecular para produzir a quinona ou pode (ii) sofrer oxidação monoelétrica para formar (**51**), onde as espécies Cu^I resultante é, então, reoxidado a Cu^{II} pelo oxigênio molecular. O oxigênio pode ser eventualmente reduzida a água, o que pode ocorrer através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo a presença do sal de cobre também útil para eliminar estas espécies.

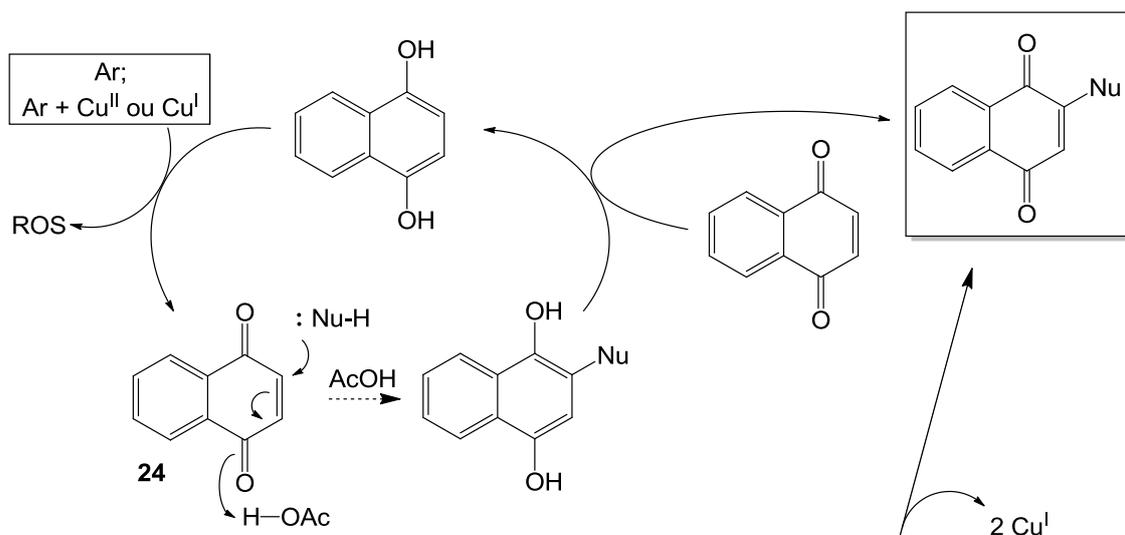
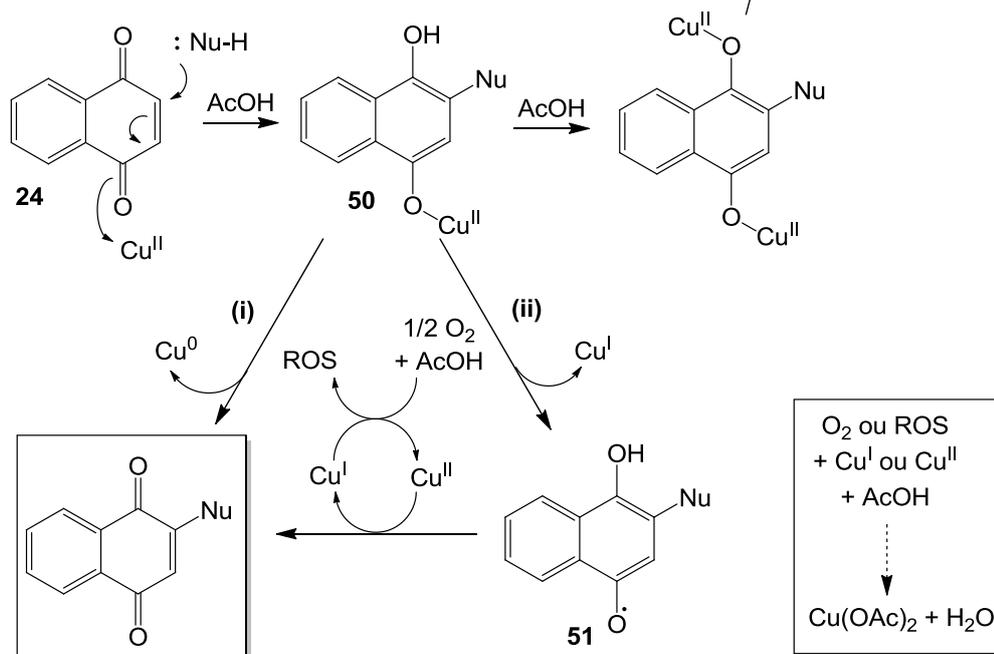
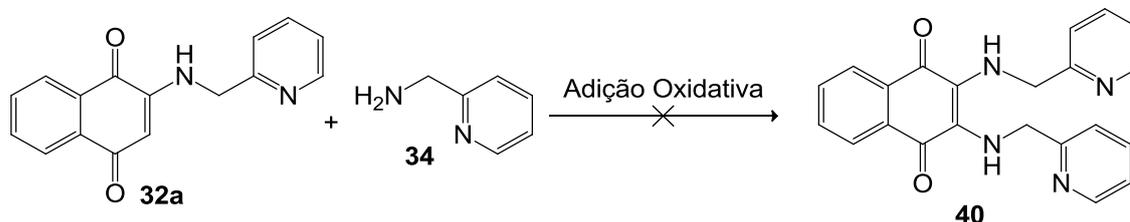
a) Naftoquinona e O₂ como agentes oxidantesb) Acetato de cobre (II) e O₂ como agentes oxidantes

Figura 40. Mecanismos da adição oxidativa de Michael.

Em contrapartida, trabalhos recentes descrevem metodologias mais simples para essa reação, sem a necessidade de um metal que promova a adição oxidativa na quinona, empregando como solvente metanol, etanol, etanol/água, ou mesmo, apenas água.^{45,48,78-80}

Desta forma, em uma última tentativa de se obter os derivados naftoquinônicos substituídos nas posições C₂ e C₃, testou-se a adição oxidativa da picolilamina (34) ao produto monossustituído 32a utilizando várias metodologias descritas na

literatura (Esquema 5). Entretanto, todas se mostraram ineficazes visto que nenhum produto foi formado (Entradas 1-3, 7 e 8, Esquema 5) ou uma mistura complexa de produtos foi obtida (Entradas 4-6, Esquema 5).



Entrada	Solvente	Temperatura	Catalisador/Base	Produto
1	H ₂ O	50 °C	-	-
2	DMF	56 °C	K ₂ CO ₃	-
3	Acetona	56 °C	K ₂ CO ₃	-
4	AcOH	75 °C	Cu(OAc) ₂ .H ₂ O	Mistura complexa
5	EtOH	75 °C	Cu(OAc) ₂ .H ₂ O	Mistura complexa
6	EtOH	78 °C	CeCl ₃ .7H ₂ O	Mistura complexa
7	EtOH	78 °C	K ₂ CO ₃	-
8	EtOH:CH ₂ Cl ₂ (4:1)	Ambiente	-	-

Esquema 5. Metodologias de adição oxidativa testadas para obtenção de 40.

A primeira metodologia testada (entrada 1 do Esquema 5), descrita por Yadav e colaboradores é uma das mais simples dentre as descritas na literatura. Neste trabalho os autores fizeram reações de adição 1,4 oxidativa entre aminas e compostos 1,4-naftoquinônicos empregando apenas água como solvente e a oxidação final da reação é promovida pelo oxigênio molecular do meio.⁸⁰

Outra metodologia simples foi empregada por Huang e colaboradores onde preparou-se tioéteres de coroa derivados da 1,4-naftoquinona substituída na posição C₂ em reações utilizando DMF, Ce₂CO₃ e nucleófilos sulfurados com rendimentos moderados.⁵⁷ Esta metodologia foi testada utilizando acetona e DMF como solvente (entrada 2 e 3 do Esquema 5).

A utilização dos agentes oxidantes Cu(OAc)₂.H₂O e CeCl₃.7H₂O é descrita na literatura como sendo eficiente para a adição oxidativa com aminas aromáticas.^{50,63} As metodologias testadas com esses sais (entrada 4-6, Esquema 5) produziram uma mistura complexa de produtos de difícil tratamento.

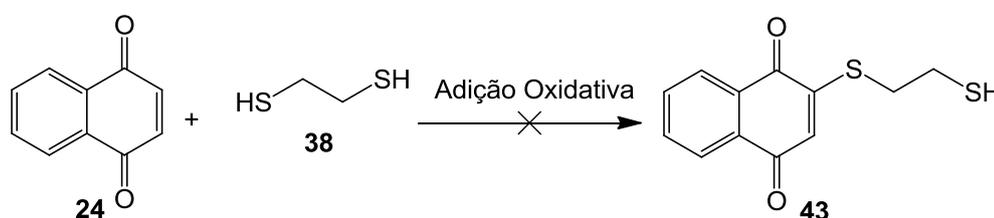
Em 2009, Tandon e colaboradores descreveram a síntese do produto de adição oxidativa da 1,4-naftoquinona com uma amina primária, utilizando etanol em refluxo

com K_2CO_3 .⁴³ Tentou-se reproduzir as mesmas condições reacionais na nossa reação de interesse (entrada 5 do Esquema 5) mas o produto desejado não foi obtido.

Testou-se a metodologia descrita por Salmon-Chemin e colaboradores, na qual empregou-se uma mistura de etanol/diclorometano (4:1) e excesso da amina (entrada 8 do Esquema 5).⁴⁶ Mais uma vez o produto de interesse não foi obtido.

