



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais

---

**LIGANTE NATURAL BIOATIVO UTILIZADO NA SÍNTESE  
DE UM NOVO COMPLEXO METÁLICO  
CONTENDO ÍON  $\text{Fe}^{\text{II}}$**

Acadêmica: Tamires Donizeth de Oliveira

Dourados – MS

2015





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais

---

**LIGANTE NATURAL BIOATIVO UTILIZADO NA SÍNTESE  
DE UM NOVO COMPLEXO METÁLICO  
CONTENDO ÍON Fe<sup>II</sup>**

Acadêmica: Tamires Donizeth de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Ademir dos Anjos

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Rogério Fiorucci

“Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais.

Dourados – MS

2015

---



O52L Oliveira, Tamires Donizeth

Ligante natural bioativo utilizado na síntese de um novo complexo metálico contendo íon Fe<sup>II</sup>/Tamires Donizeth de Oliveira. Dourados: UEMS, 2015.  
82f.

Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Ademir dos Anjos

1. Lapachol 2. Espectroscopia 3. Ensaio Biológicos I.

Título

CDD 23.ed. - 543.5

## **FICHA DE APROVAÇÃO**

## **EPÍGRAFE**

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.  
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”  
(Cora Coralina)*

## **DEDICATÓRIA**

*A minha família que tanto amo.  
Os responsáveis por tudo que sou.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por sempre me guardar e guiar meus passos, por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas para que os dias fossem mais prazerosos, enfim por me abençoar e proteger em todos os momentos.

Agradeço a minha família, minha base. A meus pais Laércio e Cecília pelo constante incentivo, por apoiarem minhas decisões, por torcerem e se alegrarem comigo, pelo amor incondicional, por serem tão especiais e incomparáveis. A minha irmã Jéssica pela companhia durante todo o percurso, por todo o carinho e apoio constantes, quem tem irmãos nunca está sozinho! Ao meu cunhado Fillipe por toda a bondade e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei, saiba que és muito especial. Aos meus avós Victor, Francisca e Júlia pela constante preocupação e interesse para comigo e pelo carinho imenso que são capazes de dar. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Gelson Tiago, por estar presente em todos os momentos do meu caminho até aqui, por aguentar minhas fases confusas e desesperadoras, por me auxiliar, cuidar de mim e me fazer sentir feliz, com toda certeza você foi e é essencial.

A todos os meus amigos, por tornarem os problemas mais leves, em especial a Natália, Lis e Marcia por se tornarem como uma segunda família, por serem tão maravilhosas e por me permitirem contar sempre com vocês.

Aos amigos do grupo de pesquisa: Débora, Natália, Estefane, Michele, Alice, Natali, Junior e Leandro, pela excelente convivência, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela amizade que construímos, aos dois últimos agradeço também pelo auxílio na realização dos testes antimicrobianos apresentados no trabalho. Agradeço também aos outros colegas de laboratório: Amanda, Eduardo, Kássia, Elizandra, Natali e demais, por tornarem os dias de trabalho mais prazerosos.

As meninas do mestrado, por serem tão acolhedoras e pelo companheirismo sempre demonstrado por todas.

Ao professor orientador Ademir dos Anjos pelos anos de convivência, pela paciência, pelo grande aprendizado que me proporcionou e que sempre levarei comigo. Agradeço por tudo, pelo imenso coração, pela disponibilidade e por toda ajuda e orientação. Muito obrigada!

Ao co-orientador Antonio Rogério Fiorucci pela paciência e pelo auxílio no desenvolvimento de parte do trabalho.

Ao professor Anderson Rodrigues Lima Caires pela realização das análises de Luminescência.

Aos professores Sandro Márcio Lima e Luís Humberto da Cunha Andrade pela disponibilização do aparelho de Infravermelho.

Ao professor Lincoln Carlos Silva de Oliveira e ao doutorando Jusinei Meireles Stropa pela realização da análise térmica.

A professora Mary A. Foglio e ao professor Rogério Cesar de Lara da Silva pela realização do ensaio antitumoral *in vitro*.

Aos professores Eliandro Faoro e Luís Humberto da Cunha Andrade por aceitarem participar da avaliação do trabalho.

A toda coordenação da Pós Graduação em Recursos Naturais, e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A CAPES e FUNDECT pelo auxílio financeiro.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estruturas químicas da <i>cis</i> -platina (a), carboplatina (b) e oxaliplatina (c). .....	4
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do auranofina (a) e miocrisina (b). .....	5
<b>Figura 3</b> - Fórmula estrutural das quinonas doxorubicina (a), mitomicina (b) e mitoxantrona (c). .....	7
<b>Figura 4</b> - Representação estrutural dos três principais estados de oxidação das quinonas. ....	8
<b>Figura 5</b> - Representação estrutural das três classes de quinonas. ....	8
<b>Figura 6</b> - Estrutura química da $\alpha$ -lapachona (a) e $\beta$ -lapachona (b). .....	10
<b>Figura 7</b> - Estrutura química da naftoquinona natural lapachol (A) e isolapachol (B). .....	11
<b>Figura 8</b> - Fórmula estrutural dos complexos sintetizados por MOLINA <i>et. al.</i> , 2007. M: Co <sup>II</sup> e Ni <sup>II</sup> . ....	12
<b>Figura 9</b> - Estrutura química do medicamento Nipride. ....	13
<b>Figura 10</b> - Lapachol extraído da serragem de ipê. ....	22
<b>Figura 11</b> - Estrutura dimérica do lapachol. ....	26
<b>Figura 12</b> - Espectro no infravermelho do lapachol. Inserção: estrutura do lapachol enumerada. ....	26
<b>Figura 13</b> - Espectro infravermelho comparativo entre o lapachol (preto) e o complexo (vermelho). ....	27
<b>Figura 14</b> - Ampliação do espectro IV comparativo entre o lapachol (em preto) e o complexo (em vermelho). ....	28
<b>Figura 15</b> - Curvas TG e DTG do complexo de Fe <sup>II</sup> em atmosfera de ar sintético. ....	30
<b>Figura 16</b> - Estrutura proposta para o complexo lapacholato-Fe <sup>II</sup> . ....	30
<b>Figura 17</b> - Espectro eletrônico do lapachol em diclorometano (A) e DMSO (B). Concentração: 5,0 x 10 <sup>-5</sup> . 31	
<b>Figura 18</b> - Espectro eletrônico do sal lapacholato de sódio. ....	32
<b>Figura 19</b> - Espectro eletrônico comparativo entre o lapachol (preto) e o complexo (vermelho). Concentração: 5,0 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> ; Solvente: diclorometano. ....	33
<b>Figura 20</b> - Espectro de eletrônico do lapachol. Solvente diclorometano, em concentrações de (1) 1,0 x 10 <sup>-5</sup> , (2) 2,0 x 10 <sup>-5</sup> , (3) 3,0 x 10 <sup>-5</sup> , (4) 4,0 x 10 <sup>-5</sup> e (5) 5,0 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> . Inserção: curvas analíticas relacionando absorvância e concentração. ....	34
<b>Figura 21</b> - Espectro de eletrônico do complexo. Solvente diclorometano, em concentrações de (1) 1,0 x 10 <sup>-5</sup> , (2) 2,0 x 10 <sup>-5</sup> , (3) 3,0 x 10 <sup>-5</sup> , (4) 4,0 x 10 <sup>-5</sup> e (5) 5,0 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> . Inserção: curvas analíticas relacionando absorvância e concentração. ....	35
<b>Figura 22</b> - Mapa de contorno do lapachol (esquerda) e do complexo (direita). ....	36
<b>Figura 23</b> - Espectro de emissão comparativo: lapachol (preto) e complexo (vermelho). Concentração: 6,4 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> ; Solvente: diclorometano. ....	37
<b>Figura 24</b> - Voltamogramas de onda quadrada do par redox ferrocínio/ferroceno (Fc <sup>+</sup> /Fc) utilizado como padrão interno. Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho), Ag/Ag <sup>+</sup> (referência) e fio platina (auxiliar). ....	38
<b>Figura 25</b> - Formas redox das quinonas. ....	40

<b>Figura 26</b> – Voltamogramas de onda quadrada do lapachol. Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho), Ag/Ag <sup>+</sup> (referência) e fio platina (auxiliar).....	38
<b>Figura 27</b> – Voltamogramas de onda quadrada do complexo de ferro <sup>II</sup> . Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho), Ag/Ag <sup>+</sup> (referência) e fio platina (auxiliar).....	41
<b>Figura 28</b> - Curva de titulação potenciométrica do lapachol com solução titulante de NaOH 0,01036 mol L <sup>-1</sup> . .....	42
<b>Figura 29</b> - Primeira derivada da curva de titulação potenciométrica do lapachol.....	43
<b>Figura 30</b> - Voltamograma cíclico do lapachol imobilizado em pasta de carbono.....	44
<b>Figura 31</b> – Voltamogramas cíclicos do lapachol (preto) e complexo (vermelho) medidos em velocidade de 1 mV s <sup>-1</sup> . .....	45
<b>Figura 32</b> - Gráficos correlacionando a porcentagem de crescimento celular e a concentração do padrão doxorubicina.....	47
<b>Figura 33</b> - Gráficos correlacionando a porcentagem de crescimento celular e a concentração do lapachol.	47
<b>Figura 34</b> - Gráficos correlacionando a porcentagem de crescimento celular e a concentração do complexo. .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Fármacos que contém metais em sua composição. ....	5
<b>Tabela 2</b> - Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa. ....	20
<b>Tabela 3</b> – Comparação das solubilidades do ligante e complexo. ....	24
<b>Tabela 4</b> - Porcentagens obtidas e calculadas para análise elementar do composto C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub> Fe.....	25
<b>Tabela 5</b> - Principais bandas e atribuições, em cm <sup>-1</sup> , dos espectros no IV para o lapachol livre, para o complexo e alguns complexos da literatura (baseados no lapachol).....	28
<b>Tabela 6</b> - Valores de absorvidade molar para o lapachol e complexo, expressos em mol L <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> . ....	34
<b>Tabela 7</b> – Valores de Potenciais em V vs Fc <sup>+</sup> /Fc para o lapachol e o complexo. ....	41
<b>Tabela 8</b> - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), valores expressos em µg mL <sup>-1</sup> .....	46
<b>Tabela 9</b> - Valores de TGI expressos em µg mL <sup>-1</sup> .....	49

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CHN** – Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Oxigênio

**UV-Vis** – Ultravioleta-Visível

**IV** - Infravermelho

**ADN** – Ácido Desoxirribonucleico

**ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DMF** – Dimetilformamida

**TG** - Termogravimetria

**DTG** - Termogravimetria derivada

$\lambda$  - Comprimento de Onda

**nm** – nanômetro

**TCML** – Transferência de Carga Ligante Metal

**CIM** – Concentração Inibitória mínima

**CBM** – Concentração Bactericida Mínima

## RESUMO

O presente trabalho descreve a síntese e caracterização de um novo complexo metálico lapacholato-Fe<sup>II</sup>, bem como o estudo das suas propriedades biológicas (antimicrobiana e antitumoral). A análise elementar de CHN indicou uma estrutura mononuclear com fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub>Fe e massa molar 610,44 g mol<sup>-1</sup>. A espectroscopia no infravermelho sugeriu, através de deslocamentos nos números de onda das bandas referentes a vibração  $\nu_{C=O}$  e ao desaparecimento da banda referente à  $\nu_{O-H}$  de fenol, a ocorrência da coordenação de maneira bidentada via oxigênios carbonílico e fenólico. A espectroscopia eletrônica no UV-Vis mostrou diferenças nos perfis espectrais do ligante livre e do complexo, como por exemplo, o surgimento de uma nova banda na região do visível, a qual é relacionada a interação do ligante ao íon metálico (banda TCLM). O espectro de emissão apresentou distinções decorrentes da coordenação, apresentando dados que coincidem com o espectro de absorção. A análise térmica se mostrou concordante com as demais técnicas de caracterização, permitindo reforçar a fórmula estrutural proposta para o complexo mononuclear, indicando que o mesmo deve apresentar uma geometria octaédrica composta por duas unidades de lapachol, duas moléculas de água de coordenação e duas de hidratação. A pureza do lapachol, extraído do ipê roxo, foi determinada em 90,3% via titulação potenciométrica. A voltametria do complexo imobilizado em pasta de carbono mostrou sua instabilidade em meio ácido. O estudo sobre o comportamento eletroquímico do composto de coordenação, principalmente quando comparado ao do lapachol, mostrou um perfil notavelmente distinto, o que contribui tanto para a compreensão do sistema redox das quinonas em geral, como na explicação das atividades biológicas que o complexo apresenta. Os ensaios biológicos apontaram uma potencialização das atividades após a coordenação: nos testes antimicrobianos o complexo foi mais ativo que o lapachol, principalmente frente a bactéria *gram* positiva *S. Aureus*; os ensaios antitumorais *in vitro* demonstraram o melhor desempenho do complexo sobre praticamente todas as linhagens de células, quando comparado ao ligante, apresentando maior eficácia contra as linhagens U251 (glioma) e NCI-H460 (pulmão) possuindo excelente atividade nas concentrações de 2,20 e 6,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Palavras chave:** *lapachol; lapacholato-Fe<sup>II</sup>; espectroscopia; eletroquímica; ensaios biológicos.*

## ABSTRACT 1

This work describes synthesis and characterization of a new metal complex lapacholate-Fe<sup>II</sup>, and the study of their biological properties (antimicrobial and antitumoral). A mononuclear structure with C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub>Fe molecular formula and 610.44 g mol<sup>-1</sup> as molecular weight was determined by elementary analysis. The occurrence of bidentate coordination via carbonyl and phenolic oxygen's was verified by infrared spectroscopy, through displacement of vibration wavenumbers related to  $\nu_{C=O}$  and the disappearance of a phenol  $\nu_{O-H}$  one. The new band appearance in visible region, assigned to interaction, between the ligand and metal ion (LMCT band), was observed by UV-Vis spectra. These results were similar to those obtained by emission spectroscopy, due to coordination. Thermal analysis confirmed the proposed formula for mononuclear complex, which has octahedral geometry consisting of two lapachol units, two coordination and two adsorbed water molecules. Purity of lapachol, extracted from ipe, was determined by 90% via potentiometric titration. The voltammetry of immobilized carbon paste complex showed its instability in acidic medium. The electrochemical study of the coordination compound, compared to lapachol, showed a distinct profile of this contributed to the understanding quinone redox system and helps to explain biological activity of the complex. Biological assays showed an enhancement of the activities after coordination: the complex presented antimicrobial activity higher than lapachol, particularly against *S. aureus* gram-positive bacteria; the complex was most active compound than lapachol standard on antitumoral *in vitro* assays for all cell strains, especially for the U251 (glioma) and NCI-H460 (lung).