Por fim, tentou-se utilizar a reação de Michael oxidativa para preparar os derivados naftoquinônicos monossustituído da 1,4-naftoquinona com os nucleófilos sulfurados 1,2-etanoditiol (**38**) e mercaptoetanol (**39**) que não puderam ser obtidos por substituição nucleofílica da 2-metoxi-1,4-naftoquinona (**32**).

Na primeira reação testada, empregou-se a 1,4-naftoquinona (**24**) e o 1,2-etanoditiol (**38**) (Esquema 6). Com a metodologia usando água como solvente e oxigênio molecular como agente oxidante (entrada 1 do Esquema 6), o material de partida foi completamente recuperado. As metodologias testadas em seguida (entrada 2-4 do Esquema 6) formaram mais uma vez uma mistura complexa de produtos e o composto desejado não pode ser isolado. Prováveis produtos que constituem esta mistura foram mostrados na Figura 37 da página 78.



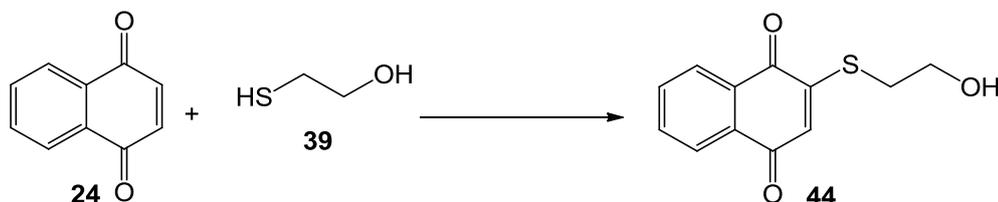
Entrada	Solvente	Temperatura	Catalisador	Produto
1	H ₂ O	50 °C	-	-
2	(CH ₃) ₂ CO	Ambiente	-	Mistura complexa
3	AcOH	75 °C	Cu(OAc) ₂ .H ₂ O	Mistura complexa
4	EtOH	75 °C	Cu(OAc) ₂ .H ₂ O	Mistura complexa

Esquema 6. Metodologias de adição oxidativa testadas para obtenção de **43**.

Com a impossibilidade de formar o produto desejado a partir da reação com o 1,2-ditioetano, foi realizada a reação com o 2-mercaptoetanol (**39**), seguindo metodologias semelhantes às descritas anteriormente (Esquema 7). Quando utilizou-se $Cu(OAc)_2.H_2O$ (entradas 2 e 3, Esquema 7), uma mistura complexa de produtos

foi formada da qual não foi possível isolar o produto desejado.

Quando utilizou-se acetona como solvente e sem catalisador, a reação terminou em aproximadamente 30 minutos. Após purificação do produto bruto por coluna cromatográfica obteve-se um sólido amarelo com 77% de rendimento.



Entrada	Solvente	Temperatura	Catalisador	Produto
1	(CH ₃) ₂ CO	Ambiente	-	44
2	AcOH	75 °C	Cu(OAc) ₂ .H ₂ O	Mistura complexa
3	EtOH	75 °C	Cu(OAc) ₂ .H ₂ O	Mistura complexa

Esquema 7. Metodologias de adição oxidativa testadas para obtenção de **44**.

O espectro de infravermelho do composto **44** inédito mostrou uma banda alargada em 3223 cm⁻¹ atribuída ao estiramento O-H, e bandas em 2923 cm⁻¹ e 2852 cm⁻¹ referentes ao estiramento das ligações C-H alifáticas. Em 1666 cm⁻¹ têm-se a banda de estiramento da ligação C=O, e em 1650 cm⁻¹ e 1588 cm⁻¹ as bandas referentes ao estiramento das ligações C=C conjugado à carbonila da naftoquinona e C=C de anel aromático, respectivamente. A banda referente ao estiramento C-OH, característica de álcoois primários foi registrada em 1121 cm⁻¹, e a ligação C-S pôde ser identificada pela banda de estiramento em 666 cm⁻¹.

O espectro de RMN de ¹H do composto **44** apresentou na região alifática (Figura 41) um singlete em 6,71 ppm referente ao hidrogênio metílico H₈ da naftoquinona, um duplo-dublete e um tripleto em 3,98 ppm e 3,10 ppm, respectivamente, atribuídos aos hidrogênios metilênicos do mercaptoetanol, sendo os ligados ao carbono vizinho a hidroxila o mais desblindado. Por fim, o singlete em 2,06 ppm corresponde ao hidrogênio da hidroxila do substituinte. A região aromática apresenta sinais característicos dos hidrogênios da naftoquinona em 8,09 e em 7,74 ppm.

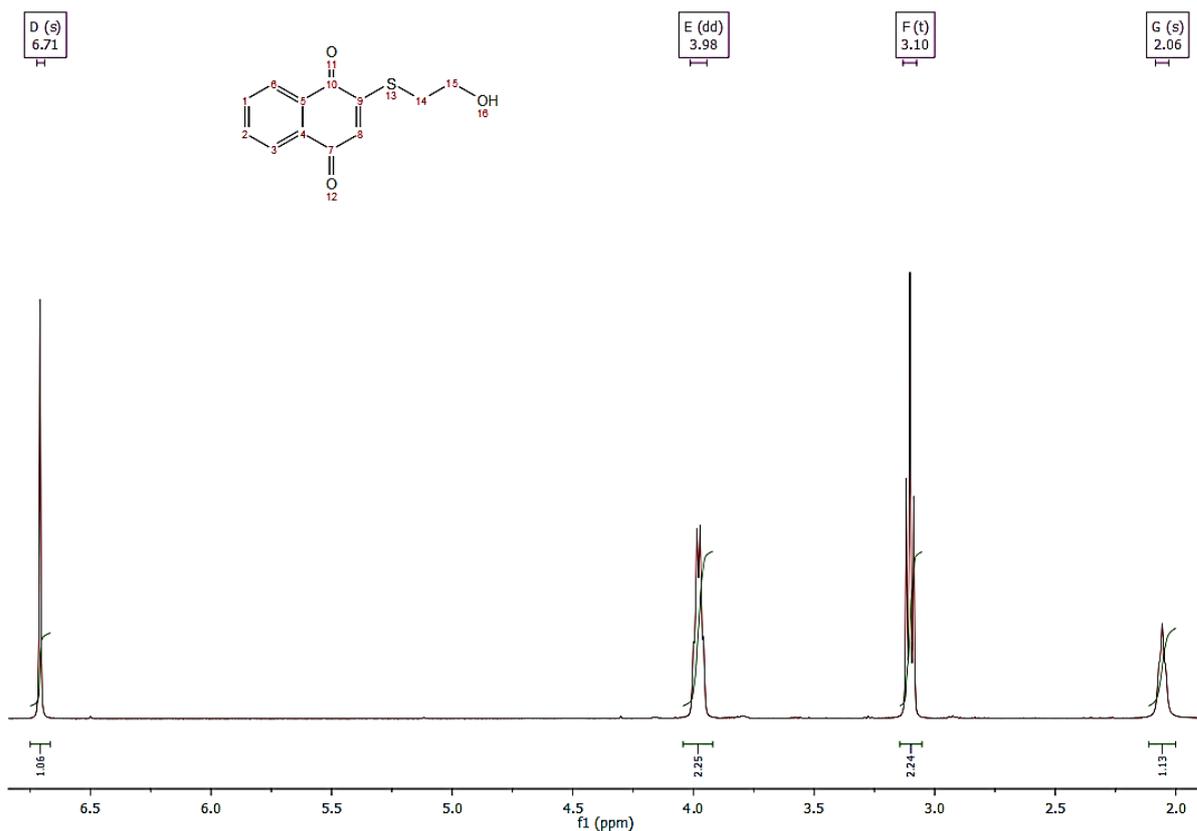


Figura 41. Expansão da região alifática do espectro de RMN de ^1H do composto **44**.

No espectro de massas foi detectado por ionização da amostra no modo positivo a presença do complexo $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3\text{S} + \text{Na}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 257.0244$ (erro = -0.28 ppm), do complexo $[2(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3\text{S}) + \text{Na}]^+$ com relação massa/carga $m/z = 491.0596$ (erro = -0.57 ppm) e índice de instauração igual a 8 ratificando a determinação estrutural do composto **44** com fórmula mínima $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3\text{S}$.

4.4 Atividade antineoplásica *in Vitro*

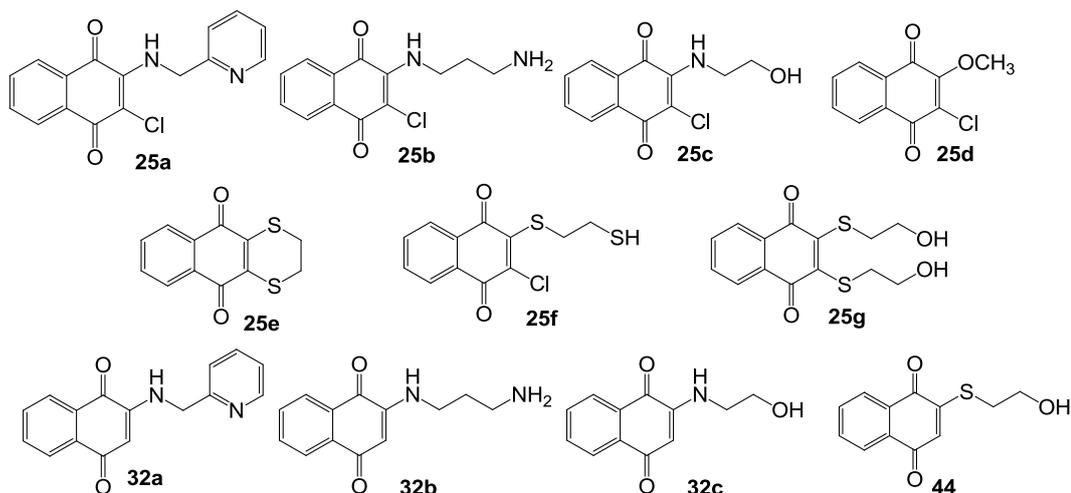
Nosso laboratório tem se esmerado ao longo dos últimos anos na síntese e avaliação anticâncer de vários derivados naftoquinona em várias linhagens de células tumorais humanas, como câncer de pulmão H460 e A549, de ovário A2780, MDA-MB-231 e leucemia promielocítica HL-60.

Neste trabalho, ensaios de citotoxicidade *in vitro* dos compostos sintetizados **25a-25g**, **32a-c** e **44** foram realizado em três linhagens de células de câncer humanos: H460 (câncer de pulmão), A2780 (carcinoma epitelial do ovário) e MDA MB-231 (câncer de mama negativo triplo) através de um ensaio colorimétrico

normalizado (MTT)⁸¹ para estimar os valores de IC₅₀, isto é, a concentração do fármaco que provoca a inibição de 50% do crescimento celular após um período de tempo pré-determinado da cultura de células exposto ao composto teste. Os valores de IC₅₀ foram obtidos através de uma curva dose-resposta. Como controle positivo dos experimentos, as linhagens de células foram tratadas com os agentes quimioterápicos rotineiramente prescritos na clínica médica, como etoposídeo e a cisplatina para o câncer de pulmão H460, doxorubicina e paclitaxel para o carcinoma epitelial de ovário A2780 e ainda a cisplatina e o paclitaxel para o câncer de mama triplo negativo MDA MB-231. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4, cujas concentrações foram expressas em concentração molar.

Tabela 4. Valores de IC₅₀ para linhagens de câncer de pulmão (H460), mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e ovário (A2780).

Composto	IC ₅₀ [M]		
	H460	MDA-MB-231	A2780
Cisplatina	8,586 x 10 ⁻⁵	-	4,01x10 ⁻⁵
Vinblastina	8,670 x 10 ⁻⁵	-	-
Etoposídeo	3,441 x 10 ⁻⁵	-	-
Doxorubicina	-	1,7 x 10 ⁻⁴	-
Paclitaxel	-	1 x 10 ⁻⁶	1,36 x 10 ⁻⁵
25a	1,960 x 10 ⁻⁴	-	3,04 x 10 ⁻⁴
25b	5,008 x 10 ⁻⁴	8,6x10 ⁻⁴	2,43 x 10 ⁻⁴
25c	1.293 x 10 ⁻⁴	2,13x10 ⁻⁵	6,29x10 ⁻⁵
25d	2.292 x 10 ⁻⁴	6,08x10 ⁻⁵	4,97x10 ⁻⁵
25e	1,861 x 10 ⁻⁴	1,1x10 ⁻³	-
25f	3,048 x 10 ⁻⁵	1,3x10 ⁻⁴	3,38 x 10 ⁻⁵
25g	4,410 x 10 ⁻⁵	4,28x10 ⁻⁵	2,68 x 10 ⁻⁶
32a	7,595 x 10 ⁻⁴	9,4x10 ⁻⁴	2,77 x 10 ⁻⁵
32b	6,635 x 10 ⁻⁴	7,8x10 ⁻⁴	1,91 x 10 ⁻⁵
32c	2.334 x 10 ⁻⁴	-	-
44	4.24 x 10 ⁻⁶	1,603x10 ⁻⁵	3,89x10 ⁻⁶



A partir destes dados, pôde-se observar que o composto inédito **44** foi aproximadamente dez vezes mais potente do que o etoposídeo, fármaco de controle mais potente para o câncer de pulmão H460. Já os compostos **25f** e **25g** apresentaram atividades citotóxicas semelhantes aos controles. Assim, a relação estrutura atividade dos compostos sintetizados para esta linhagem de célula mostra que é importante a presença de substituintes contendo átomo de enxofre no carbono C₂ do núcleo naftoquinônico e que a substituição do carbono C₃ é menos importante, visto que o compostos **44**, mais ativo, possui um átomo de hidrogênio nesta posição. É possível que este carbono esteja funcionando como aceptor de Michael na adição nucleofílica do átomo de nitrogênio N₇ da guanina do DNA (Figura 42), além dos prováveis mecanismos de ação, como por exemplo, geração de ROS, inibição de *topoisomerase* e intercalação com o DNA, característicos de compostos naftoquinônicos.

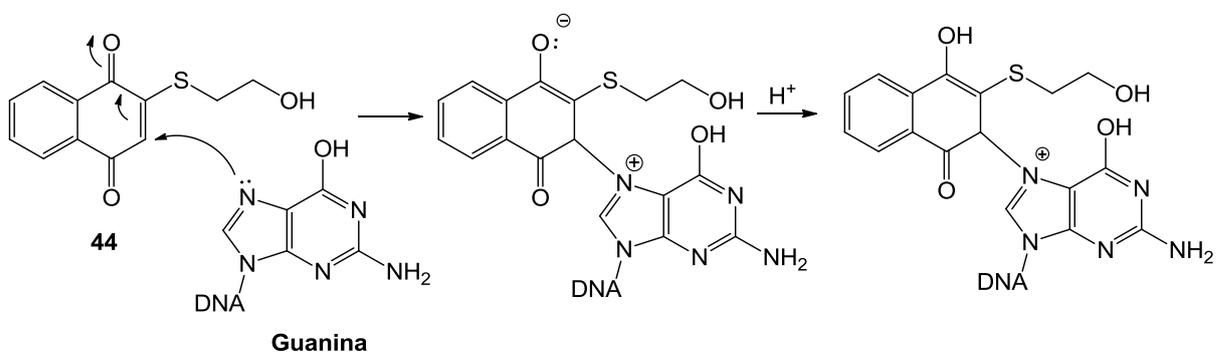


Figura 42. Proposta mecânica para a alquilação da guanina do DNA.

A consequência da alquilação do DNA é a alteração do pareamento normal das bases do DNA entre adenina-timina e guanina-citosina (pares de bases Watson-Crick).⁸² Por exemplo, as três ligações de hidrogênio normalmente presentes na interação entre a guanina e a citosina requerem a existência de um grupo carbonila na posição purina C₆ (Figura 43). Devido a alquilação do átomo de nitrogênio N₇ da guanina, é criada uma carga positiva neste centro, que está adjacente a carga parcial positiva no carbono C₆ devido a deficiência de elétrons do carbono da carbonila, deslocando o equilíbrio tautomérico da guanina para a forma mais estável contendo uma hidroxila na posição 6. Esta mudança na forma tautomérica converte os grupos aceptores de ligação de hidrogênio em doadores e vice-versa. Esta alteração provoca um enfraquecimento na interação entre a guanina e a citosina, pois, agora somente duas ligações de hidrogênio são estabelecidas entre essas bases. De forma oposta, o pareamento entre a forma 6-hidroxi da guanina com a timina leva a um complexo mais estável (três ligações de hidrogênio) e por isso, ocorre uma alteração no pareamento normal levando a mutação guanina timina.

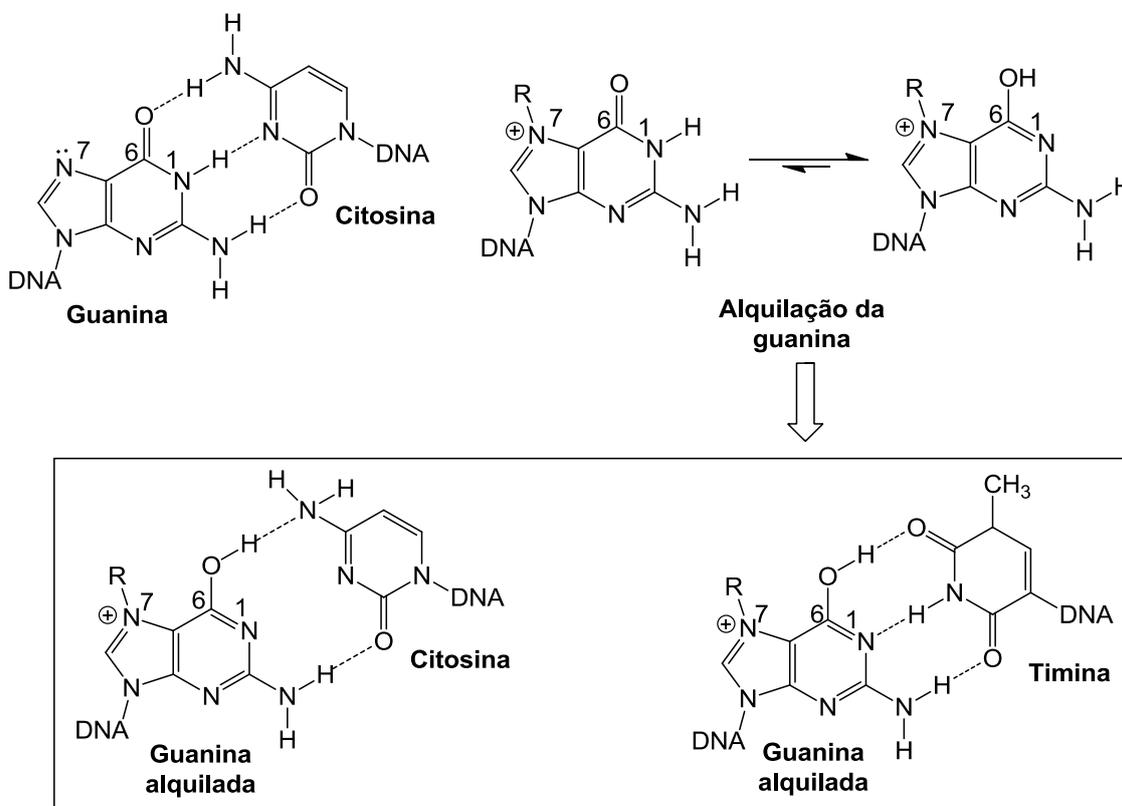


Figura 43. Alteração do pareamento das bases nitrogenadas do DNA após alquilação.