**Keywords:** *lapachol. lapacholate-Fe<sup>II</sup>; spectroscopy; electrochemistry; biological assays.*

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	OBJETIVOS .....	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1	Química Bioinorgânica: Complexos Metálicos .....	4
3.2	Quinonas .....	6
3.3	Lapachol .....	10
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
4.1	Materiais .....	14
4.2	Métodos e Instrumentação .....	14
4.2.1	Ponto de Fusão .....	14
4.2.2	Teste de Solubilidade .....	14
4.2.3	Análise Elementar de CHN .....	15
4.2.4	Espectroscopia no Infravermelho .....	15
4.2.5	Análise Térmica .....	15
4.2.6	Espectroscopia no UV-Vis .....	15
4.2.7	Espectroscopia de Fluorescência .....	16
4.2.8	Caracterização do Ligante e Complexo por Técnicas Eletroanalíticas .....	16
4.2.9	Testes antimicrobianos .....	18
4.2.10	Ensaio Antitumoral <i>in vitro</i> .....	20
4.2.11	Extração do Lapachol .....	22
4.2.12	Síntese do Complexo .....	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
5.1	Ponto de Fusão e Teste de Solubilidade .....	24
5.2	Análise elementar de CHN .....	25
5.3	Espectroscopia no Infravermelho .....	25
5.3	Análise Térmica .....	29

<b>5.4</b>	<b>Espectroscopia no UV-Vis</b> .....	31
<b>5.4.1.</b>	<b>Complexo</b> .....	32
<b>5.4.2</b>	<b>Absortividade Molar</b> .....	33
<b>5.5</b>	<b>Espectroscopia de Fluorescência</b> .....	35
<b>5.7</b>	<b>Caracterização do Ligante e Complexo por Técnicas Eletroanalíticas</b> .....	37
<b>5.7.1</b>	<b>Voltametria de Onda Quadrada</b> .....	37
<b>5.8</b>	<b>Testes de Atividade Antimicrobiana</b> .....	45
<b>5.9</b>	<b>Ensaio Antitumoral <i>in vitro</i></b> .....	46
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	52



## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente a utilização de complexos metálicos no campo farmacêutico tem sido um tema alvo, chamando atenção devido as importantes propriedades apresentadas por tais compostos. Os produtos naturais são conhecidos e amplamente estudados em várias áreas da química e nos últimos tempos suas aparições na química bioinorgânica como ligantes vem sendo constante, já que estes compostos são uma fonte inesgotável para a busca de novos fármacos, pois apresentam grande diversidade estrutural e uma ampla gama de atividades biológicas (CASTRO *et. al.*, 2013).

As quinonas são metabólitos secundários presentes em inúmeras plantas, fungos e células animais. O lapachol é um dos representantes deste grupo de compostos, conhecido por sua ampla dinamicidade, possuindo propriedades como antitumoral, antimicrobiana, antiviral e leishmanicida. Esta molécula é comumente extraída do cerne das árvores de ipê (Família Bignoneaceae), e possui diversos estudos em diferentes áreas da ciência, principalmente quanto a suas atividades biológicas, porém apesar de apresentar propriedades interessantes pode ocasionar efeitos negativos, que podem ser diminuídos através de sua modificação estrutural como, por exemplo pela sua coordenação a íons metálicos (SOUZA *et. al.*, 2008; EBELLE *et. al.*, 2010; AUCÉLIO *et. al.*, 2013; HUSSAIN *et. al.*, 2007).

A utilização do lapachol em química de coordenação tem sido bastante realizada, podendo-se encontrar alguns complexos metálicos utilizando a quinona natural como ligante, principalmente com metais de transição. No entanto, apesar dos estudos já existentes, ainda existem muitos pontos a serem explorados quanto ao processo de complexação entre os quais, estudos relacionados as atividades biológicas apresentadas pelos compostos obtidos, que podem ser potencializadas (MOLINA *et. al.*, 2007; FÁRFAN *et. al.*, 2009; FARFÁN *et. al.*, 2012; MARTÍNEZ *et. al.*, 2003; PARRILHA *et. al.*, 2012; CARUSO *et. al.*, 2009).

Os íons ferroso e férrico são bastante abundantes na natureza e amplamente presentes em sistemas biológicos, onde desempenham funções cruciais para todos organismos vivos. Devido a esta relevância sua utilização em química bioinorgânica é promissora, sendo que já se encontram fármacos utilizando seus compostos.

Desta forma o presente trabalho descreve a síntese de um novo complexo obtido através da reação entre a quinona natural lapachol e o íon metálico Fe<sup>II</sup>, bem como sua caracterização e o estudo de suas propriedades biológicas, comparando-as com as do ligante *in natura*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

A partir do ligante natural lapachol (extraído do ipê), promover a síntese e caracterização de um complexo metálico contendo íon ferro<sup>II</sup>, assim como estudar suas propriedades físico-químicas e atividades biológicas, comparando posteriormente com as propriedades e atividades obtidas para o composto *in natura* e com os padrões utilizados.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 1- Promover a extração e purificação da naftoquinona lapachol do ipê.
- 2- Realizar a síntese de um complexo metálico lapacholato-Fe<sup>II</sup>.
- 3- Caracterizar e estudar as propriedades físico-químicas do complexo obtido através de análise elementar de CHN, técnicas espectroscópicas (Infravermelho, UV-Vis e Luminescência), técnicas eletroanalíticas (voltametria de onda quadrada, voltametria cíclica e titulação potenciométrica) e análise térmica.
- 4- Realizar estudo das atividades biológicas (antimicrobiana e antitumoral) no ligante livre e complexo sintetizado.
- 5- Comparar os resultados obtidos para o complexo com aqueles apresentados pelo ligante não coordenado e com os padrões utilizados.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

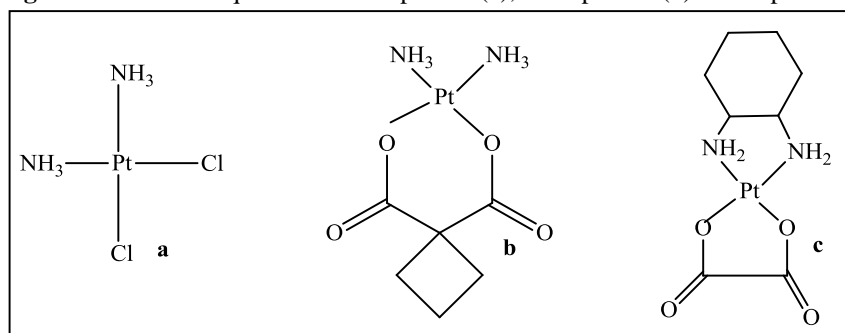
#### 3.1 Química Bioinorgânica: Complexos Metálicos

A química inorgânica biológica tem como principal foco a síntese de complexos metálicos obtidos através da interação de moléculas orgânicas com íons metálicos. Sabe-se que os metais apresentam grande essencialidade aos sistemas vivos, sendo que é em sua forma iônica que desempenham suas principais funções. Alguns exemplos conhecidos da importância biológica dos metais são a falta de cálcio e ferro, que pode vir a causar doenças como osteoporose e anemia respectivamente (BENITE *et. al.*, 2007).

Os compostos de coordenação encontram-se presentes em sistemas biológicos, nos quais desempenham importantes papéis, como a vitamina B12, um complexo com centro metálico de cobalto que é essencial para a transferência de grupos alquila em sistemas biológicos e a clorofila presente nas plantas verdes, um complexo de magnésio responsável pelo processo fotossintético.

A coordenação de íons metálicos a biomoléculas pode resultar em compostos com propriedades biológicas e farmacológicas interessantes, o que justifica as pesquisas desenvolvidas nesta área. Na medicina atual pode-se encontrar alguns compostos de coordenação utilizados como fármacos. A *cis*-platina ( $cis$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Cl)<sub>2</sub>]) (Figura 1 (a)), empregada no tratamento do câncer, é um dos compostos mais conhecidos e provavelmente, um dos responsáveis pelo desencadeamento da pesquisa de complexos com finalidade medicinal. Mais de 4.000 compostos de platina têm sido testados como fármacos no tratamento do câncer, além da *cis*-platina a carboplatina (Figura 1 (b)) e oxaliplatina (Figura 1 (c)) também são bastante utilizadas (AHMAD *et. al.*, 2006; BARRY & SADLER, 2013).

**Figura 1-** Estruturas químicas da *cis*-platina (a), carboplatina (b) e oxaliplatina (c).



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

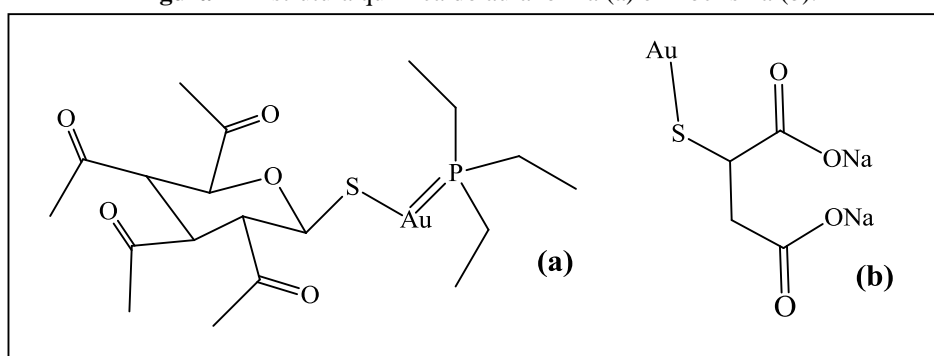
Além dos complexos de platina, outros compostos como os que possuem centro metálico de ouro são utilizados na medicina, exemplos conhecidos são a auranofina ([Au(PEt<sub>3</sub>)(ttag)]) (Figura 2 (a)) e miocrisina (Figura 2 (b)), que são empregados no tratamento de artrite reumática (NEVES, 2001). A Tabela 1 apresenta alguns fármacos que contém metais em sua composição.

**Tabela 1** - Fármacos que contém metais em sua composição.

Nome Comercial	Elemento	Fórmula	Atividade Farmacológica
Proteinato de Prata	Ag <sup>I</sup>	Ag-Albúmina	Anti-infeccioso
Trisenox	As <sup>III</sup>	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Antitumoral
Miocrisina	Au <sup>I</sup>	AuSCHCH <sub>2</sub> COONa	Antirreumático
Subnitrato de Bismuto	Bi <sup>III</sup>	Bi <sub>5</sub> O(OH) <sub>9</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Antiúlcera
Vitamina B12	Co <sup>II</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	Antianemico
Nipride	Fe <sup>II</sup>	[Fe(CN) <sub>5</sub> (NO)] <sup>-3</sup>	Vasodilatador
Dotarem	Gd <sup>III</sup>	GdC <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub> N <sub>4</sub>	Detecção de anormalidades na circulação do cérebro
Camcoli	Li <sup>I</sup>	Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Desordens bipolares
Platinil	Pt <sup>II</sup>	Cis-[PtC <sub>12</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	Antitumoral
Glucantime	Sb <sup>V</sup>	N-metilglucaminaantimonato	Anti-infeccioso

Fonte: NEVES, 2001.

**Figura 2** - Estrutura química do auranofina (a) e miocrisina (b).



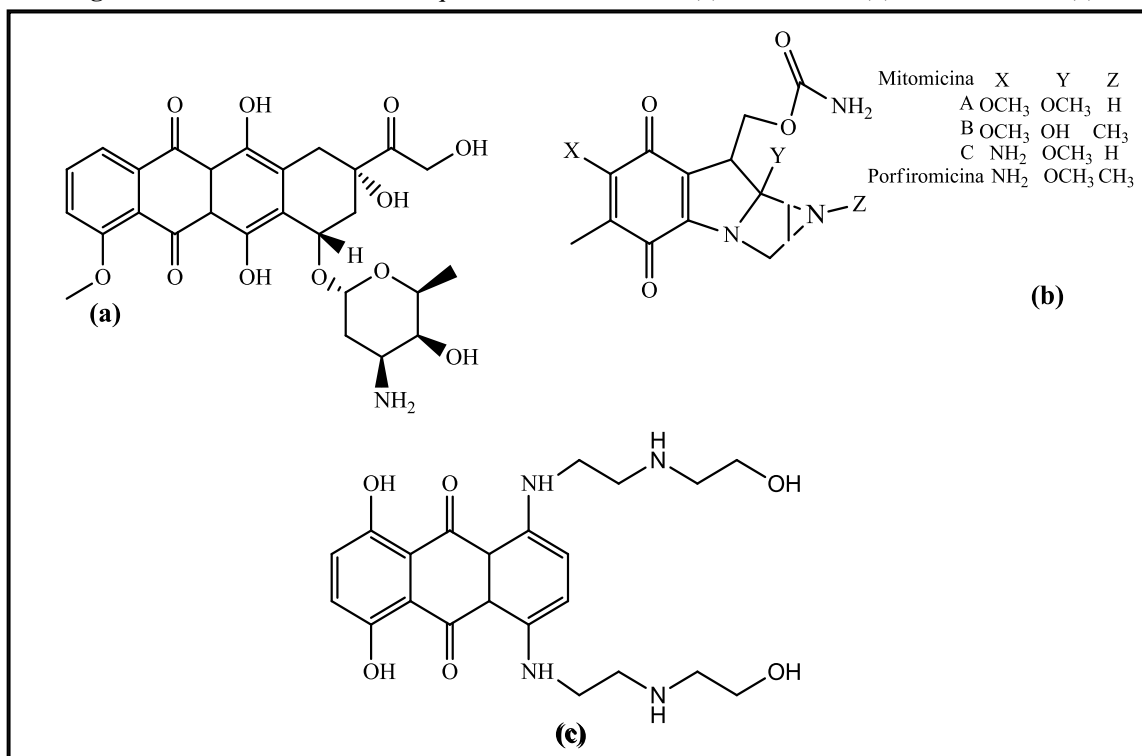
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

### **3.2 Quinonas**

O número de pesquisas atuais relacionadas ao isolamento de compostos naturais que são biologicamente ativos tem aumentado a cada dia. Isso ocorre devido à grande gama de propriedades interessantes apresentadas por muitos destes compostos, que podem ser estudadas e até mesmo potencializadas. A química de coordenação destas substâncias vem sendo amplamente pesquisada devido as suas vantagens quando comparadas aos ligantes sintéticos (baixo custo operacional, ausência de contaminação, etc.), assim como as interessantes propriedades possivelmente encontradas em compostos de coordenação resultantes da interação de íons metálicos com substâncias de interesse biológico.

As quinonas são representantes de uma ampla e variada família de metabólitos naturais que podem ser encontrados em uma diversidade de plantas, fungos, líquens e células animais, desempenhando funções diversas, como na respiração e fotossíntese. Estes compostos químicos são conhecidos devido a sua grande gama de aplicações, como em corantes, já que em sua maioria são bastante coloridas, e pelo fato de apresentarem uma grande biodinamicidade possuindo diferentes propriedades biológicas e farmacológicas, são também utilizadas na medicina. Várias propriedades são atribuídas as quinonas como antibiótica, anticancerígena, anti-úlceras e anti-inflamatória. Compostos com estruturas quinonoídicas são considerados interessantes candidatos a possuir efeitos citotóxicos e consequentemente compostos que pertencem ao grupo como doxorubicina, mitomicina e mitoxantrona (Figura 3) são utilizados clinicamente no tratamento de tumores sólidos (SOUZA *et. al.*, 2008; ROSSO *et. al.*, 2013; EBELLE *et. al.*, 2010; SUNASSEE *et. al.*, 2012; AUCÉLIO *et. al.*, 2013; SILVA *et. al.*, 2014; SACAU *et. al.*, 2003; ROYO *et. al.*, 2013).