Finalmente, a atividade *in vitro* do composto **44** nesta linhagem de câncer sugere que ele pode vir a ser uma alternativa mais eficiente para a estratégia terapêutica no combate ao câncer de pulmão, uma doença com alta taxa de mortalidade.

Para a linhagem de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB 231), todos os compostos sintetizados foram menos eficientes do que o paclitaxel, no entanto, mais uma vez o composto **44** foi o mais potente dentre eles. Deve-se notar também que o composto **25c**, contendo nitrogênio da etanolamina na posição C₂ da naftoquinona, teve a segunda maior atividade entre os compostos sintetizados. Estas observações são de interesse clínico notável, pois, o câncer de mama triplo negativo ainda desafia a Medicina devido às baixas taxas de sobrevida global. Isto é causado, em parte, pela recidiva de clones resistentes, apesar da resposta inicial à quimioterapia ser satisfatória, conduzindo assim a um baixo índice de sobrevivência.

A triagem *in vitro* para o cancer de ovário (A2780) mostrou que o composto inédito **44** e também **25g** foram dez vezes mais potentes do que o paclitaxel e a cisplatina. Os derivados naftoquinônicos sintéticos nitrogenados **32a** e **32b** que é inédito exibiram atividades semelhantes ao paclitaxel e maior do que a cisplatina. Em geral, e como já mencionado, estes resultados também são de grande interesse clínico, pois, as células de câncer de ovário são refratárias ou adquirem fenótipo de resistência aos quimioterápicos usados na clínica médica, sendo por isso, a sua segunda causa mais frequente de mortes relacionadas ao câncer ginecológico no mundo.

Em geral, pôde-se notar que os compostos com grupos alquílicos alifáticos contendo um átomo de enxofre no átomo de carbono C₂ do núcleo da naftoquinona, são mais potentes no tratamento das linhagens de câncer humana testadas do que aqueles contendo átomos de nitrogênio. Outro ponto a salientar é que os compostos mais ativos contendo substituintes sulfurados na posição C₂ do núcleo da naftoquinona possuem os grupamentos -OH ou -SH terminais na cadeia alquílica. Quanto à substituição do carbono C₃ acredita-se que ela diminua a atividade biológica frente às linhagens de células testadas, visto que, o composto **44**, mais ativo, não possui substituinte nesta posição. Ainda assim, outros compostos contendo diferentes substituintes nesta posição, como por exemplo, o **25c**, **25f** e **25g** apresentaram atividades relevantes dificultando qualquer conclusão acerca da natureza ideal do substituinte para esta posição.

4.5 Estudos de *Docking*

Estudos de docking foram conduzidos, a fim de analisar a conformação e a energia de interação entre os compostos mais ativos **25c**, **25f**, **25g** e **44**, e possíveis alvos terapêuticos descritos na literatura,⁸³⁻⁸⁹ como as enzimas *PI3K* e *topoisomerase II* através do software AutoDock Vina.⁶⁷

A estrutura cristalina da *PI3K* e *topoisomerase II* foram obtidas no Protein Data Bank (PDB) com códigos 1E7U (estrutura elucidada por difração de raios-X com resolução de 2.00 Å) e 1QZR (estrutura elucidada por difração de raios-X com resolução de 1.90 Å), respectivamente (Figura 44).

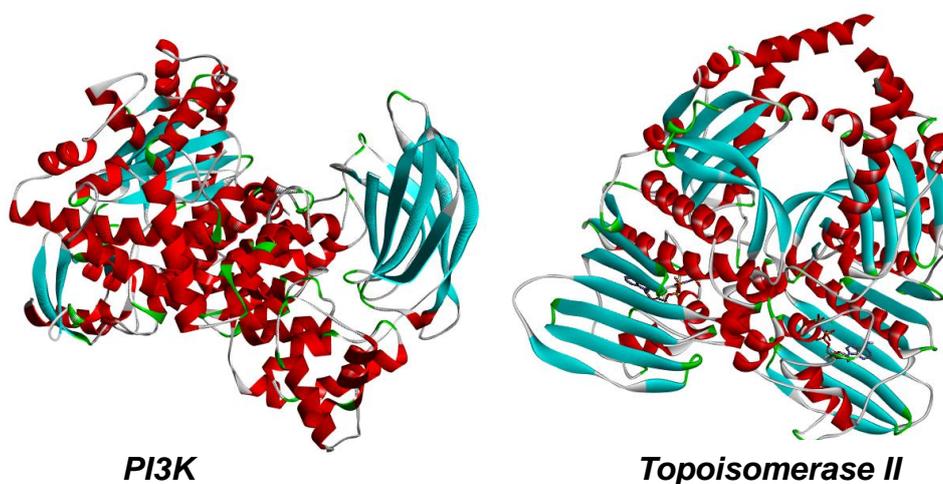


Figura 44. Estrutura cristalina das enzimas *PI3K* (1E7U) e *topoisomerase II* (1QZR).

Inicialmente as proteínas *PI3K* e *topoisomerase II* e os seus respectivos ligantes Wortmannin e Dexrazoxano, foram preparados de acordo com o protocolo descrito na literature.⁶⁷ Em seguida, caixas com dimensões 18x10x12Å e coordenadas $x = 23.426$, $y = 62.986$ and $z = 20.716$, para *PI3K*, e $x = 28.166$, $y = 33.408$ and $z = 32.263$, para *topoisomerase II*, ambas centrada no ligante, foram construídas para cobrir inteiramente o sítio ativo das enzimas supracitadas. Imediatamente após, os ligantes cristalográficos foram redocados com os respectivos receptores a fim de validar a eficiência dos cálculos de *docking* (Figura 45).

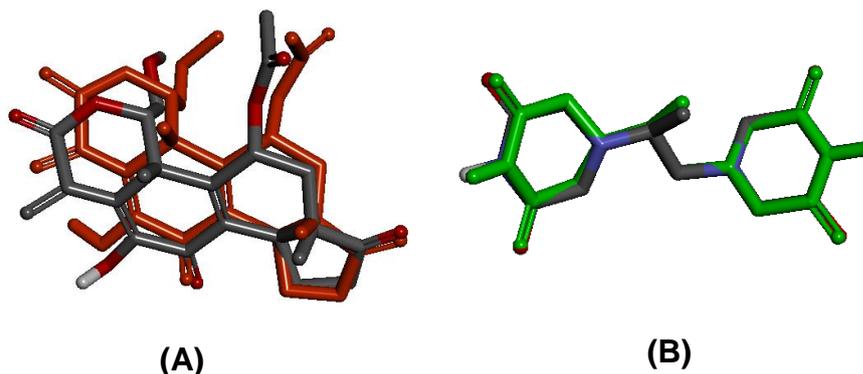


Figura 45. Ligantes cristalográficos (Cinza) e estruturas redocadas. (A - Vermelho) Wortmannin (1E7U – KWT: PDB); (B - Verde) Dexrazoxano (1QZR – CDX: PDB).

É importante destacar que a estrutura química dos ligantes cristalográficos foram totalmente otimizados usando o método semi-empírico PM3 contido no pacote de cálculos de orbitais moleculares do *software* Gaussian03.⁸⁰

Depois, o fármaco controle etoposídeo, conhecido inibidor de *topoisomerase II*, e o composto LY294002, descrito na literatura como sendo inibidor de *PI3K*, foram sobrepostos aos sítios de ligação das respectivas enzimas usando o mesmo método descrito para os ligantes cristalográficos.⁸⁴⁻⁸⁶ Como resultado, após a sobreposição destes compostos ao sítio ativo das proteínas, as energias de interação ligante/receptor foram obtidas (Tabela 5). Da mesma forma, as estruturas químicas destes fármacos foram completamente otimizadas usando a mesma metodologia descrita anteriormente. O mesmo procedimento de otimização estrutural e de ancoragem molecular foram utilizados para os derivados naftoquinônicos **25c**, **25f**, **25g** e **44**.

Tabela 5. Energias de interação ligante/receptor entre os compostos **25c**, **25f**, **25g**, **44**, etoposídeo, LY294002 e as proteínas *PI3K γ* e *Topoisomerase II*.

Composto	Energia de Interação (Kcal/mol)	
	<i>PI3Kγ</i>	<i>Topoisomerase II</i>
Etoposide	-	-5.5
LY294002	-9,0	-
25c	-6.9	-5.1
25f	-6.5	-5.0
25g	-6.4	-4.6
44	-6.8	-4.8

A comparação dos valores de energia de interação dos fármacos controle com

os seus respectivos alvos terapêuticos e com os obtidos para os compostos sintéticos descritos na Tabela 5, indicam que o mecanismo de ação antineoplásica desses derivados naftoquinônicos, possivelmente, não ocorre pela via de inibição da enzima *PI3K* e ainda que a inibição da enzima *topoisomerase II* é um possível e provável alvo terapêutico, conforme amplamente descrito na literatura. No entanto, investigações experimentais mais detalhadas estão sendo realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Letícia Batista Azevedo Rangel para elucidar o mecanismo de ação dessas substâncias.

O estudo de *docking* do composto LY294002 no sítio ativo da enzima *PI3K* mostrou que as interações de van der Waals (em verde), como por exemplo, com o resíduo de aminoácido isoleucina 963, são predominantes, conforme descrito na Figura 46 obtida pelo *software* DS Visualizer 3.1.

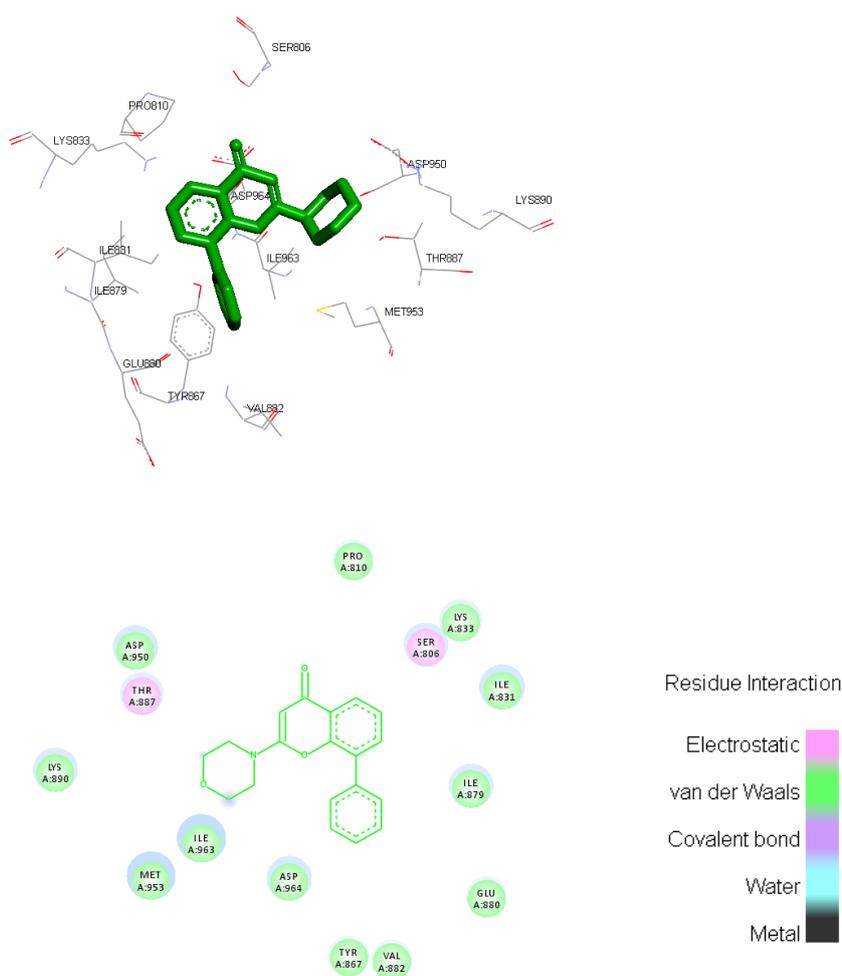
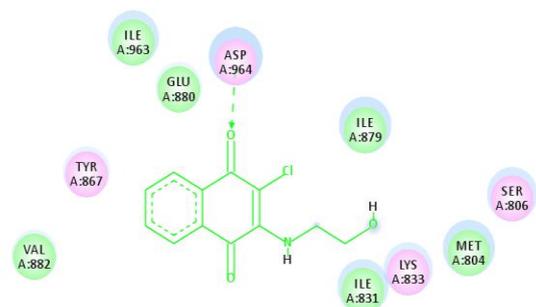
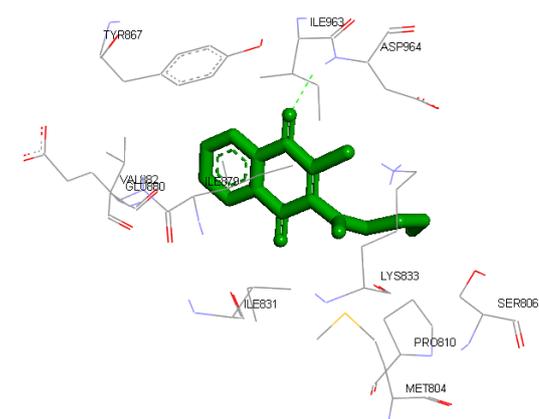
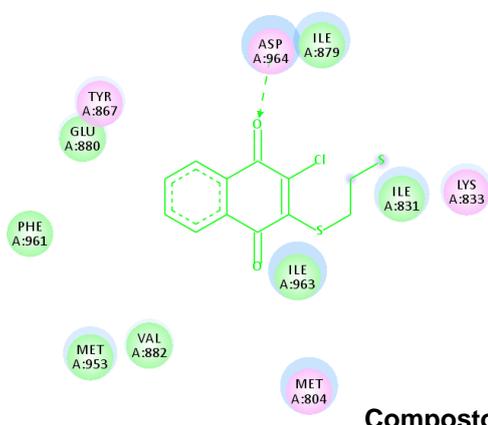
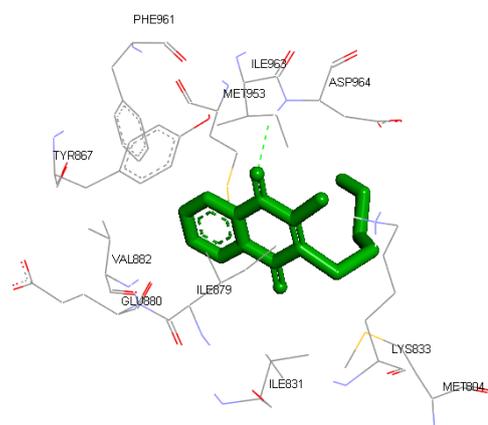


Figura 46. Conformação farmacofórica do LY294002 (verde) com o sítio ativo da enzima *PI3K*.

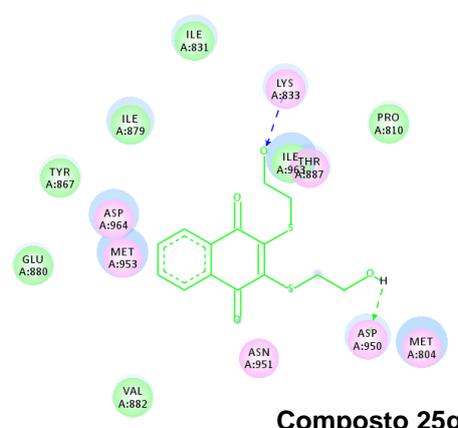
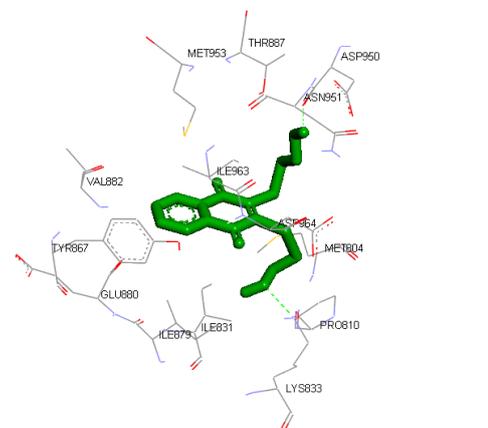
Nos derivados naftoquinônicos sintéticos **25c**, **25f**, e **44** pode-se destacar a interação eletrostática entre a carbonila no núcleo naftoquinônico e o resíduo de aminoácido asparagina 964 da proteína *PI3K* (Figura 47) Outra interação importante é a existente entre os grupos -SH e -OH terminais dos substituintes no carbono C₂ do núcleo da naftoquinona com diferentes resíduos de aminoácidos, como por exemplo, a interação eletrostática com a lisina 833 no composto **25c** e as ligações de hidrogênio com a asparagina 950 e lisina 833 nos derivado **25g** e **44**, respectivamente. As demais interações representativas destes compostos são interações de van der Waals (verde) com diferentes resíduos de aminoácidos.



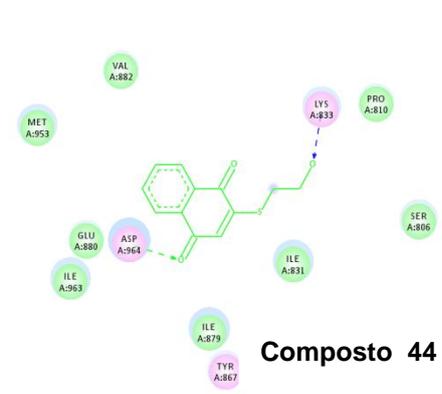
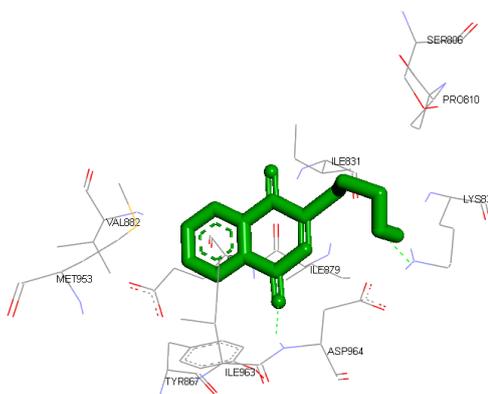
Composto 25c



Composto 25f



Composto 25g



Composto 44

Figura 47. Interações do complexo *PI3K* e os ligantes 25c, 25f, 25g e 44.