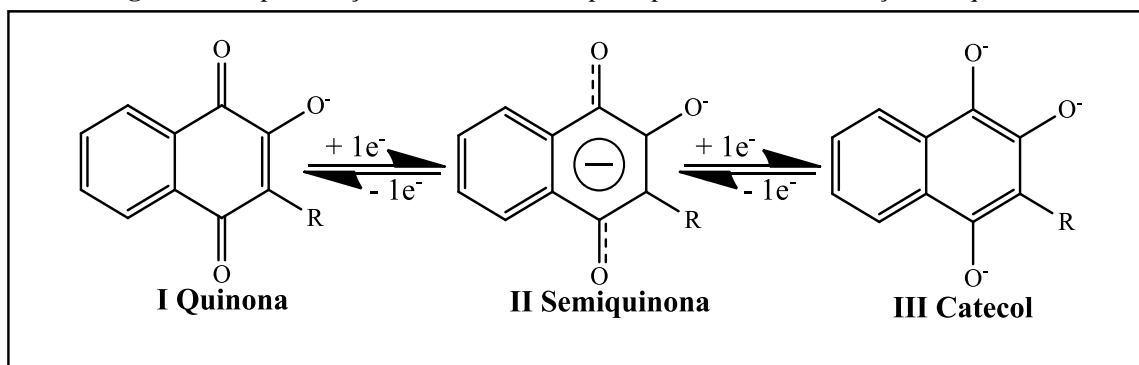
**Figura 3** - Fórmula estrutural das quinonas doxorubicina (a), mitomicina (b) e mitoxantrona (c).



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

A atividade biológica deste grupo de compostos relaciona-se com as suas propriedades redox e a capacidade que possuem de aceitar um ou dois elétrons formando o correspondente ânion e diânion radical, que interagem com O<sub>2</sub>, ADN e proteínas. Devido às suas propriedades redox complexas, compostos de coordenação utilizando quinonas como ligantes têm sido de considerável interesse por muitos anos. Estas moléculas podem se ligar potencialmente a íons metálicos em três diferentes formas de oxidação: (I) quinona, (II) semiquinonas, e (III) catecol (Figura 4). A capacidade de ligação quinonas em diferentes estados de oxidação permite que elas desempenhem um papel importante nos sistemas biológicos e seus complexos podem apresentar diferenças em suas propriedades estruturais, magnéticas e eletroquímicas (GAWALI *et.al.*, 2012; GAWALI *et. al.*, 2004; ROYO *et. al.*, 2013; KATHAWATE *et. al.*, 2014).

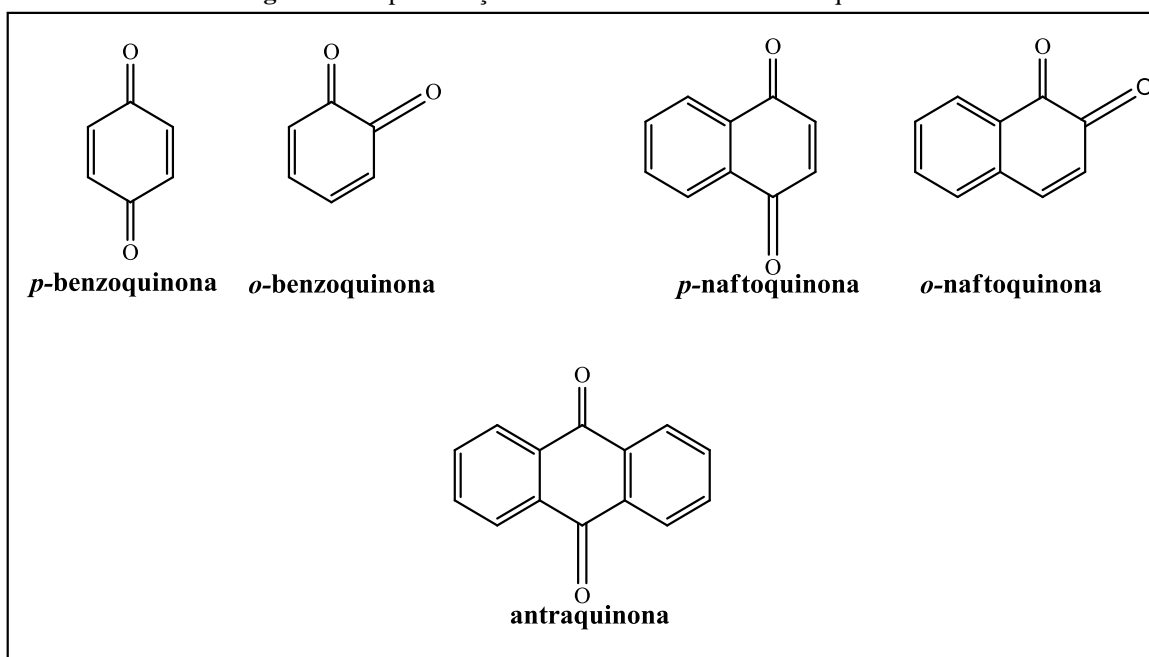
Figura 4 - Representação estrutural dos três principais estados de oxidação das quinonas.



Fonte: KATHAWATE, 2014.

As quinonas podem ser divididas em três principais classes, de acordo com o sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas (um anel aromático), naftoquinonas (dois anéis aromáticos) e antraquinonas (três anéis aromáticos) (Figura 5) (AHMED & KHAN, 2013; AUCÉLIO *et. al.*, 2013; SILVA *et. al.*, 2014).

Figura 5 - Representação estrutural das três classes de quinonas.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

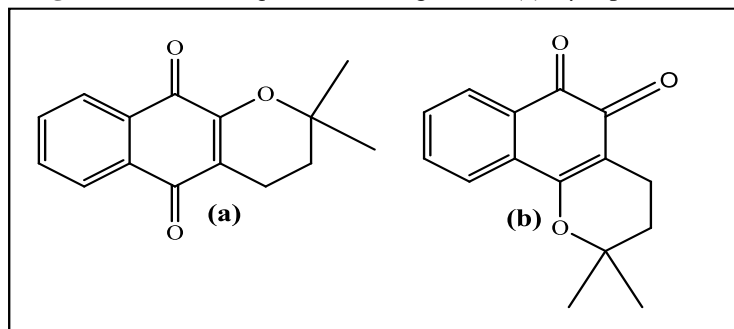


As benzoquinonas apresentam um anel aromático como característica estrutural, estes compostos possuem importante participação na respiração e fotossíntese das plantas, sua importância biológica e farmacológica não é devidamente definida, porém o composto trimetil-1,4-benzoquinona que pertence ao grupo é um reagente essencial para a síntese da vitamina E (DA SILVA, 2009; DA SILVA *et. al.*, 2003; DERIKVAND *et. al.*, 2010).

As antraquinonas podem ser encontradas em plantas, insetos, líquens e fungos, são bastante conhecidas por sua utilização como corantes, sendo o maior grupo de pigmentos quinonoídicos naturais. Algumas antraquinonas apresentam atividades antibacteriana, inseticida, fungicida, antiviral e antitumoral, sendo o princípio ativo de muitas plantas com uso medicinal. Exemplos da utilização de antraquinonas na medicina são a doxorrubicina e mitomicina, utilizadas no tratamento de tumores sólidos (vide Figura 3 a e b) (DUFOSSÉ, 2014; GESSLER *et. al.*, 2013; CARO *et. al.*, 2012).

As naftoquinonas encontram-se presentes em microorganismos, animais e diversas famílias de plantas, como Bignoniaceae, Droseraceae, Ebenaceae, Juglandaceae e Plumbaginaceae. Muitos estudos são realizados com compostos pertencentes a esta classe devido a sua vasta gama de propriedades, que incluem antitumoral, antibiótica, antimalárica, anti-inflamatória, antiviral, antifúngico, muloicida e tripanossomicida. Algumas moléculas pertencentes ao grupo apresentam diversas funções fisiológicas, como por exemplo a vitamina K, componente essencial em sistemas bioquímicos. Outros representantes do grupo são o  $\alpha$  e  $\beta$ -lapachona (Figura 5 a e b), isômeros nos quais o último é conhecido por apresentar atividades farmacológicas interessantes, e no ano de 2012 encontrava-se em fase II de ensaios clínicos nos EUA para o tratamento de tumores sólidos avançados (AHMED & KHAN, 2013; NEVES *et.al.*, 2012; PINTO *et. al.*, 2014; BABULA *et. al.*, 2012; DA SILVA *et. al.*, 2014; SUNASSEE *et. al.*, 2012.).

Figura 6 - Estrutura química da  $\alpha$ -lapachona (a) e  $\beta$ -lapachona (b).



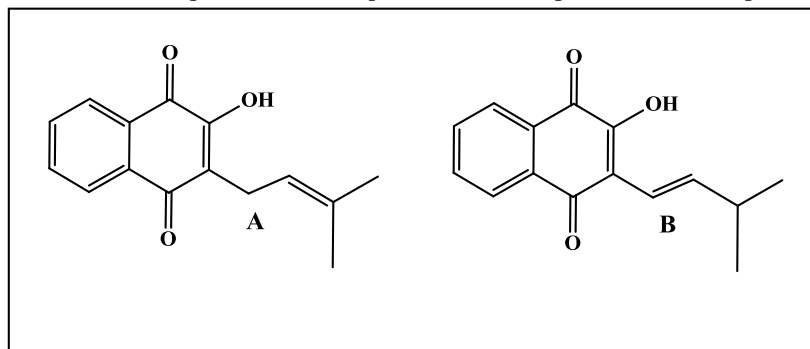
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

### 3.3 Lapachol

O lapachol (2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) (Figura 7A) é uma naftoquinona de fórmula estrutural  $C_{15}H_{14}O_3$  e massa molecular  $242,26 \text{ g. mol}^{-1}$ . Este composto foi isolado pela primeira vez pelo fitoquímico E. Paterno em 1882 do cerne de *Tabebuia Avellanadae* (Ipê roxo), no entanto a estrutura proposta por ele continha um erro na localização da dupla ligação presente na cadeia acíclica (estrutura hoje conhecida como iso-lapachol (Figura 7B)), que foi corrigido posteriormente no ano de 1896 por Hooker (HOOKER, 1896).

Atualmente o lapachol encontra-se entre um dos maiores representantes desta classe de compostos. As principais fontes de obtenção natural desta molécula são as plantas da família Bignoneaceae particularmente do gênero *Tabebuia*, como por exemplo os ipês, comumente encontrados na América do Sul, inclusive no Brasil, podendo ser extraído com facilidade através de alguns métodos experimentais com rendimento que varia de 1% a 7% dependendo da espécie, porém pode também ser encontrado em plantas pertencentes as famílias Leguminosae, Malvaceae, Plumbaginaceae, Lamiaceae, Arecaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae, Celastraceae, Avicenniaceae, Caesalpiniaceae, Rubiaceae, e Proteaceae (BARBOSA & NETO, 2013; HUSSAIN *et. al.*, 2007; ARAÚJO *et. al.*, 2002; OLIVEIRA *et. al.*, 2011; EPIFANO *et. al.*, 2013; NGAMENI *et. al.*, 2000).

Figura 7 - Estrutura química da naftoquinona natural lapachol (A) e isolapachol (B).



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

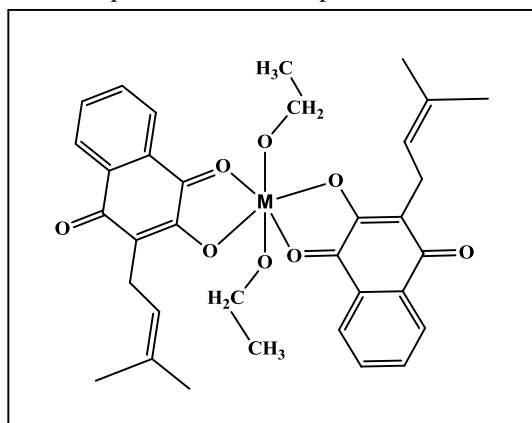
Os vários estudos relacionados ao lapachol, tanto obtido de forma natural como sintética são atribuídos às diversas atividades biológicas e farmacológicas conferidas ao composto, tais como antitumoral, antibiótica, antimalárica, tripanossomicida e leishmanicida, que assim como nas demais naftoquinonas estão relacionadas a capacidade da molécula em gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) (OLIVEIRA *et. al.*, 2011; PINTO *et. al.*, 2014; EPIFANO *et. al.*, 2013).

O lapachol apresenta basicamente dois potenciais átomos coordenantes que são os oxigênios carbonílico e fenólico presentes na posição orto, possuindo a capacidade de se ligar a íons metálicos formando quelatos com função ceto-enólica. A utilização do lapachol em química de coordenação é uma alternativa interessante, pois pode resultar numa melhora de suas já conhecidas atividades. Sawhney e colaboradores realizaram diversas tentativas de coordenar o lapachol e outras naftoquinonas com alguns íons metálicos na década de 80, como Eu<sup>III</sup>, Hg<sup>II</sup>, Er<sup>III</sup>, Cu<sup>II</sup>, Fe<sup>III</sup> e Fe<sup>II</sup>, no entanto os compostos obtidos foram pouco caracterizados e suas propriedades pouco estudadas, tendo-se ênfase principalmente em técnicas termoanalíticas (SAWHNEY *et. al.*, 1982; SAWHNEY, CHANDRA *et. al.*, 1982; SAWHNEY *et. al.*, 1983; SAWHNEY & BAINS, 1983; SAWHNEY & JAIN, 1984; SAWHNEY & ARORA, 1987; SAWHNEY *et. al.*, 1988; BHATIA & SAWHNEY, 1981).

Atualmente na literatura tem-se alguns complexos utilizando a naftoquinona como ligante, com distintos íons metálicos como Co<sup>II</sup>, Ni<sup>II</sup>, Cu<sup>II</sup> (MOLINA *et. al.*, 2007; FÁRFAN *et. al.*, 2009; FARFÁN *et. al.*, 2012), Zn<sup>II</sup> (MARTÍNEZ *et. al.*, 2003), Bi<sup>III</sup> (PARRILHA *et. al.*, 2012), Mn<sup>II</sup> (CARUSO *et. al.*, 2009) e mais recentemente Zn<sup>II</sup>, Cd<sup>II</sup> e Mn<sup>II</sup>, sintetizados por Farfán e colaboradores no ano de 2015. Em praticamente todos os

casos coordenam-se duas moléculas do ligante natural de maneira bidentada juntamente com duas moléculas de solvente, as únicas exceções são os complexos de manganês sintetizado por Caruso e colaboradores e de Cd<sup>II</sup> e Mn<sup>II</sup> publicados por FARFÁN *et. al.*, onde ocorre a formação de dímeros. Outras formas de coordenar o lapachol tem sido estudadas como sua utilização como híbrido juntamente com ligantes sintéticos, atualmente na literatura tem-se complexos de Bi<sup>V</sup>, Sb<sup>V</sup> e Sn<sup>IV</sup> (OLIVEIRA *et. al.*, 2011; ROCHA *et. al.*, 2013) com fosfina (Ph<sub>3</sub>) e 4 complexos utilizando o íon metálico Ru<sup>II</sup> e um com Ru<sup>III</sup> alterando-se ligantes sintéticos (BARBOSA *et. al.*, 2014). Pesquisas desenvolvidas por Kandioller e colaboradores relatam a síntese de organometálicos obtidos a partir de complexos Lapacholato-M (Ru<sup>II</sup>, Os<sup>II</sup> e Rh<sup>III</sup>) com arenos. A Figura 8 apresenta a estrutura apresentada pelos complexos sintetizados por Molina e colaboradores em 2007.