A ancoragem molecular do etoposídeo no sítio ativo da enzima *topoisomerase II* apresentou uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila e a glicina 365, interações eletrostáticas com a glicina 17, treonina 27 e tirosina 28 além da interação de van der Waals com a tirosina 144 conforme mostra a Figura 48.

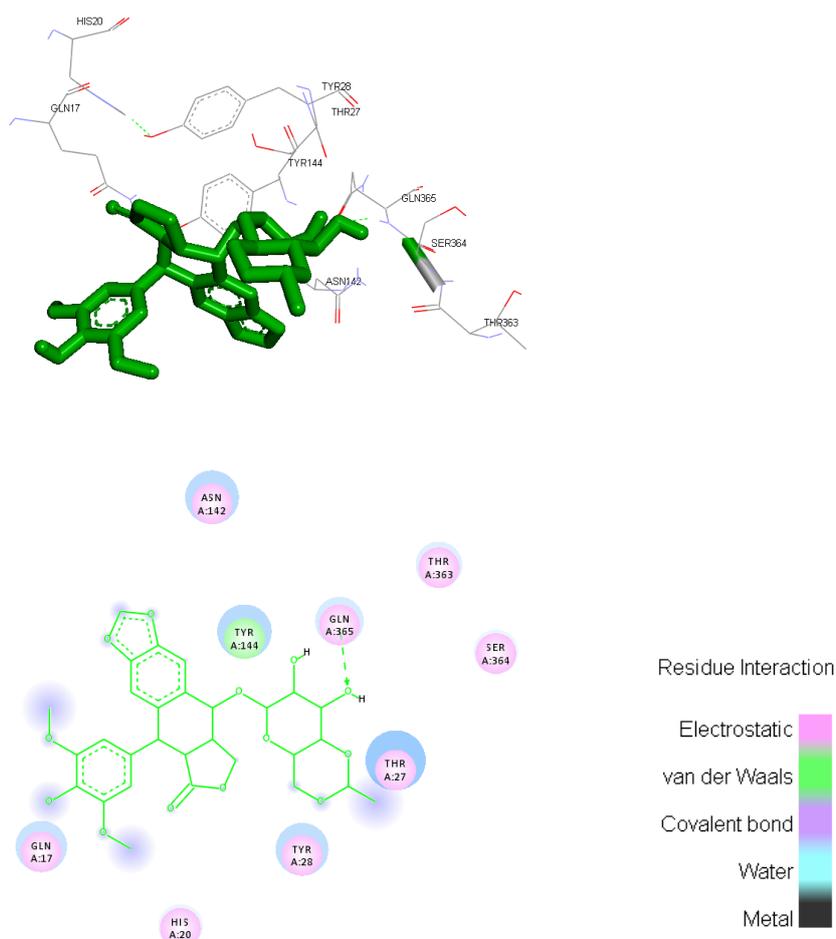


Figura 48. Conformação farmacofórica do etoposídeo (verde) com o sítio ativo da enzima *topoisomerase II*.

Os derivados naftoquinônicos sintéticos apresentam, de uma maneira geral, interações semelhantes aos apresentados no estudo de *docking* para o etoposídeo, onde os principais resíduos de aminoácidos responsáveis por esta interação foram glicina 365, glicina 17, treonina 27, tirosina 28 e tirosina 144 (Figura 49). Esta similaridade provavelmente reflete as energias de interação semelhantes entre os derivados naftoquinônicos sintéticos e o etoposídeo quando o alvo terapêutico é a *topoisomerase II*.

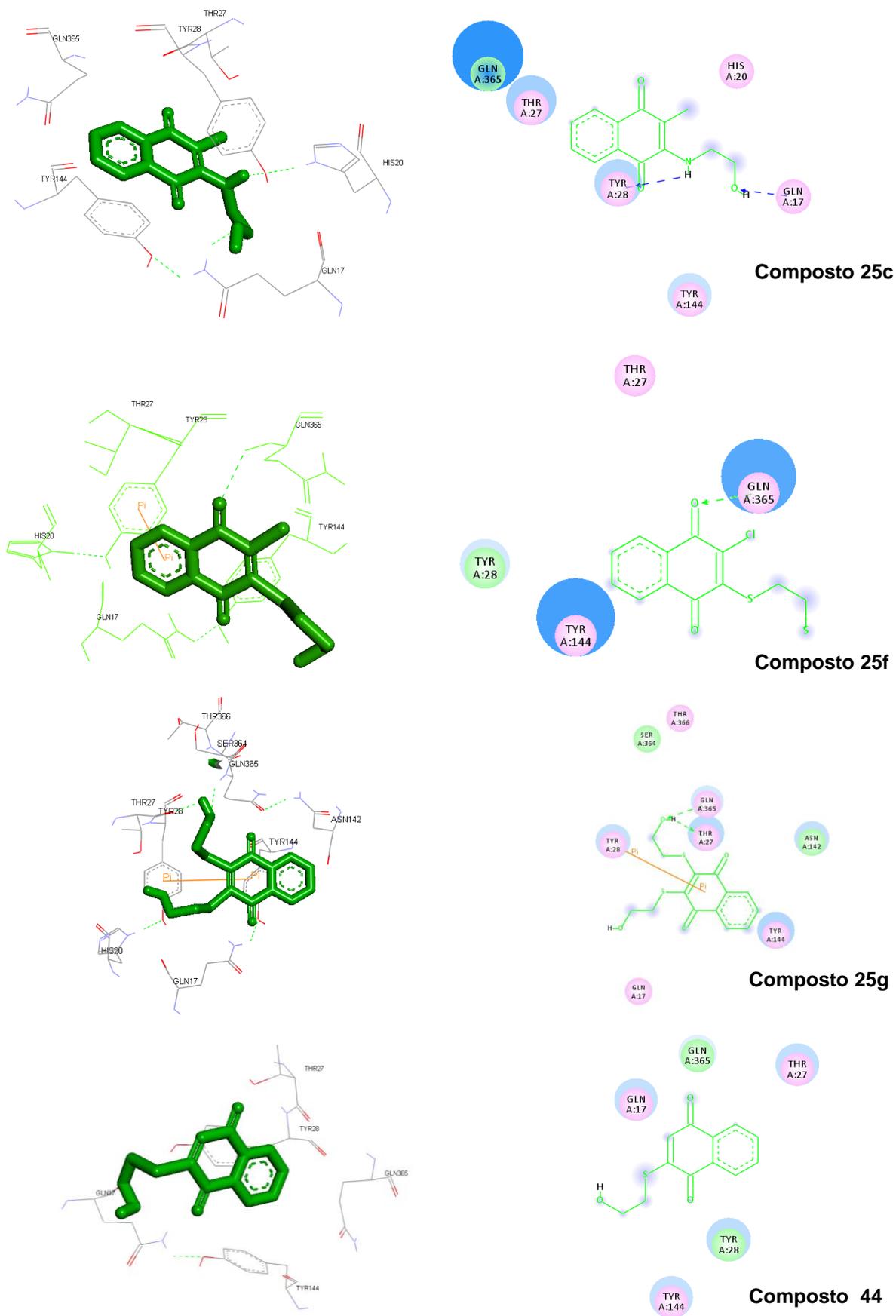


Figura 49. Interações do complexo *topoisomerase II* e os ligantes 25c, 25f, 25g e 44.

O composto **25c** mostrou duas ligações de hidrogênio importantes com os grupos amino e hidroxila da cadeia lateral do substituinte (etanolamina) com os resíduos de aminoácidos tirosina 28 e glicina 17 e também uma interação eletrostática com a treonina 27.

Os derivados naftoquinônicos sintéticos **25f** e **25g** apresentaram as mesmas ligações de hidrogênio descritas para o etoposídeo com o resíduo de aminoácido glicina 365. Entretanto, o grupamento responsável por esta interação no composto **25f** foi a carbonila do núcleo naftoquinônico e em **25g** foi a hidroxila terminal do substituinte mercaptoetanol. Além destas interações o composto **25g** descreveu uma interação eletrostática com o aminoácido treonina 27 semelhante ao etoposídeo.

Por último, o derivado naftoquinônico **44** mostrou duas interações eletrostáticas com os resíduos de aminoácidos glicina 17 e tirosina 144. Destacaram-se também as interações de van der Waals com a glicina 365 e tirosina 28.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram descritas novas metodologias para a síntese de onze derivados 1,4-naftoquinônicos (**25a-g**, **32a-c** e **44**) contendo substituintes nitrogenados, oxigenados e sulfurados nas posições C₂ e/ou C₃, em rendimentos variando de 52 a 89%. A partir da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona, 2-metóxi-1,4-naftoquinona e a 1,4-naftoquinona.

Tentativas de se obter o produto de dissustituição a partir da 2,3-dicloro-1,4-naftoquina foram realizadas utilizando diversas metodologias que auxiliassem a substituição do segundo átomo de cloro, entretanto, apenas a reação com 2-mercaptoetanol foi eficiente.

Os compostos **25f** e **44**, **25c** e **44**, e **25g** e **44** apresentaram uma significativa atividade anticâncer *in vitro* para as linhagens de câncer de pulmão H460, mama triplo-negativos MDA-MB-231 e ovário A2780, respectivamente, demonstrando um grande potencial como compostos protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos.

A relação estrutura/atividade dos derivados naftoquinônico mostrou que os substituintes que contêm um átomo de enxofre ligado ao carbono C₂ do núcleo naftoquinônico, assim como grupos polares terminais como hidroxila e tiol na cadeia do substituinte apresentam as maiores atividades biológicas.

Os estudos de *docking* mostraram que um possível alvo terapêutico das substâncias sintetizadas é a enzima *topoisomerase II*, resultado das interações estabilizadoras observadas no complexo enzima/ligante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OLIVEIRA, R. B; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Quím. Nova*, **25**, 976-984, 2002.
2. Cancer. Disponível em <http://www.who.int/cancer/en/index.html>. Acessado em 24 de Julho de 2013.
3. Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em www.inca.gov.br. Acessado em 24 de Julho de 2013.
4. ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. *Quim. Nova*, **28**, 118-129, 2005.
5. WONG, E.; GIANDOMENICO C.M. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chem. Rev.* **99**, 2451-2466, 1999.
6. KILPIN, K.J. E DYSON, P.J. Enzyme inhibition by metal complexes: concepts, strategies and applications. *Chem. Sci.* **4**, 1410-1419, 2013.
7. MARTINEZ, M. J. A.; BENITO, P. B.; Biological activity of quinones. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **30**, 303-366, 2005.
8. KISHIKAWA, N.; KURODA, N. Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. In press.
9. SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas com ênfase na b-lapachona e derivados. *Quim. Nova*. **26**, 407-416, 2003.
10. NICULESCU, V. C.; MURESAN, N.; SALAGEANU, A.; TUCUREANU, C.; MRINESCU, G.; CHIRIGIU, L.; LEPADATU, C. Novel 2,3-disubstituted 1,4-naphthoquinone derivatives and their metal complexes – Synthesis and in vitro cytotoxic effect against mouse fibrosarcoma L929 cells. *J. Organom. Chem.* **700**, 13-19, 2012, e referências citadas.
11. LIU, K. C.; LI, J. Synthetic approaches to the 2003 new drugs. *Mini-Rev. Med. Chem.* **4**, 1105-1125, 2004.
12. BARBOSA, T. P.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; MARTINS, R. M.; PINTO, A. C; VARGAS, M. D. New 1,2,3,4-tetrahydro-1-aza-anthraquinones and 2-aminoalkyl compounds from norlapachol with molluscicidal activity. *Bioorg. Med. Chem.* **13**,

6464-6469, 2005

13. TEIXEIRA, M. J.; ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA FILHA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA JR., J. R. C.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytother. Res.* **15**, 44-48, 2001.
14. ALMEIDA, E. R.; SILVA-FILHO, A. A. A.; SANTOS, E. R.; LOPES, C. A. J. Antiinflammatory action of lapachol. *Ethnopharmacol.* **29**, 239-241, 1990.
15. GAFNIER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry.* **42**, 1315-1320, 1996.
16. MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from *Tabebuia* and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study. *J. Braz. Chem. Soc.* **12**, 325-338, 2001,
17. ZANI, C. L.; CHIARI, E.; KRETTLI, A. U.; MURTA, S. M. F.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; ROMANHA, A. J. Anti-plasmodial and anti-trypanosomal activity of synthetic naphtho[2,3-b]thiopen-4,9-quinones. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 2185-2192, 1997.
18. AVENDANO, C.; MENENDEZ, C. J. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. 1^a Ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.
19. ASCHE, C. Antitumor quinones. *Mini-Rev. Med. Chem.* **5**, 449-467, 2005.
20. GEWIRTZ, D. A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 727-741, 1999.
21. NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature.* **9**, 338-350, 2009.
22. DURR, F. E.; WALLACE, R. E.; CITARELLA, R. V. Molecular and biochemical pharmacology of mitoxantrone. *Cancer Treat. Rev.* **10**, 3-11, 1983.
23. FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Rev. Virtual Quim.* **2**, 140-160, 2010.
24. BOOTHMAN, D. A., TRASK, D. K.; PARDEE, A. B. Inhibition of Potentially Lethal DNA Damage Repair in Human Tumor Cells by β -Lapachone, an Activator of Topoisomerase I. *Cancer Res.* **49**, 605-612, 1989.

25. LIS, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B.; B-Lapachone, a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor with a Mode of Action Different from Camptothecin. *J. Biol. Chem.* **268**, 22463-22468, 1993.
26. BAILLY, C. Topoisomerase I Poisons and Suppressors as Anticancer Drugs. *Curr. Med. Chem.* **7**, 39-58, 2000.
27. KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase II Inhibition by Pyranonaphthoquinone Derivatives— Eleutherin, a Lapachone, and b Lapachone. *Biochem Pharmacol.* **60**, 1367-1379, 2000.
28. TÁRKÁNYI, I.; ARADI, J. Pharmacological intervention strategies for affecting telomerase activity: Future prospects to treat cancer and degenerative disease. *Biochimie.* **90**, 156-172, 2008.
29. SHARP, S.Y.; JONES, K.; WORKMAN, P. Cancer Drug Design and Discovery - HSP90 inhibitors: targeting the cancer chaperone for combinatorial blockade of oncogenic pathways. Londres : Academic Press, 2008. 305-335.
30. COLLINS, I.; WORKMAN, P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *nature.* **12**, 689-700, 2006.
31. WHITESELL, L.; LINDQUIST, S.L. Hsp90 and the chaperoning of cancer. *Nature review.* **5**, 761-772, 2005.
32. DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Res.* **38**, 2628-2635, 1978.
33. KOREN, H.; SCHENK, G. M.; JINDRA, R. H.; ALTH, G.; EBERMANN, R.; KUBIN, A. Hypericin in phototherapy . *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* **36**, 113-119, 1996.
34. AGOSTINISA, P.; VANTIEGHEM, A.; MERLEVEDE, W.; DE WITTE, P. A. M. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 221-241, 2002.
35. DUSRE, L.; COVEY, J. M.; COLLINS, C.; SINHA, B. K. DNA damage, cytotoxicity and free radical formation by mitomycin c in human cells. *Chem. Biol. Interactions.* **71**, 63-78, 1989.
36. MANUEL, M. M. Reductive Activation of Mitomycin C by Thiols: Kinetics, Mechanism, and Biological Implications. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1663–1668, 2009.
37. BASS, F. D.; GUBLER, D. A.; JUDD, T. C.; WILLIAMS, R. M. Mitomycinoid Alkaloids: Mechanism of Action, Biosynthesis, Total Syntheses, and Synthetic

Approaches. *Chem. Rev.* 2013. In press.

38. MANUEL, M. M.; DAS, A.; TOMASZ, M. Mitomycin C Linked to DNA Minor Groove Binding Agents: Synthesis, Reductive Activation, DNA Binding and Cross-Linking Properties and In Vitro Antitumor Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2913-2726, 1999.

39. O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem.Biol. Interactions.* **80**, 1-41, 1991.

40. POWIS, G. Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents. *Pharmac. Ther.* **35**, 57-162, 1987.

41. KOMIYAMA, K.; KIKUCHI, T.; SUGIURA, Y. Generation of hydroxyl radical by anticancer quinone drugs, carbazilquinone, mitomycin c, aclacinomycin a and adriamycin, in the presence of nadph-cytochrome p-450 reductase. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3651-3656, 1982.

42. KAPPUS, H. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochemical Pharmacology.* **35**, 1-6, 1986.

43. TANDON, V. K.; MAURYA, H. K.; MISHRA, N. N.; SHUKLA, P. K. Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 3130-3137, 2009.

44. TANDON, V. K.; MAURYA, H. K.; MISHRA, N. N.; SHUKLA, P. K. Micelles catalyzed chemoselective synthesis 'in water' and biological evaluation of oxygen containing hetero-1,4-naphthoquinones as potential antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 6398-6403, 2011.

45. TANDON, V. K.; YADAV, D. B.; SINGH, R. V.; VAISH, M.; CHATURVEDI, A. K.; SHUKLA, P. K. Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antibacterial and antiviral agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 3463-3466, 2005.

46. SALMON-CHEMIN, L.; BUISINE, E.; YARDLEY, V.; KOHLER, S.; DEBREU, M. A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DAVIOUD-CHARVET, E. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **44**, 548-565, 2001.