**Figura 8** - Fórmula estrutural dos complexos sintetizados por MOLINA *et. al.*, 2007. M: Co<sup>II</sup> e Ni<sup>II</sup>.



Fonte: Adaptado de MOLINA *et. al.*, 2007.

Nota-se que ainda existem diversas pesquisas a serem realizadas quanto a química de coordenação da naftoquinona natural, principalmente focadas para o estudo das atividades biológicas apresentadas pelos complexos formados a partir da quinona, já que os mesmos podem possuir alterações interessantes, tornando-se compostos mais potentes que o ligante *in natura*.

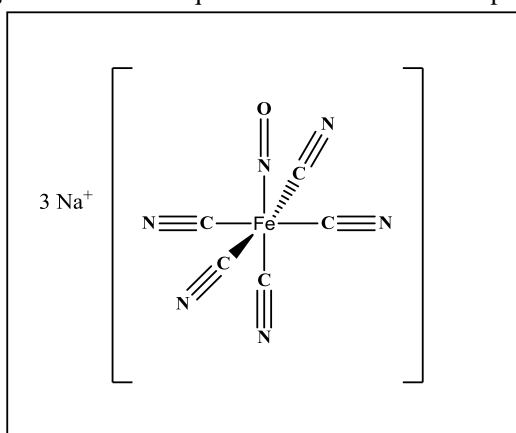
### 3.4 Ferro

O ferro é um metal de transição presente na família VIII da tabela periódica, com configuração eletrônica [Ar]4s<sup>2</sup>3d<sup>6</sup>, conhecido por ser o segundo metal e o quarto elemento

mais abundante da crosta terrestre, porém sua presença na natureza se dá somente em sua forma oxidada, podendo ser encontrado na forma de óxidos e hidróxidos, como por exemplo, goetita (FeOOH) e hematita (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). A importância deste metal é bastante conhecida, por ser o metal de transição mais presente nos sistemas biológicos, sendo de extrema importância para todos os organismos vivos, que necessitam do mesmo para seu crescimento e realização de rotas metabólicas essenciais. Um dos principais exemplos da presença de ferro em sistemas biológicos é a hemoglobina, enzima onde o sítio ativo é um íon de Fe<sup>II</sup>, responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio no sangue. Os estados de oxidação mais comuns apresentados por este metal são +2 e +3. Complexos de Fe<sup>II</sup> apresentam preferivelmente geometria octaédrica com número de coordenação 6, enquanto complexos de Fe<sup>III</sup> podem apresentar números de coordenação de 3 a 8, porém em sua maioria possuem geometria octaédrica (BENITE, MACHADO & MACHADO, 2002).

Devido à importância deste metal e ao fato de estar presente naturalmente nos organismos vivos, compostos quelantes de ferro são utilizados para tratar doenças relacionadas ao metabolismo alterado de ferro, além do medicamento Nipride (Figura 9; Tabela 1) um complexo de Fe<sup>II</sup> que atua no tratamento de doenças vasculares. Alguns estudos da química de coordenação deste elemento têm sido realizados, utilizando diferentes ligantes e em alguns casos estudando as propriedades biológicas dos complexos obtidos, como por exemplo atividade anticancerígena (SERDA *et. al.*, 2012; OLIVEIRA, 2013).

**Figura 9** - Estrutura química do medicamento Nipride.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

Os reagentes e solventes utilizados na síntese do complexo, extração do lapachol e análises, foram adquiridos de fontes comerciais (com exceção do lapachol que foi extraído pelo grupo de pesquisa): perclorato de Fe<sup>II</sup> (Sigma-Aldrich; 98%), trietilamina (Vetec; 99%), diclorometano (Vetec; grau HPLC e P.A), etanol (Dinâmica; P.A), metanol (Vetec; grau HPLC e P. A), dimetilsulfóxido (Vetec; P.A), dimetilformamida (Vetec; P.A), isopropanol (Dinâmica; P.A), acetonitrila (Vetec; P.A), acetona (Dinâmica; P.A), clorofórmio (Vetec; P.A), éter etílico (Dinâmica; P.A) e hexano (Dinâmica; P.A), hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (Sigma-Aldrich; 98%), ferroceno (Sigma-Aldrich; 98%), cloreto de lítio (Vetec; 99%), hidróxido de sódio (Vetec; 98%), ácido clorídrico (Qhemis; 37%), ácido sulfúrico (CRQ; 95-97%), bifitalato de potássio (Vetec; 99,95-100,05%), Sulfato de sódio anidro (Nuclear; 99%), cloreto de potássio (Dinâmica; 98%), cloreto de sódio (Dinâmica; 98%), grafite em pó (Sigma-Aldrich), cepa bacteriana *Escherichia coli* (Código: ATCC SP 11229; Marca: BAC-FAR (CCCD)), cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* (Código: ATCC SP 25923; Marca: BAC-FAR (CCCD)), Meio de cultura Agar Muller Hinton 500 g (HIMEDIA).

### **4.2 Métodos e Instrumentação**

#### **4.2.1 Ponto de Fusão**

O ponto de fusão das amostras foi determinado em aparelho Quimis Iso 9001 modelo Q340M13, utilizando termômetro com máximo de temperatura 310°C.

#### **4.2.2 Teste de Solubilidade**

A solubilidade dos compostos foi realizada pesando-se cerca de 1 mg de amostra (lapachol e complexo) e adicionando-se um volume de 2 mL de solvente. Utilizou-se água destilada e solventes P.A de diferentes polaridades (etanol, metanol, isopropanol, acetonitrila, acetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, diclorometano, clorofórmio, éter etílico e hexano).

### **4.2.3 Análise Elementar de CHN**

As amostras foram pesadas em triplicata e analisadas em Analisador Elementar Perkin Elmer CHN2400. A técnica foi realizada em colaboração com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

### **4.2.4 Espectroscopia no Infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho (4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ ) foram obtidos em um espectrofotômetro Thermo Nicolet Nexus 650, com acessório de detecção por fotoacústica (resolução 8  $\text{cm}^{-1}$ , média de 256 espectros) no Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica do Centro Integrado de Análise e Monitoramento Ambiental-CInAM da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul em colaboração com os Profs. Drs. Sandro Márcio Lima e Luis Humberto da Cunha Andrade.

### **4.2.5 Análise Térmica**

As curvas TG/DTG foram obtidas em equipamento TGA Q50 da TA Instrument, em razão de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , partindo da temperatura ambiente (aproximadamente 25  $^{\circ}\text{C}$ ) até 900  $^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera oxidante de ar sintético com fluxo de 60  $\text{mL min}^{-1}$ , utilizando cadinho de platina como suporte (massa inicial da amostra: 10 mg). As análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, com a colaboração do professor Dr. Lincoln Carlos Silva de Oliveira.

### **4.2.6 Espectroscopia no UV-Vis**

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) foram obtidos em um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50, no Laboratório de Pesquisa da Unidade de Naviraí/UEMS. As análises foram realizadas utilizando-se diclorometano (grau espectroscópico) e celas de quartzo com capacidade para 4,0 mL com 1 cm de caminho óptico (concentração  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). As medidas de absorvidade molar foram

realizadas com o preparo das amostras (ligante e complexo) em diclorometano na concentração de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (solução mãe), sendo que posteriormente foram feitas diluições de  $1,0 \times 10^{-5}$ ,  $2,0 \times 10^{-5}$ ,  $3,0 \times 10^{-5}$ ,  $4,0 \times 10^{-5}$  e  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### **4.2.7 Espectroscopia de Fluorescência**

As medidas de fluorescência foram realizadas no espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian). O espectrofluorímetro possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), com a largura a meia altura do pulso de aproximadamente 2  $\mu\text{s}$  e potência de pico equivalente a 75 KW; dois monocromadores, um para a seleção do comprimento de onda de excitação e outro para a seleção do comprimento de onda emitido pela amostra. A detecção da fluorescência é feita por um tubo fotomultiplicador (R928). Todas as medidas foram realizadas à temperatura controlada e as análises realizadas em triplicata, tornando assim os resultados obtidos reproduzíveis. As análises foram realizadas utilizando-se diclorometano (grau espectroscópico) na concentração  $6,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em parceria com o Prof. Dr. Anderson de Lima Caires na Universidade Federal da Grande Dourados.

#### **4.2.8 Caracterização do Ligante e Complexo por Técnicas Eletroanalíticas**

##### **4.2.8.1 Preparo das Soluções**

As soluções de LiCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , NaOH  $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$ , HCl  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ , H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $2 \text{ mol L}^{-1}$ , H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas segundo metodologia descrita na literatura (BACAN, 1979; SKOOG *et. al.*, 2007), assim como a padronização da solução de NaOH com padrão primário bifitalato de potássio, utilizando titulação potenciométrica com eletrodo de vidro combinado.

##### **4.2.8.2 Voltametria de Onda Quadrada**

O comportamento redox do lapachol e do complexo foi investigado por voltametria de onda quadrada em um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab PGSTAT 302 interfaceado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES (Versão 4.9). Foram utilizados eletrodo de carbono vítreo (diâmetro de 2,0 mm) como eletrodo trabalho, um eletrodo de Ag/Ag<sup>+</sup> usado como eletrodo de referência e um fio de platina como eletrodo



auxiliar (contra-eletrodo). O eletrólito suporte utilizado foi hexafluorofosfato de tetrabutilamônio e o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) grau espectroscópico, sendo que ferroceno foi empregado como padrão interno (GAGNÉ, 1980).

#### **4.2.8.3 Titulação Potenciométrica do Lapachol**

Foram solubilizados 0,0120 g de lapachol em um béquer de 100 mL utilizando uma mistura etanol/água (50% v/v). Posteriormente pipetou-se 1 mL de LiCl e transferiu-se para o mesmo béquer, para auxiliar na estabilização das medidas no início da titulação. Utilizou-se uma bureta de 10 mL com solução de NaOH 0,01036 mol L<sup>-1</sup> previamente padronizada para realizar a titulação. As medidas foram realizadas em um pHmetro conectado a um eletrodo combinado de vidro para medida de pH de soluções alcoólicas.

#### **4.2.8.4 Purificação de Grafite Usado na Preparação da Pasta**

A preparação da purificação do grafite usado na preparação da pasta de carbono foi realizada de acordo com procedimento descrito por BORGIO *et. al.*, 2003. Foram pesados 20 g de grafite em pó e em seguida adicionado 60 mL de HCl 0,001 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, colocou-se em agitação magnética até que a pasta estivesse homogênea. Manteve-se em repouso por 30 minutos.

Em seguida, montou-se um sistema de filtração e realizaram-se várias lavagens utilizando-se água destilada e deionizada. Após as lavagens transferiu-se a pasta para um cadinho de porcelana e levou-se a estufa por aproximadamente 3 horas à 100 °C. Posteriormente, a pasta foi transferida para um recipiente de vidro e armazenada em dessecador.

#### **4.2.8.5 Preparação dos Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados Quimicamente**

Em um béquer de 50 mL foram adicionados 1,0 mg de lapachol e 375 mg de grafite purificado. Logo após, pipetou-se 180 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mol L<sup>-1</sup> utilizando-se uma micropipeta de volume variável e transferiu-se para o béquer que continha o composto e a pasta de carbono. A pasta foi homogeneizada e transferida para um capilar. Após, a pasta ter sido adicionada no capilar, introduziu-se um fio condutor para poder realizar as medidas.

O procedimento de preparação do eletrodo modificado com o complexo de Fe<sup>II</sup> foi similar ao descrito anteriormente para o lapachol, utilizando-se as mesmas quantidades.

#### **4.2.8.6 Medidas de Voltametria Cíclica**

Os voltamogramas cíclicos dos eletrodos preparados (ligante e complexo) foram testados em um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab PGSTAT 302, utilizando uma cela eletroquímica composta por 3 eletrodos: contra-eletrodo de platina, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>), além de cada um dos eletrodos modificados que atuaram como eletrodo de trabalho. Como eletrólito utilizou-se uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Antes de realizar as medidas, o eletrodo de trabalho permaneceu submerso por aproximadamente 1 hora no eletrólito para condicionamento conforme procedimento já adotado por NGAMENI *et al.*, 2000. Os eletrodos de trabalho também permaneceram em repouso por aproximadamente 1 hora em uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> (lapachol) e aproximadamente 30 minutos em uma solução de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> (complexo).

#### **4.2.9 Testes antimicrobianos**

##### **4.2.9.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Para a determinação da CIM foram realizadas diluições da amostra (lapachol e complexo) em solução de DMSO 5%, sendo ajustadas concentrações derivadas de diluições em série 2:1 (1000, 500, 250, 125, 62,5 µg mL<sup>-1</sup>) e com valores intermediários (600, 400, 300, 200 µg mL<sup>-1</sup>), sendo totalizadas nove soluções testes.

Em seguida, foram produzidos inóculos a partir das colônias bacterianas com tempo de incubação recente, não superior a 24 horas. Com o auxílio de uma alça de platina (bacteriológica), retirou-se 2 colônias bacterianas com a mesma morfologia, e diluiu-se em tubo de ensaio contendo 4,0 mL de água salina (0,8% de NaCl diluído em água destilada), utilizando-se um agitador de tubos tipo vortex.

O inóculo produzido foi ajustado à solução padrão de 0,5 McFarland, previamente preparada, que corresponde ao padrão de turvação da bactéria *Escherichia coli* a uma concentração de 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colônias por mililitro). Quando o inóculo não alcançava a turvação padrão, eram acrescentadas colônias bacterianas, e quando superava a escala nefelométrica, era adicionada água salina. Esta

solução foi então diluída em caldo Luria-Bertani para obter um inóculo com concentração de  $5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Para a determinação da CIM foi distribuído em cada tubo de ensaio, previamente esterilizado, a alíquota de 1,0 mL de cada solução teste (nas concentrações especificadas no primeiro parágrafo deste item) e 1,0 mL da suspensão bacteriana ajustada ( $5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>), exceto no tubo de controle negativo.

Os tubos de ensaio com a solução teste foram incubados a  $35^\circ\text{C} \pm 2$  por 20 horas. Após este período foi avaliada a presença de turvação nos tubos, que indicam o crescimento bacteriano.

A partir desta aferição é possível encontrar o intervalo em que está o valor da concentração inibitória mínima, que é a menor concentração de composto capaz de inibir o crescimento microbiano.

Em cada ensaio foram incubados tubos de Controle Negativo (menor concentração do composto e caldo LB sem inóculo); e de Controle Positivo (caldo LB e suspensão bacteriana ajustada). Para cada composto foram realizadas três incubações utilizando os solventes puros, objetivando verificar a existência de atividade antimicrobiana frente as cepas bacterianas.

Os bioensaios foram realizados em duplicata com três repetições para cada cepa bacteriana; quando detectado erro ou contaminação o resultado foi descartado e a réplica do teste refeita.

#### **4.2.9.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Em conjunto aos procedimentos para determinação da Concentração Inibitória Mínima, foram iniciados os procedimentos para determinação da Concentração Bactericida Mínima pelo método de plaqueamento em meio de cultura.

Após o período de incubação para determinação da CIM foi retirada uma alíquota de 0,1 mL de cada tubo de ensaio, inclusive do controle positivo e negativo (sem inóculo). Os inóculos foram distribuídos sobre a superfície do meio de cultura em placas de petri, com o auxílio de uma alça de Drigalski próximo ao Bico de Bunsen.

As placas de petri inoculadas foram incubadas a temperatura de  $35^\circ\text{C} \pm 2$  por 20 horas. Após este período foi observado a presença de colônias bacterianas em cada placa.

A CBM foi determinada como sendo a menor concentração do composto capaz de impedir o crescimento microbiano em meio de cultura (formação de colônias bacterianas). Os bioensaios foram realizados em duplicata com três repetições para cada cepa bacteriana; quando detectado erro ou contaminação o resultado foi descartado e o teste refeito.

#### 4.2.10 Ensaio Antitumoral *in vitro*

As amostras (lapachol e complexo) foram avaliadas quanto a sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (MONKS *et. al.*, 1991).

Foram empregadas 10 linhagens de células tumorais humanas (Tabela 2). As linhagens tumorais humanas foram cedidas pelo *Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute* (NCI, EUA) e a linhagem HaCat (queratinócitos imortalizados humanos) foi doada pelo Dr. Ricardo Della Coletta (FOP, UNICAMP). Todas as linhagens foram mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Nunc<sup>®</sup>), com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco<sup>®</sup>) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 2** - Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária	Densidade de Inoculação (10 <sup>4</sup> cel mL <sup>-1</sup> )
U251	SNC; glioma	Ectoderme	3,0
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme	6,0
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme	5,0
786-0	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	3,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme	4,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
HaCaT	Pele (queratinócito)/Normal	Ectoderme	3,0

Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015. \* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos.

Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc<sup>®</sup>), de cada suspensão celular, na densidade de inoculação descrita na Tabela 2, em

meio RPMI/5% SFB, acrescido de penicilina: estreptomicina (1000 U mL<sup>-1</sup>: 1000 µg mL<sup>-1</sup>; 1,0 mL L<sup>-1</sup> RPMI). Após 24h de incubação, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL<sup>-1</sup>).

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL<sup>-1</sup>. A concentração final de DMSO não interfere no crescimento celular.

Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg mL<sup>-1</sup>. No momento da adição das amostras, foi realizada a fixação, com ácido tricloroacético (TCA) a 50%, da placa controle chamada T<sub>0</sub>, o que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de TCA a 50% e as placas incubadas por 1h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as células foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 20 min, a temp. ambiente; em seguida, lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10 mM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração de cada amostra, o crescimento celular expresso em porcentagem foi calculado segundo as seguintes fórmulas:

Se  $T > T_1 \rightarrow$  estímulo de crescimento celular

Se  $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$  atividade citostática:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se  $T < T_0 \rightarrow$  atividade citocida:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

$T_1$  = absorvância do branco de células.

$T_0$  = absorvância do controle de células na placa  $T_0$ .

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada, para cada uma das linhagens testadas. Uma concentração efetiva denominada TGI (do inglês *total growth inhibition*, concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular) foi calculada em função do tipo de gráfico obtido, por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 8.0.

#### **4.2.11 Extração do Lapachol**

A extração da naftoquinona natural lapachol foi realizada partindo-se de 100 g de serragem de ipê em béquer contendo diclorometano (quantidade suficiente para cobrir a serragem), mantendo-se em constante agitação e aquecimento por 30 minutos. Após o término da primeira etapa, filtrou-se a serragem em sistema de vácuo, utilizando funil de büchner e evaporou-se a solução em evaporador rotativo. Recristalizou-se o extrato obtido em etanol repetidamente, induzindo-se a sua precipitação com água destilada (FÁRFAN *et. al.*, 2012) até a obtenção do produto puro (Figura 10). A pureza do composto extraído foi de 90,3% segundo dados obtidos via titulação potenciométrica (item 5.7.2).

**Figura 10** – Lapachol extraído da serragem de ipê.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

#### **4.2.12 Síntese do Complexo**

A síntese do complexo foi realizada a partir de estequiometria 2:1 lapachol/Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. A uma solução de lapachol em metanol (0,136 g), sob ultrassonificação, adicionou-se três gotas de trietilamina e posteriormente o sal perclorato de Fe<sup>II</sup> (0,0637 g), previamente solubilizado em água. A solução foi mantida por 30 min em banho ultrassom. O precipitado resultante de coloração vermelho escuro (Rendimento: 51,23%; P.F: >310°C) foi filtrado, lavado, seco em dessecador e caracterizado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ponto de Fusão e Teste de Solubilidade

O ponto de fusão obtido para o lapachol extraído, encontrou-se dentro do previsto na literatura, na faixa de 139-141°C (ARAÚJO et. al., 2002), enquanto para o complexo metálico não houve fusão até a temperatura de 310°C, ocorrendo somente o escurecimento da amostra em temperatura de 190°C; esta mudança foi provavelmente ocasionada devido a coordenação da naftoquinona natural ao íon metálico.

Para facilitar a realização das demais técnicas de caracterização e também como forma inicial de diferenciar fisicamente o complexo do ligante livre, realizou-se o teste de solubilidade de ambos em diversos solventes. Conforme observado na Tabela 3, o lapachol apresentou-se solúvel em praticamente todos os solventes utilizados, tendo como exceção a água, enquanto que o complexo apresentou melhor solubilidade em solventes como acetona, DMF, DMSO e diclorometano. Os testes foram realizados à temperatura de aproximadamente 25°C.

**Tabela 3** – Comparação das solubilidades do ligante e complexo.

<b>Solvente</b>	<b>Solubilidade Lapachol</b>	<b>Solubilidade Complexo</b>
<b>Água</b>	Insolúvel	Insolúvel
<b>Etanol</b>	Solúvel	Parcialmente Solúvel
<b>Metanol</b>	Solúvel	Insolúvel
<b>Isopropanol</b>	Solúvel	Insolúvel
<b>Acetonitrila</b>	Solúvel	Parcialmente Solúvel
<b>Acetona</b>	Solúvel	Solúvel
<b>Dimetilformamida (DMF)</b>	Solúvel	Solúvel
<b>Dimetilsulfóxido (DMSO)</b>	Solúvel	Solúvel
<b>Diclorometano</b>	Solúvel	Solúvel
<b>Clorofórmio</b>	Solúvel	Solúvel
<b>Éter Etílico</b>	Solúvel	Insolúvel
<b>Hexano</b>	Solúvel	Insolúvel

Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.



## 5.2 Análise elementar de CHN

Para se alcançar uma elucidação estrutural adequada do complexo metálico de Fe(II) realizou-se a análise elementar de CHN, a partir da qual se sugere um composto com fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub>Fe e massa molar 610,44 g mol<sup>-1</sup>. As porcentagens de carbono e hidrogênio obtidas através da análise elementar encontram-se descritas na Tabela 4. As discrepâncias observadas nos valores de porcentagens de hidrogênio podem ser atribuídas a impurezas adquiridas no preparo da amostra ou umidade obtida durante o envio da mesma para a análise.

**Tabela 4** - Porcentagens obtidas e calculadas para análise elementar do composto C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub>Fe.

	Calculado	Encontrado
% C	59,03%	59,29%
% H	5,61%	4,77%

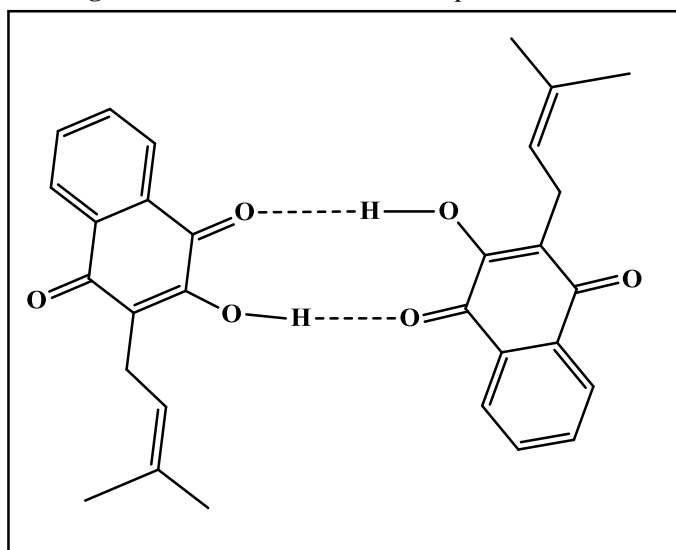
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

## 5.3 Espectroscopia no Infravermelho

### 5.3.1 Lapachol

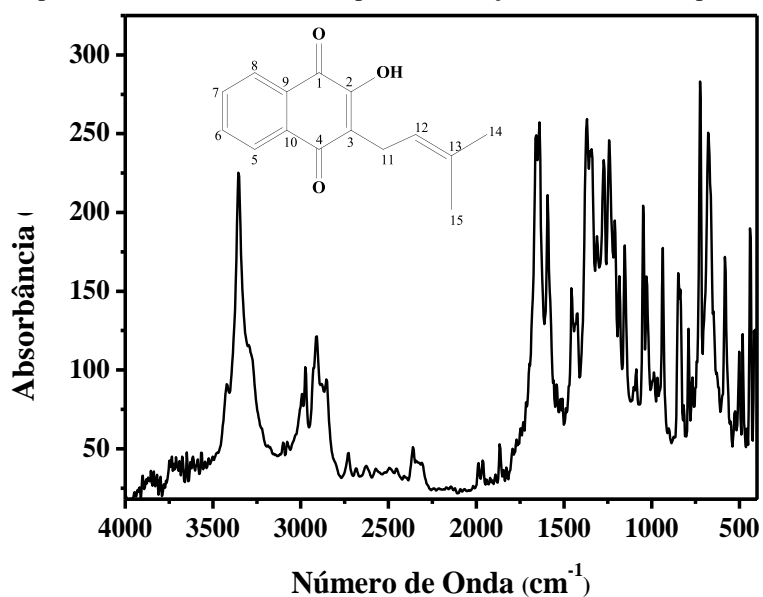
Em seu estado sólido o lapachol apresenta-se em grande parte na sua forma dimérica (Figura 11), onde esta estrutura encontra-se estabilizada por ligações de hidrogênio intermoleculares entre os oxigênios da carbonila e da hidroxila. Em seu espectro infravermelho (Figura 12) observa-se uma banda aguda bastante característica situada em 3351 cm<sup>-1</sup>, a qual é atribuída ao estiramento O-H fenol, presente no C-2 quando o mesmo encontra-se em interação de hidrogênio, enquanto a banda pouco intensa observada em 3425 cm<sup>-1</sup>, refere-se a fração monomérica na qual a hidroxila encontra-se livre. Demais bandas características podem ser observadas, como as bandas em 1643 e 1662 cm<sup>-1</sup>, referentes aos estiramentos das ligações C=O da quinona, presentes nos C-1 e C-4, e as bandas em 2993, 2973, 2912 e 2854 cm<sup>-1</sup>, referentes, respectivamente, aos estiramentos CH (C-12), CH<sub>3</sub> (14 e 15) e CH<sub>2</sub> (C-11). Na região de 1369 cm<sup>-1</sup>, observa-se a banda característica de vibrações C-H deformação do tipo tesoura e, em 724 cm<sup>-1</sup>, encontram-se as vibrações fora do plano do anel aromático (CARUSO *et. al.*, 2009; PARRILHA *et. al.*, 2012; MARTÍNEZ *et. al.*, 2003).

Figura 11 - Estrutura dimérica do lapachol.



Fonte: PARRILHA *et. al.*, 2012.

Figura 12 - Espectro no infravermelho do lapachol. Inserção: estrutura do lapachol enumerada.



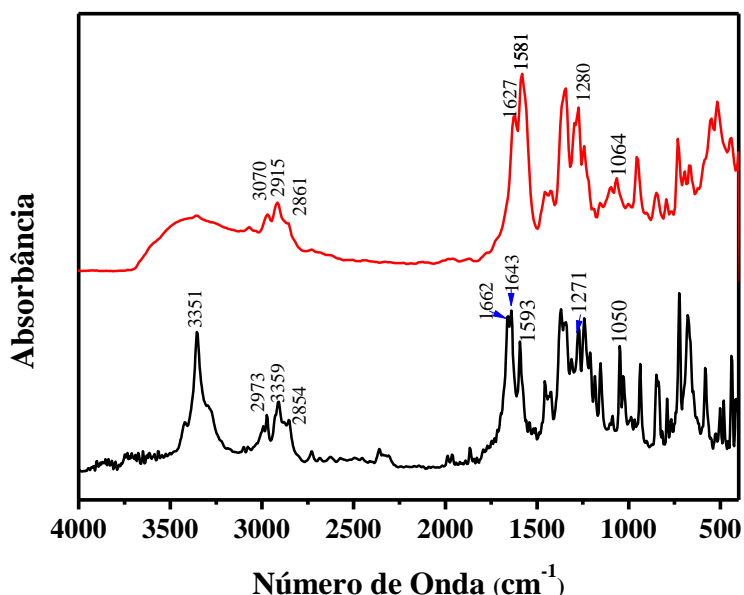
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

### 5.2.2 Complexo

Ao se observar o espectro infravermelho comparativo entre o ligante natural e complexo de ferro (Figura 13) notam-se visíveis distinções. O desaparecimento da banda aguda referente ao grupo O-H presente no C-2 é um fato importante, pois permite prever a coordenação através de oxigênio fenólico; o alargamento na mesma região pode ser um

indicativo da presença de água na estrutura do composto. As bandas dos grupos C=O (C1 e C4) encontram-se em menores números de onda, sendo que esse deslocamento é observado em vários complexos da literatura utilizando a quinona natural (CARUSO *et. al.*, 2009; MOLINA *et. al.*, 2007; FARFÁN *et. al.*, 2012; PARRILHA *et. al.*, 2012; MARTÍNEZ *et. al.*, 2003). As alterações nos dois grupos funcionais citados sugerem que a coordenação pode ter ocorrido de forma bidentada através de oxigênios carbonílico e fenólico. As bandas referentes aos grupos CH, CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub> sofreram alterações no complexo, sendo observadas, respectivamente, em 3070, 2969, 2915 e 2861 cm<sup>-1</sup>.

Figura 13 - Espectro infravermelho comparativo entre o lapachol (preto) e o complexo (vermelho).