47. SARHAN, A. E. A. O.; EL-DEAN, A. M. K.; ABDEL-MONEM, M. I. Chemoselective

- Reactions of 2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone. *Monatsh. Chem.* **129**, 205-212, 1998.
48. TANDON, K. V.; MAURYA, H. K. 'On water': unprecedented nucleophilic substitution and addition reactions with 1,4-quinones in aqueous suspension. *Tetrahedron Lett.* **50**, 5896-5902, 2009.
49. TANDON, V. K.; MAURYA, H. K.; VERMA, M. K.; KUMAR, R.; SHUKLA, P. K. 'On water' assisted synthesis and biological evaluation of nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 2418-2426, 2010.
50. BENITES, J.; VALDERRAMA, J. A.; BETTEGA, K.; PEDROSA, R. C.; CALDERON, P. B.; VERRAX, J. Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 6052-6057, 2010.
51. TANDON, V. K.; MAURYA, H. K.; TRIPATHI, A.; SHIVAKESHA, G.B.; SHUKLA, P. K.; SRIVASTAVA, P.; PANDA, D. 2,3-Disubstituted-1,4-naphthoquinones, 12H-benzo[b]phenothiazine-6,11-diones and related compounds: Synthesis and Biological evaluation as potential antiproliferative and antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 1086-1092, 2009.
52. LEE, D.; KO, J. H.; LEE, K. Cesium Carbonate-Mediated Reaction of Dichloronaphthoquinone Derivatives with O-Nucleophiles. *Monatsh. Chem.* **138**, 741-746, 2007.
53. IBIS, C.; TUYUN, A. F.; OZSOY-GUNES, Z.; BAHAR, H.; STASEVYCH, M. V.; MUSYANOVYCH, R. Y.; KOMAROVSKA-POROKHNYAVETS, O.; NOVIKOV, V. Synthesis and biological evaluation of novel nitrogen- and sulfur-containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 5861-5867, 2011.
54. WIN, T.; BITTNER, S. Novel 2-amino-3-(2,4-dinitrophenylamino) derivatives of 1,4-naphthoquinone. *Tetrahedron Letters.* **46**, 3229-3231, 2005.
55. GONELLI, A.; MISCHIATI, C.; GUERRINI, R.; VOLTAN, R.; SALVADORI, S.; ZAULI, G. Perspectives of Protein Kinase C (PKC) Inhibitors as Anti-Cancer Agents *Mini-rev. Med. Chem.* **9**, 498-509, 2009.
56. BRUN, M. P.; BRAUD, E.; ANGOTTI, D.; MONDÉSERT, O.; QUARANTA, M.; MONTES, M.; MITEVA, M.; GRESH, N.; DUCOMMUN, B.; GARBAY, C. Design, synthesis, and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives with CDC25 phosphatase inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 4871-4879, 2005.

57. HUANG, S. T.; KUO, H. S.; HSIAO, C. L.; LIN, Y. L. Efficient synthesis of 'redox-switched' naphthoquinone thiol-crown ethers and their biological activity evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1947-1952, 2002.
58. TANDON, V. K.; CHHOR, R. B.; SINGH, R. V.; RAI, S.; YADAV, D. B. Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1079-1083, 2004.
59. SAYIL, C.; IBIS, C. Synthesis and Spectral Properties of Novel Thionaphthoquinone Dyes. *Bull. Korean Chem. Soc.* **31**, 1233-1236, 2012.
60. AGARWAL, N. L.; SCHAEFER, W. Quinone chemistry. Reaction of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone with arylamines in pyridine. *J. Org. Chem.* **45**, 5139-5143, 1980.
61. VANALLAN, J. A.; REYNOLDS, G. A. Polynuclear Heterocycles. VI. The Reaction of 2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone with Aromatic Amines. *J. Org. Chem.* **28**, 1019-1022, 1963.
62. WANG, X. L.; ZHENG, X. F.; LIU, R. H.; REINER, J.; CHANG, J. B. Synthesis of novel substituted naphthoquino[b]-benzo[e][1,4]diazepines via Pictet–Spengler cyclization. *Tetrahedron.* **63**, 3389-3394, 2007.
63. LISBOA, C. S.; SANTOS, V. G.; VAZ, B. G.; LUCAS, N. C.; EBERLIN, M. N.; GARDEN, S. J. C–H Functionalization of 1,4-Naphthoquinone by Oxidative Coupling with Anilines in the Presence of a Catalytic Quantity of Copper(II) Acetate. *J. Org. Chem.* **76**, 5264-5273, 2011.
64. THOMSON, R. H. Studies in the juglone series. I. Some halogen derivatives and their reaction with aniline. *J. Org. Chem.* **13**, 377-383, 1948.
65. PANICHAYUPAKARANANT, P.; REANMONGKO, W. Evaluation of chemical stability and skin irritation of lawsone methyl ether in oral base. *Pharm. Biol.* **40**, 429-432, 2002.
66. GOTTLIEB, H.E., KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **62**, 7512-7515, 1997.
67. TROTT, O. E OLSON, A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and Multithreading *J. Comput. Chem.* **31**, 455, 2010.
68. MADHUPRIYA, S.; ELANGO, K. P. Highly selective colorimetric sensing of Cu(II) ions in aqueous solution via modulation of intramolecular charge transfer transition of aminonaphthoquinone chemosensor. *Spectrochim Acta A.* **97**, 100-104, 2012.

69. SARHAN, A. E. A. O.; EL-DEAN, A. M. K.; ABDEL-MONEM, M. I. Chemoselective Reactions of 2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone. *Monatsh Chem.* **129**, 205-212, 1998.
70. JALI, B. R.; MASUD, K.; BARUAH, J.B. Selectivity in changes of fluorescence emission of 1,4-naphthoquinone derivatives by manganese and cadmium ion. *Polyhedron.* **51**, 75-81, 2013.
71. BOUFFIER, L.; LISTER, K. E.; HIGGINS, S. J.; NICHOLS, R. J.; DONEUX, TH. Electrochemical investigations of dissolved and surface immobilised 2-amino-1,4-naphthoquinone in aqueous solutions. *J. Electroanal. Chem.* **664**, 80-87, 2012.
72. MARTINEZ, S. T.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C.; FERREIRA, V. F.; SILVA, F. C. Adição de anilinas à naftoquinona em água e em fase sólida. *Quim. Nova.* **35**, 858-860, 2012.
73. LAM, T. M.; LEE, C.; KATARDJIEFF, K.; OTSUKI, T. Novel epoxide formation in the reaction of 2-bromo-3-methyl-1,4-naphthoquinone with 1,3-propanedithiol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 7226–7229, 2010.
74. PRATT, Y. T. Quinolinequinones. VI. Reactions with Aromatic Amines. *J. Org. Chem.* **27**, 3905-3910, 1962.
75. YOSHIDA, K.; ISHIGURO, M.; HONDA, H.; YAMAMOTO, M.; KUBO, Y. Regioselective 6-Amination and 6-Arylation of 5,8-Quinolinedione Promoted by Metal Ions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **61**, 4335-4340, 1988.
76. AGUILAR-MARTÍNEZ, M.; CUEVAS, G.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; GONZÁLEZ, I.; LOTINA-HENNSEN, B.; MACÍAS-RUVALCABA, N. An Experimental and Theoretical Study of the Substituent Effects on the Redox Properties of 2-[(R-phenyl)amine]-1,4-naphthalenediones in Acetonitrile. *J. Org. Chem.* **64**, 3684-3694, 1999.
77. LIU, B.; JI, S. J. Facile Synthesis of 2-Amino-1,4-naphthoquinones catalyzed by Molecular Iodine under Ultrasonic Irradiation. *Synth. Commun.* **38**, 1201-1211, 2008.
78. MACHOCHO, A. K.; WIN, T.; GRINBERG, S.; BITTNER, S. Reaction of benzoquinones and naphthoquinones with 1,8-diamino-3,6-dioxanonane and with 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecane. *Tetrahedron Lett.* **44**, 5531-5534, 2003.
79. LAWRENCE, H. R.; KAZI, A.; LUO, Y.; KENDIG, R.; GE, Y.; JAIN, S.; K., DANIEL.; SANTIAGO, D.; GUIDA, W. C.; SEBTI, S. M. Synthesis and biological evaluation of naphthoquinone analogs as a novel class of proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 5576-5592, 2010.
80. YADAV, J. S.; REDDY, B. V. S.; SWAMY, T.; SHANKAR, K. S. Green protocol for

conjugate addition of amines to p-quinones accelerated by water. *Monatsh. Chem.* **139**, 1317-1320, 2008.

81. MOSMANN, T.J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol. Methods.* **65**, 55-63, 1983.

82. PERSMARK, M.; GUENGERICH, F. P. Spectral and Thermodynamic Characterization of the Interaction of N7-Guanyl Thioether Derivatives of d(TGCTG*CAAG) with Potential Complements. *Biochemistry.* **33**, 8662-8672, 1994.

83. MENDOZA, M. C.; BLENIS, E. E. E. J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 320-328, 2011.

84. CANTLEY, L.C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science.* **296**, 1655-1657, 2002.

85. NITISS, J.L. Targeting, DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature.* **9**, 338-350, 2009.

86. JIMÉNEZ-ALONSO, S.; ORELLANA, H. C.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; PÉREZ-SACAU, E.; MACHÍN, F. Design and Synthesis of a Novel Series of Pyranonaphthoquinones as Topoisomerase II Catalytic Inhibitors. *J. Med. Chem.* **51**, 6761-6772, 2008.

87. BURDEN, D. A.; OSHEROFF, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochem. Biophys. Acta.* **1400**, 139-154, 1998.

88. BALDWIN, E.L.; OSHEROFF, N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* **5**, 363-372, 2005.

89. WALKER, E. H.; PACOLD, M. E.; PERISIC, O.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. T.; WYMANN, M. P.; WILLIAMS, R. L. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell.* **6**, 909-919, 2000.

90. Gaussian03. Gaussian 03, Revision C.02, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.

E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

91. DENNY, W A. Prodrug strategies in cancer therapy. *European journal of medicinal chemistry*. **36**, 577-595, 2001.

92. KIZEK, R.; ADAM, V.; HRABETA, J.; ECKSCHLAGER, T.; SMUTNY, S.; BURDA, J. V.; FREI, E.; STIBOROVA, M. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances. *Pharmacology & Therapeutics*. **133**, 26-39. 2012.

93. AUCLAIR, C. Multimodal Action of Antitumor Agents on DNA: The Ellipticine Series. *Arch. Biochem. Biophys*. **259**, 1-14, 1987.