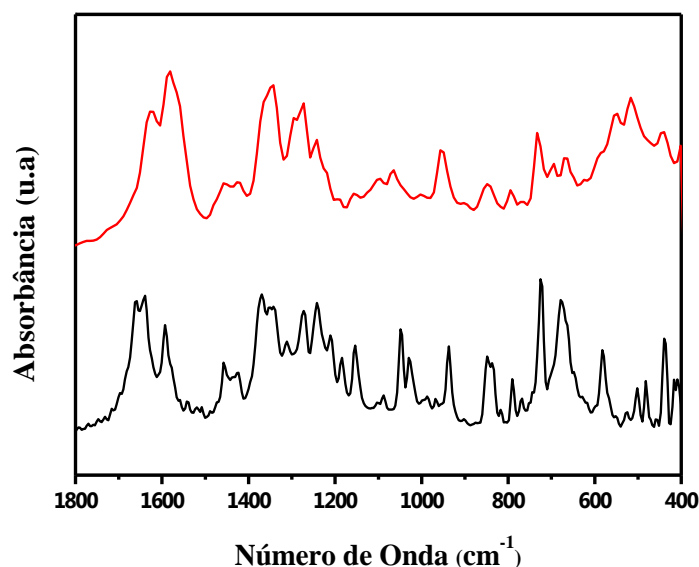


Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

A Figura 14 apresenta a ampliação do espectro comparativo entre o ligante e o complexo, para que se possa melhor visualizar as modificações ocorridas na faixa de 1800-400 cm<sup>-1</sup>. As bandas atribuídas aos grupos C=O sofreram deslocamentos para maior energia, onde o grupo presente no C4 pode ser observado em 1573 cm<sup>-1</sup>, enquanto o presente no C1 encontra-se em 1635 cm<sup>-1</sup>; neste último caso, a mudança pode ser atribuída a coordenação de C1O1 que faz com que ocorra uma diminuição na ordem da ligação, fazendo com que haja um deslocamento no número de onda. Outras alterações podem ser

notadas após a ocorrência da coordenação, tais como o estiramento C-O (fenol) e deformação C=C-O (fenol) que podem ser encontradas em maiores números de onda (1064 e 1280 cm<sup>-1</sup>). As vibrações fora do plano do anel aromático foram observadas em 732 cm<sup>-1</sup>. A tabela 5 sumariza as principais bandas do lapachol comparadas ao complexo de Fe<sup>II</sup> e com demais complexos encontrados na literatura.

Figura 14 - Ampliação do espectro IV comparativo entre o lapachol (em preto) e o complexo (em vermelho).



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Tabela 5 - Principais bandas e atribuições, em cm<sup>-1</sup>, dos espectros no IV para o lapachol livre, para o complexo e alguns complexos da literatura (baseados no lapachol).

	Lap.	Complex. *	Complex. 1	Complex. 2	Complex. 3	Complex. 4
v(O-H <sub>fenol</sub> )	3351	-----	-----	-----	-----	-----
v(C=O)	1643	~1627	1641	1624	1630	1621
v(C=O)	1662	1581	1562	1551	1585	1582
v(C-O <sub>fenol</sub> )	1050	1064	1058	1057	X	X
δ(C=C-O <sub>fenol</sub> )	1271	~1280	X	X	1276-1275	1276-1275
v(C=C)	1593	sobreposta	X	X	X	X
v(C-H)	2973	3070	X	X	X	X
v(CH <sub>2</sub> )	2854	2915	X	X	X	X
v(CH <sub>3</sub> )	2912	2861	X	X	X	X

X= não atribuído; Lap.: lapachol; Complex. \*: apresentado neste trabalho; Complex. 1: (LP)(Ph<sub>3</sub>Sb)OH (DE OLIVEIRA *et.al.*, 2011); Complex. 2: (LP)<sub>2</sub>(Ph<sub>3</sub>Bi)<sub>2</sub>O (DE OLIVEIRA *et.al.*, 2011); Complex. 3: Co(Lap)<sub>2</sub>(DMF)<sub>2</sub> (FARFÁN *et.al.*, 2012); Complex. 4: Cu(Lap)<sub>2</sub>(DMF)<sub>2</sub> (FARFÁN *et.al.*, 2012).

Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Através dos dados apresentados na tabela 5, nota-se que os resultados encontrados para complexo de Fe<sup>II</sup> estão coerentes com os demais complexos apresentados na literatura, que demonstram que a coordenação na naftoquinona lapachol ao íon metálico ocorreu de forma bidentada, adquirindo função ceto-enólica.

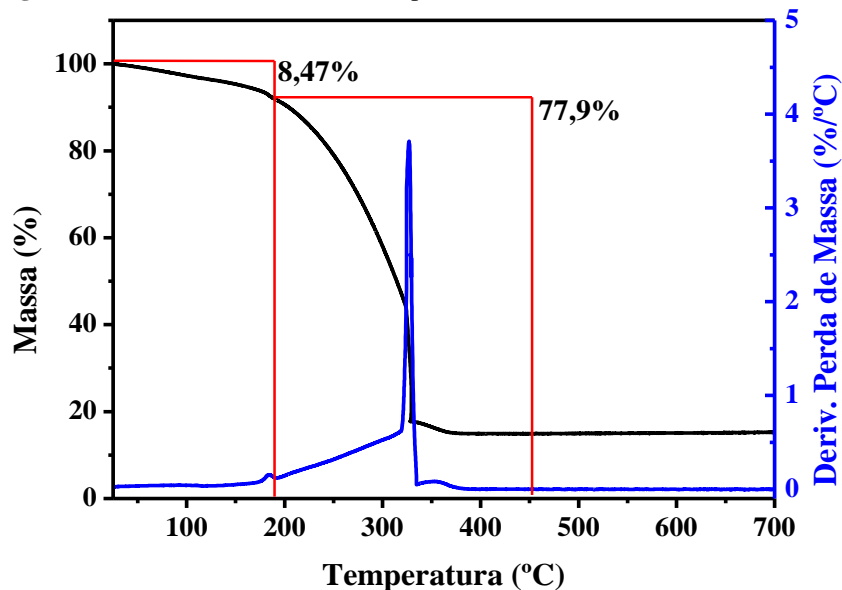
### **5.3 Análise Térmica**

A análise termogravimétrica, além de propiciar informações sobre as propriedades térmicas do composto, auxiliou também na caracterização estrutural do mesmo, sendo complementar as demais técnicas e contribuindo assim para a fórmula molecular proposta. A Figura 15 apresenta a curva termogravimétrica obtida para o complexo de Fe<sup>II</sup>.

Observa-se que o composto apresentou curvas pouco definidas, onde pode-se atribuir duas principais perdas: a primeira, até a temperatura de ~190,35°, com uma porcentagem de ~8,47% em massa (teórico 8,85%), é atribuída a perda das águas de hidratação e de uma água de coordenação; a partir desta temperatura inicia-se a perda de matéria orgânica do ligante, juntamente com a última molécula de água coordenada, apresentando uma porcentagem de ~77,9% em massa (teórico 81%). A temperatura de início da decomposição do lapachol encontra-se na mesma faixa em que se observou um escurecimento da amostra na análise de ponto de fusão, sendo que o fim da curva encontra-se também de acordo, já que a perda é finalizada em temperaturas muito acima de 310° (temperatura máxima do termômetro utilizado).

O resíduo final de 15% foi atribuído a um oxo-hidroxo de ferro, com forma molecular desconhecida Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>H<sub>z</sub>, já que íon metálico possui capacidade de formar diversos compostos deste tipo (CARUSO *et. al.*, 2009; FARFÁN *et. al.*, 2009; FARFÁN *et. al.*, 2012; FARFÁN *et. al.*, 2015; BALEK & SUBRT, 1995; FÖLDVÁRI, 2011).

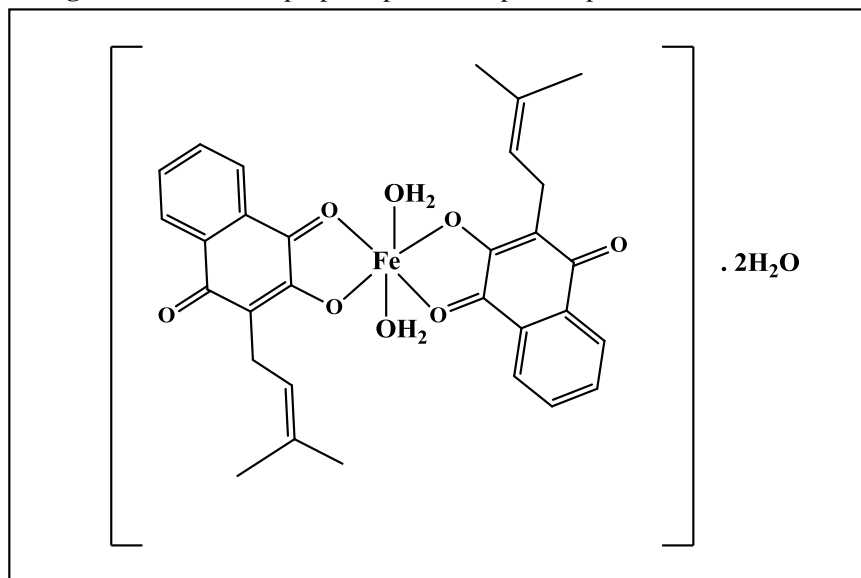
Figura 15 - Curvas TG e DTG do complexo de  $Fe^{II}$  em atmosfera de ar sintético.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

A análise termogravimétrica mostrou-se coerente com as demais técnicas realizadas (ponto de fusão, análise elementar e infravermelho), permitindo prever uma possível estrutura para o complexo metálico sintetizado (Figura 16).

Figura 16 – Estrutura proposta para o complexo lapacholato- $Fe^{II}$ .



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

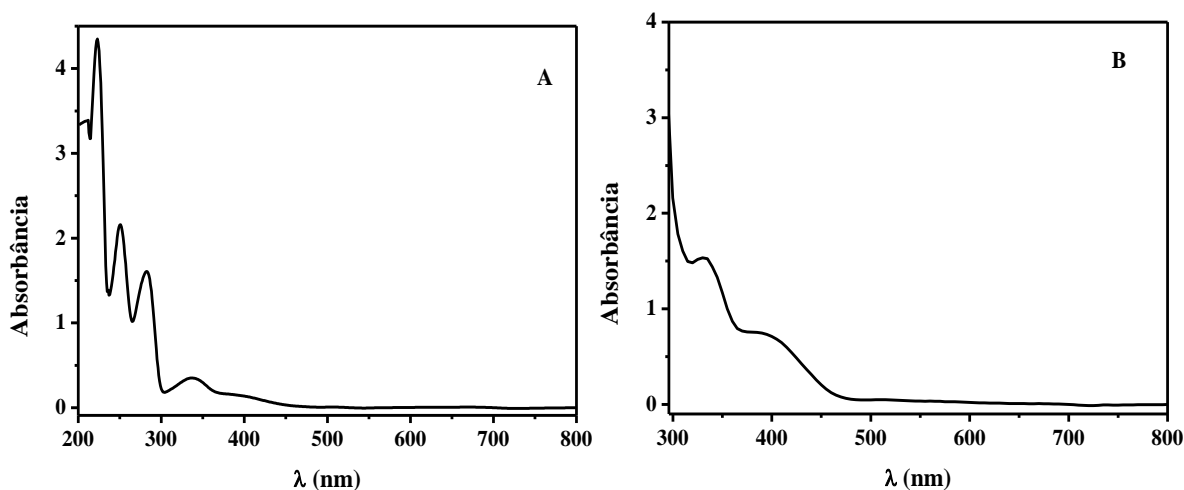
## 5.4 Espectroscopia no UV-Vis

A fim de auxiliar na caracterização do composto extraído realizou-se o estudo do espectro de absorção do mesmo. Compostos quinonoídicos apresentam em seu espectro eletrônico bandas referentes às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos anéis aromáticos localizadas entre 211-280 nm, bem como absorções referentes às transições  $n \rightarrow \pi^*$  das carbonilas das quinonas, observadas entre 300-344 nm e entre 460, 490 e 549 nm (FARIAS, 1998).

O lapachol em diclorometano apresentou bandas de absorção características (Figura 17A) que podem ser observadas com máximos em 223, 249, 282 e 330 nm, sendo a primeira banda atribuída as transições eletrônicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  do anel aromático, as duas bandas posteriores relacionadas com as transições no sistema quinonoídico e a última decorrente de transições  $n \rightarrow \pi^*$  das carbonilas, características das naftoquinonas (CARUSO *et. al.*, 2009; FARFÁN *et. al.*, 2012; MARTÍNEZ *et. al.*, 2003).

Já no solvente DMSO (Figura 17B) o composto apresentou somente duas bandas na região de 330 e 400 nm, o que é característico da naftoquinona em meios que não possuem hidrogênio facilmente ionizável (BODINI & ARANCIBIA, 1989).

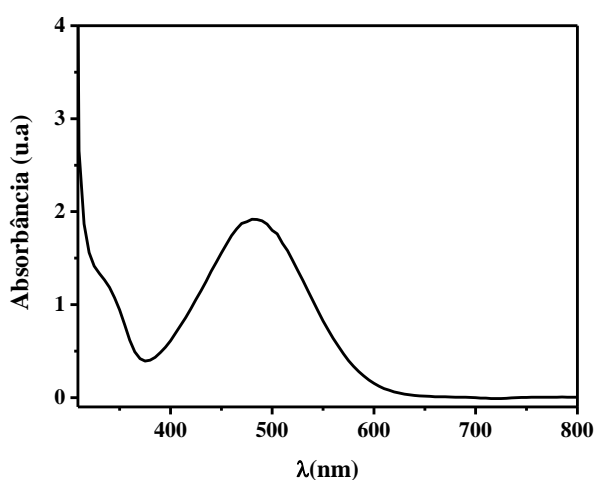
**Figura 17**– Espectro eletrônico do lapachol em diclorometano (A) e DMSO (B). Concentração:  $5,0 \times 10^{-5}$ .



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Sabe-se que em meio básico (exemplo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) o lapachol reage formando seu sal sódico, adquirindo coloração vermelho intensa e possuindo absorção característica presente na região entre 400-600 nm (OSSOWSKI et.al., 2008). Realizou-se então como forma de caracterização e de comprovar a real obtenção da naftoquinona natural a medida de absorção de seu sal sódico, obtido a partir da solubilização da naftoquinona em solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,024 mol L<sup>-1</sup>) (Figura 18).

**Figura 18** – Espectro eletrônico do sal lapacholato de sódio.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

#### **5.4.1. Complexo**

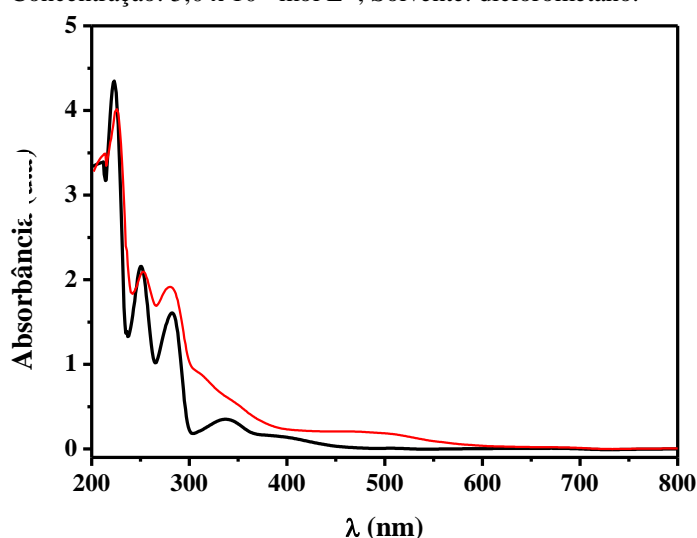
Com o intuito de caracterizar e confirmar a coordenação da naftoquinona ao íon metálico obteve-se também o espectro no UV-Vis do complexo sintetizado. O espectro eletrônico do complexo de Fe<sup>II</sup> (Figura 19) apresenta distinções quando relacionado ao ligante livre, notando-se sutis deslocamentos nas bandas presentes em 223 e 282 nm, onde na última banda ocorre um deslocamento hipsocrômico para 278 nm. Observa-se o desaparecimento da banda atribuída as transições  $n \rightarrow \pi^*$  (330 nm) do lapachol, diretamente relacionada com a ocorrência da coordenação da naftoquinona através de oxigênio carbonílico C-1, bem como o aparecimento de uma banda com máximo de absorção em 480 nm, provavelmente decorrente da coloração avermelhada do composto, podendo a mesma também ser atribuída a transferências de carga do tipo TCML (fenolato  $\rightarrow$  ferro<sup>II</sup>)



(MARTÍNEZ *et. al.*, 2003; FARFÁN *et. al.*, 2009; FARFÁN *et. al.*, 2012; FARFÁN *et. al.*, 2015).

Diferenças de intensidade de absorção também ocorreram a partir da coordenação ao íon metálico: as bandas em 223 e 249 nm apresentaram efeito hipocrômico, enquanto a banda em 278 nm sofreu efeito hiperocrômico. Os diferentes perfis observados no espectro confirmam a coordenação do ligante natural ao íon metálico.

**Figura 19** - Espectro eletrônico comparativo entre o lapachol (preto) e o complexo (vermelho).  
Concentração:  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solvente: diclorometano.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

#### 5.4.2 Absortividade Molar

A absortividade molar está relacionada com a capacidade de transições eletrônicas ocorrerem em uma molécula (ARAÚJO *et. al.*, 2014), sendo uma grandeza característica de cada composto. Desta forma, foram realizados experimentos para calcular esta grandeza para o ligante e o complexo, a fim de confirmar as diferenças na intensidade de absorção observadas no espectro eletrônico que compara os compostos.

Os valores foram obtidos a partir da equação de Lambert Beer:

$$\epsilon = \frac{A}{b \cdot c}$$

Onde  $\epsilon$  é a absortividade molar, **A** absorbância, **b** concentração molar da amostra e **c** caminho óptico.

A análise foi realizada para o lapachol (Figura 20) e o complexo (Figura 21) utilizando-se como solvente diclorometano (grau espectroscópico), sendo que os resultados obtidos (Tabela 6) mostram diferenças nos valores de absorvidade.

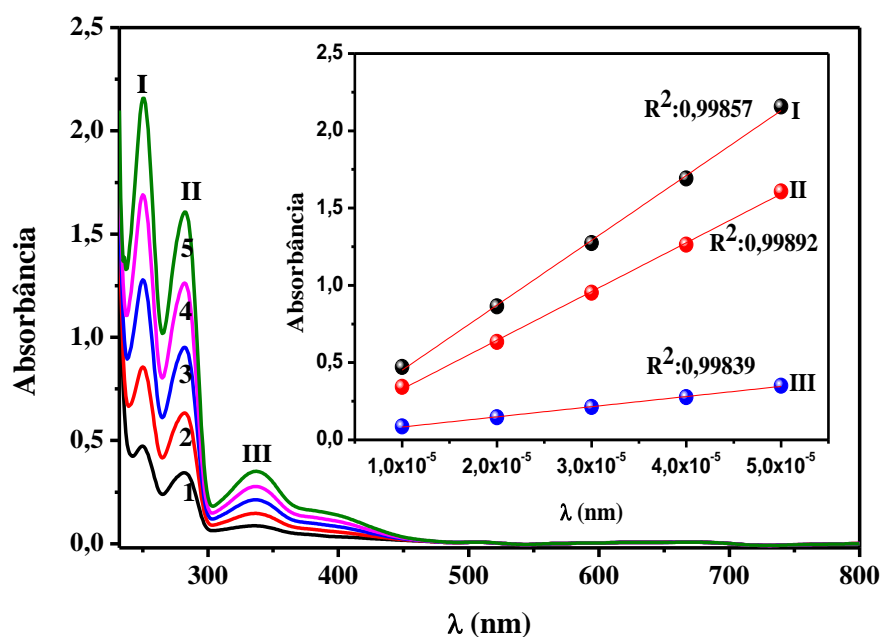
**Tabela 6** - Valores de absorvidade molar para o lapachol e complexo, expressos em mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

	<b>Banda I</b>	<b>Banda II</b>	<b>Banda III</b>	<b>Banda IV</b>
<b>Lapachol</b>	42.719	31.787	7.092	X
<b>Complexo</b>	42.024	37.659	X	3.612

Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

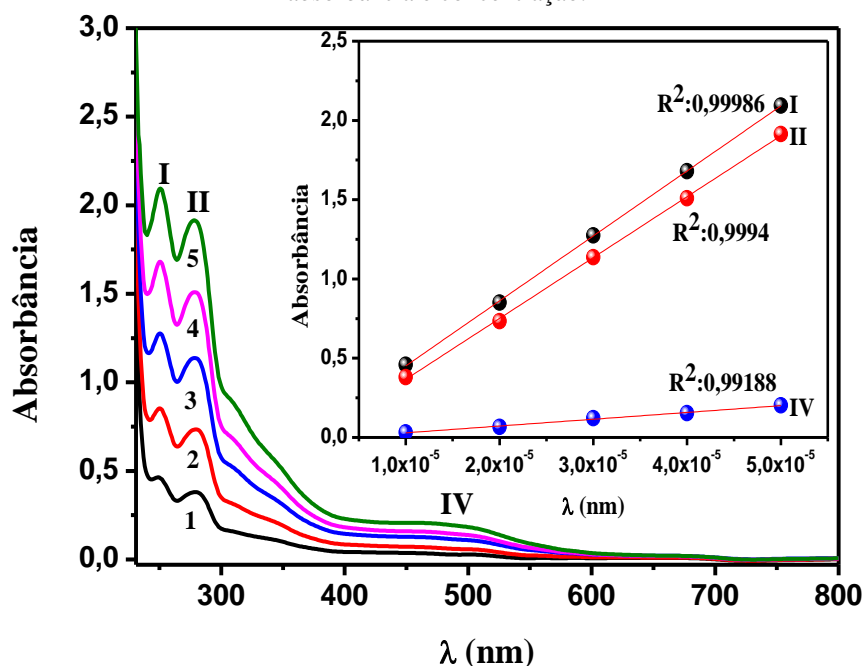
Através dos valores de absorvidade molar pode-se confirmar o já observado no espectro eletrônico comparativo ligante/complexo (item 5.4.1, Figura 19), já que o valor de absorvidade foi inferior no complexo para a banda I (efeito hipocrômico) e significativamente superior para a banda II (efeito hiperocrômico). A banda IV presente somente no espectro do complexo apresentou absorvidade molar de 3.612 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, valor característico de transferência de carga TCLM, um importante indicativo da ocorrência da coordenação.

**Figura 20** - Espectro de eletrônico do lapachol. Solvente diclorometano, em concentrações de (1) 1,0 x 10<sup>-5</sup>, (2) 2,0 x 10<sup>-5</sup>, (3) 3,0 x 10<sup>-5</sup>, (4) 4,0 x 10<sup>-5</sup> e (5) 5,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>. Inserção: curvas analíticas relacionando absorbância e concentração.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

**Figura 21** - Espectro de eletrônico do complexo. Solvente diclorometano, em concentrações de (1)  $1,0 \times 10^{-5}$ , (2)  $2,0 \times 10^{-5}$ , (3)  $3,0 \times 10^{-5}$ , (4)  $4,0 \times 10^{-5}$  e (5)  $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Inserção: curvas analíticas relacionando absorvância e concentração.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

## 5.5 Espectroscopia de Fluorescência

Para a caracterização dos compostos através de luminescência, inicialmente realizou-se um mapa de contorno 3D do ligante natural e do complexo metálico (Figura 22) com o intuito de observar a região de maior intensidade de luminescência dos mesmos.

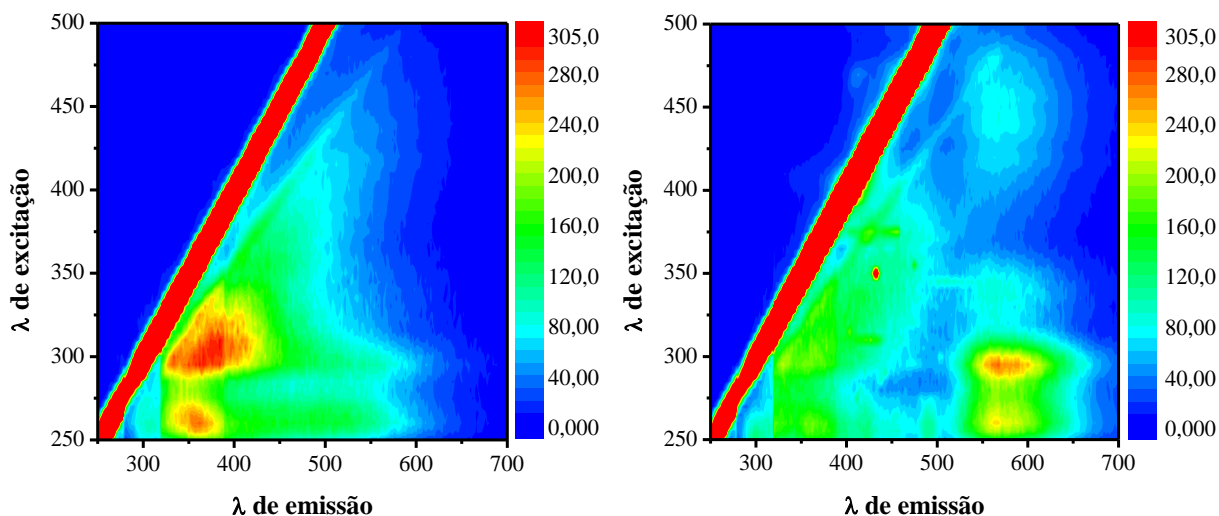
Os espectros de emissão do ligante e do complexo (Figura 23) foram plotados excitando-se na região de 295 nm. Os perfis observados são nitidamente distintos, nota-se que no complexo metálico há uma banda característica do lapachol com máximo de emissão em 330 nm provavelmente decorrente de suas transições intra-ligantes ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), bem como o surgimento de uma nova banda situada na região do vermelho (~566 nm) que pode ser atribuída as transferências de carga ligante  $\rightarrow$  metal (HUANG & ZHANG, 2014), sendo que estes dados são concordantes com os resultados obtidos nos estudos espectroscópicos por absorção.

A intensidade de luminescência apresentada pelo complexo foi inferior à do ligante livre, efeito conhecido como Chelation Enhancement Quenching effect (CHEQ), que segundo Formica e colaboradores (2012) pode ser observado como efeito da coordenação

ao íon metálico. Este fato é importante, pois evidencia que o ligante permanece apresentando comportamento quelato (coordenado de forma bidentada) mesmo quando em solução (o complexo mantém sua identidade).

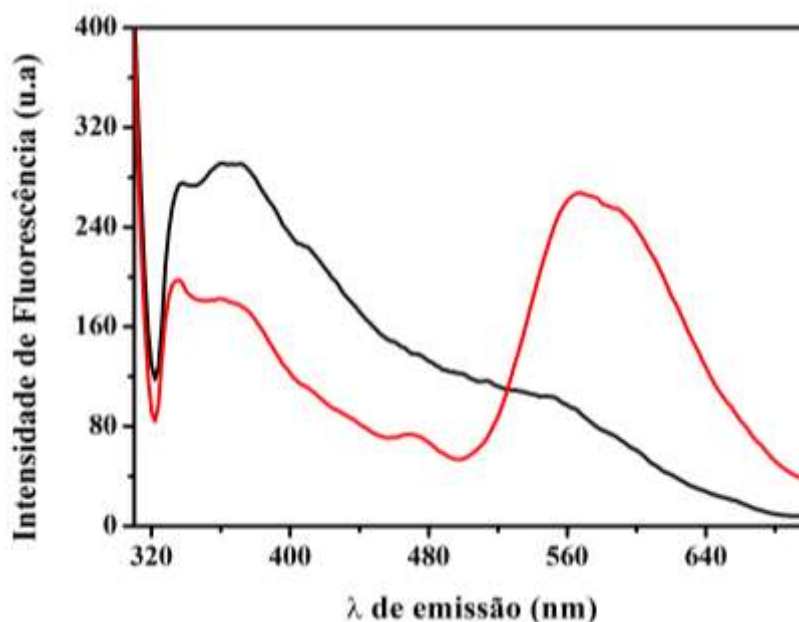
O efeito CHEQ pode estar relacionado a diferentes tipos de mecanismos eletrônicos, como por exemplo a transferência eletrônica fotoinduzida (PET) e a do tipo transferência de carga fotoinduzida (PCT). Uma diferença entre os dois mecanismos está relacionada a deslocamentos no comprimento de onda das bandas de emissão: a resposta fluorescente do tipo PET não ocasiona qualquer deslocamento espectroscópico das bandas, enquanto no PCT este deslocamento é significativo (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 2002; DEMCHENKO, 2009; FORMICA, 2012). Desta forma, como não ocorre deslocamentos nas bandas nem de emissão e nem de absorção para o complexo, como já observado, infere-se que o mecanismo envolvido é do tipo PET.

**Figura 22** - Mapa de contorno do lapachol (esquerda) e do complexo (direita).



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

**Figura 23** - Espectro de emissão comparativo: lapachol (preto) e complexo (vermelho). Concentração:  $6,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solvente: diclorometano.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

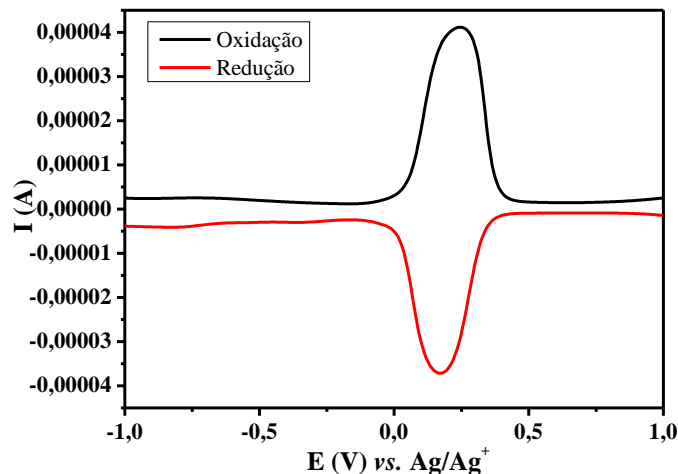
## 5.7 Caracterização do Ligante e Complexo por Técnicas Eletroanalíticas

### 5.7.1 Voltametria de Onda Quadrada

Os comportamentos eletroquímicos do lapachol e do complexo foram investigados através da técnica voltamétrica de onda quadrada, sendo que todos os valores dos potenciais foram referenciados versus  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$  (GAGNÉ, 1980), onde  $E(\text{Fc}^+/\text{Fc}) = 0,209 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$  (Figura 24).

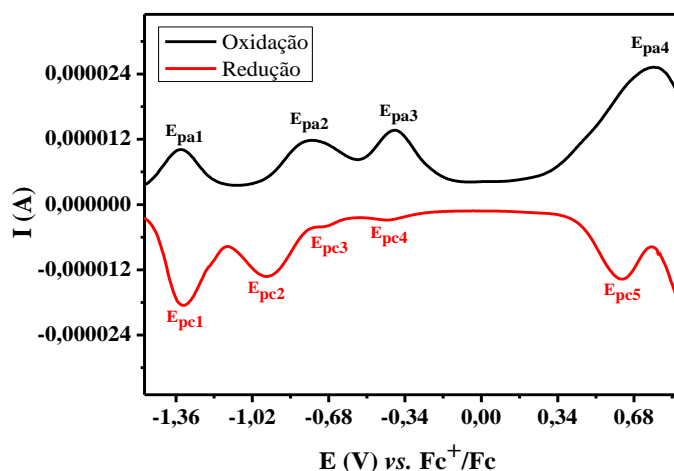
No caso do voltamograma de onda quadrada do lapachol (Figura 25 e Tabela 7), observam-se quatro picos de oxidação e cinco de redução, dos quais pode-se considerar três pares de picos quase-reversíveis e três irreversíveis. Antes de atribuir a que processos correspondem cada um destes picos, é necessário expor algumas considerações quanto às características eletroquímicas das quinonas.

**Figura 24** – Voltamogramas de onda quadrada do par redox ferrocínio/ferroceno ( $Fc^+/Fc$ ) utilizado como padrão interno. Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho),  $Ag/Ag^+$  (referência) e fio platina (auxiliar).



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

**Figura 25** – Voltamogramas de onda quadrada do lapachol. Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho),  $Ag/Ag^+$  (referência) e fio platina (auxiliar).



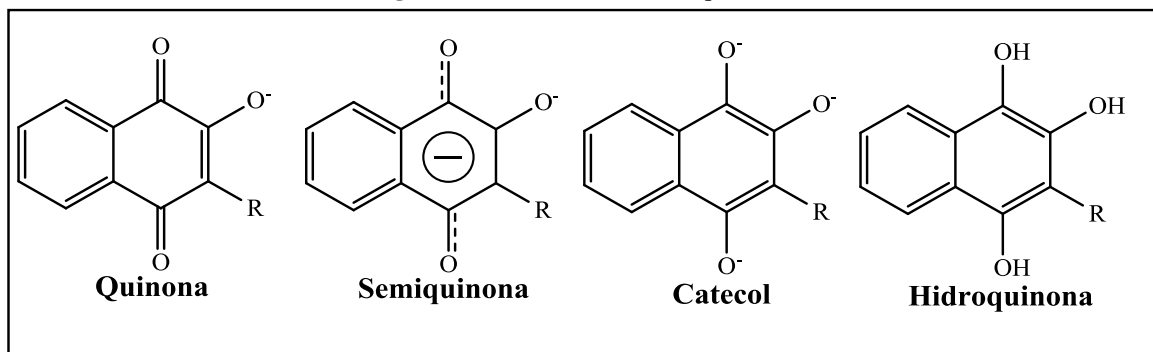
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Embora sejam amplamente conhecidas várias formas redox das quinonas, algumas das quais representadas na Figura 26, há ainda certa controvérsia na literatura quanto a correta atribuição dos processos eletroquímicos obtidos a partir das mesmas, uma vez que inúmeros fatores (como tautomerização, protonação/desprotonação, formação de ligações de hidrogênio, formação de espécies radiculares, entre outros) podem influenciar no mecanismo, originando diversas outras espécies e consequentemente dificultando a

interpretação. Estudos de revisão sobre as propriedades eletroquímicas de quinonas em diferentes meios, alguns dos quais com acompanhamento conjunto com técnicas espectroscópicas (como RPE e UV-Vis), permitem a proposição de mecanismos redox (LUCAS, 2015; KATHAWATE, 2013; BUSTAMANTE, 2012; GUIN *et. al.*, 2011; EBELLE, 2010; BOURROUET, 2010; KLUPFEL, 2009; GOULART, 2003; WIPF *et. al.*, 1986). Considerando somente o ponto de vista redutivo, ocorre inicialmente uma etapa de transferência eletrônica (ganho de um elétron), seguida por uma etapa de protonação, sendo o produto formado uma semiquinona radicalar (Q-OH/Q-OH<sup>•</sup>). Esta espécie, altamente reativa, influi significativamente na formação de várias outras espécies, dentre as quais sugere-se a formação de ânions ou diânions radicalares (Q-OH<sup>•</sup>/Q-O<sup>•-</sup>, Q-OH<sup>•</sup>/Q-O<sup>2-</sup>), que posteriormente originam formas catecolatos (O<sup>-</sup>-Q-O<sup>-</sup>); a partir dos catecolatos podem ser formados hidroquinonas (HO-Q-OH), obtidas por mais um ganho eletrônico e protonação. Paralelamente, também podem estar ocorrendo equilíbrios ceto-enólicos com formação de uma estrutura dimérica da quinona, bem como formação de bases conjugadas 2-hidroxinaftoquinonas, entre outras.

Dessa forma, supõe-se que para a resposta eletroquímica do lapachol (Figura 26 e Tabela 7): o par quase-reversível ( $E_{pa1} = -1,334 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$ ;  $E_{pc1} = -1,326 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$ ) pode ser relacionado ao equilíbrio envolvendo a formas hidroquinonoídicas, enquanto o par ( $E_{pa2} = -0,753 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$ ;  $E_{pc2} = -0,947 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$ ) é atribuído a formação das espécies catecolatos; o par quase-reversível ( $E_{pa4} = 0,767 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$ ;  $E_{pc5} = 0,631 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$ ) pode ser atrelado a formação da semiquinona radicalar. Esta por sua vez, devido a sua alta reatividade, forma uma série de outras espécies radicalares (ânions ou diânions radicalares), que podem ser responsáveis pelas pequenas respostas redutivas irreversíveis localizadas em  $-0,683$  ( $E_{pc3}$ ) e  $-0,423$  ( $E_{pc4}$ ) V vs.  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$ , devido a sua deposição na superfície do eletrodo de trabalho. O processo irreversível localizado em  $E_{pa3} = -0,387 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$  é de difícil atribuição, haja visto as inúmeras reações químicas acopladas as espécies anteriormente citadas (LUCAS, 2015; KATHAWATE, 2013; BOURROUET, 2010).

Figura 26 - Formas redox das quinonas.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

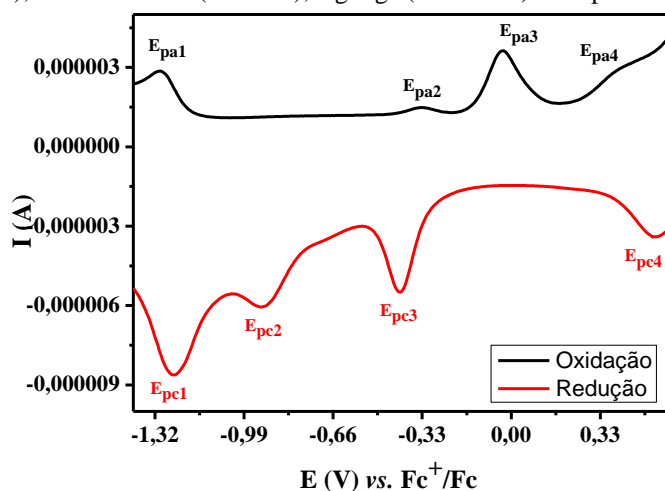
Os voltamogramas do complexo (Figura 27) mostram ligeiras alterações no perfil e consequentemente nos valores dos potenciais, as quais são oriundas do processo de coordenação ao centro metálico, que influencia significativamente na distribuição eletrônica.

O par redox quase-reversível ( $E_{pa1} = -1,301 \text{ V vs. } Fc^+/Fc$ ;  $E_{pc1} = -1,252 \text{ V vs. } Fc^+/Fc$ ) é atribuído ao centro metálico ( $Fe^{II}/Fe^{III}$ ), sendo que estes processos podem estar se sobrepondo aos oriundos das espécies hidroquinonoídicas. Os demais processos estão relacionados ao ligante. A princípio ocorre a formação da forma catecolato ( $E_{pc2} = -0,922 \text{ V vs. } Fc^+/Fc$ ), entretanto, não se observa a reversibilidade do processo como ocorria no lapachol livre, sendo que o potencial redutivo é ligeiramente menor; estes efeitos são devido a interação oxigênio-ferro<sup>II</sup>. Esta mesma interação afeta também no processo redox quase-reversível ( $E_{pa4} = 0,421 \text{ V vs. } Fc^+/Fc$ ;  $E_{pc4} = 0,532 \text{ V vs. } Fc^+/Fc$ ), correlacionado a formação da semiquinona radicalar e que é significativamente deslocado para menores potenciais quando comparado ao do lapachol livre.

Outra importante modificação é verificada no perfil do processo atribuído a formação das espécies aniônicas radicalares, onde visualiza-se um pico mais intenso e que pode ser um indicativo de maior estabilidade destas espécies. Os demais processos irreversíveis localizados em  $-0,329 \text{ V vs. } Fc^+/Fc$  ( $E_{pa2}$ ) e  $-0,028 \text{ V vs. } Fc^+/Fc$  ( $E_{pa3}$ ) não podem ser convenientemente atribuídos em virtude dos vários equilíbrios químicos-eletoquímicos presentes.



**Figura 27** – Voltamogramas de onda quadrada do complexo de ferro<sup>II</sup>. Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho), Ag/Ag<sup>+</sup> (referência) e fio platina (auxiliar).



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

**Tabela 7**– Valores de Potenciais em V vs Fc<sup>+</sup>/Fc para o lapachol e o complexo.

	Lapachol	Complexo
<i>Potenciais de Pico Anódico</i>		
<b>E<sub>pa1</sub></b>	-1,334	-1,301
<b>E<sub>pa2</sub></b>	-0,753	-0,329
<b>E<sub>pa3</sub></b>	-0,387	-0,028V
<i>Potenciais de Pico Catódico</i>		
<b>E<sub>pc1</sub></b>	-1,326	-1,252
<b>E<sub>pc2</sub></b>	-0,947	-0,922
<b>E<sub>pc3</sub></b>	-0,683	-0,411
<b>E<sub>pa4</sub></b>	0,767	0,421
<b>E<sub>pc4</sub></b>	-0,423	0,532
<b>E<sub>pc5</sub></b>	0,631	X

Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Conforme salientamos anteriormente, a atividade biológica das quinonas está associada ao seu grupo *orto* ou *para* quinona que geralmente aceita um e/ou dois elétrons (ciclo redox) para formar, *in situ*, a semiquinona radicalar, ânions radicalares ou os diânions correspondentes e catecolatos (Figura 26) (CHEMIN *et. al.*, 2001). Estas espécies podem ter participação fundamental em processos vitais, assim como podem, em outros casos, danificar biomoléculas, como ADN e proteínas, alterando e possivelmente controlando a sua atividade biológica (LUCAS, 2015). Desta forma, as informações sobre o comportamento eletroquímico do composto de coordenação, principalmente quando comparado ao do lapachol, contribuem tanto para a compreensão do sistema redox das

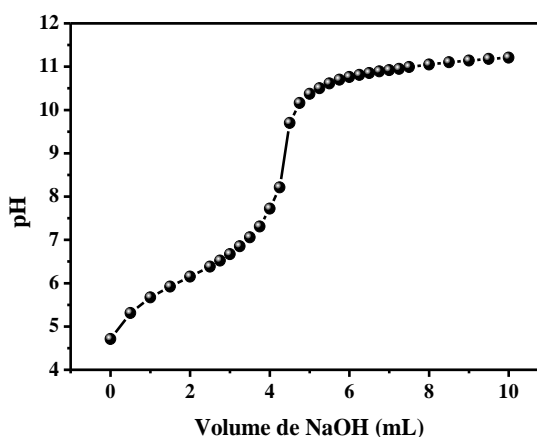
quinonas em geral, como na explicação das atividades biológicas que o complexo venha a apresentar.

### 5.7.2 Titulação Potenciométrica do Lapachol

A titulação potenciométrica do lapachol foi realizada com o intuito de determinar o índice de pureza do composto extraído. Devido a baixa solubilidade da naftoquinona em água foi necessário realizar a análise utilizando como solvente uma mistura etanol/água (50% v/v). Na curva de titulação obtida (Figura 28), observa-se que o ligante comportou-se como um ácido fraco, o que encontra-se de acordo com os valores de pKa descritos na literatura para a naftoquinona (pKa: 5,02 (água); pKa: 6,12 (água/etanol)) (FERRAZ *et. al.*, 2001; OSSOWISK *et. al.*, 2008). Esta informação justifica a utilização da base trietilamina na síntese do complexo (item 4.2.13) para auxiliar na desprotonação do ligante.

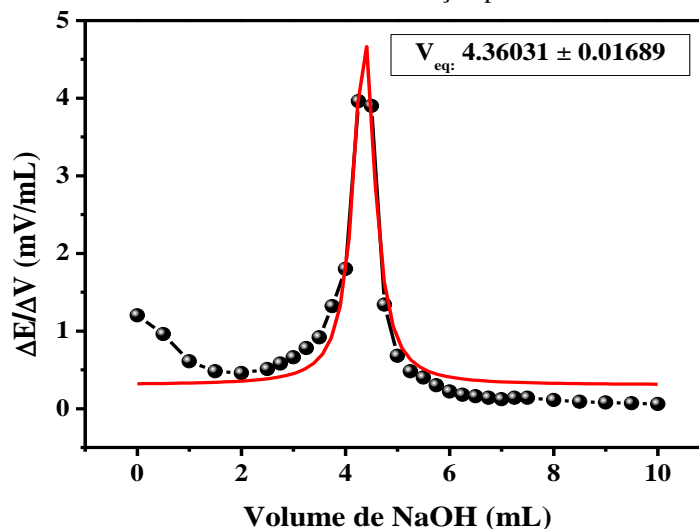
A partir do gráfico da primeira derivada do pH em função do volume de titulante (Figura 29) obteve-se o volume de equivalência, que foi utilizado na determinação do índice de pureza da naftoquinona natural.

**Figura 28-** Curva de titulação potenciométrica do lapachol com solução titulante de NaOH 0,01036 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 29 - Primeira derivada da curva de titulação potenciométrica do lapachol.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

O índice de pureza, calculado a partir da média de três titulações, foi de 90,3%, o que indica grau técnico e a adequação para a utilização na síntese do complexo metálico. A titulação potenciométrica do complexo não foi realizada devido a instabilidade do composto em meio ácido, conforme será demonstrado no próximo tópico.

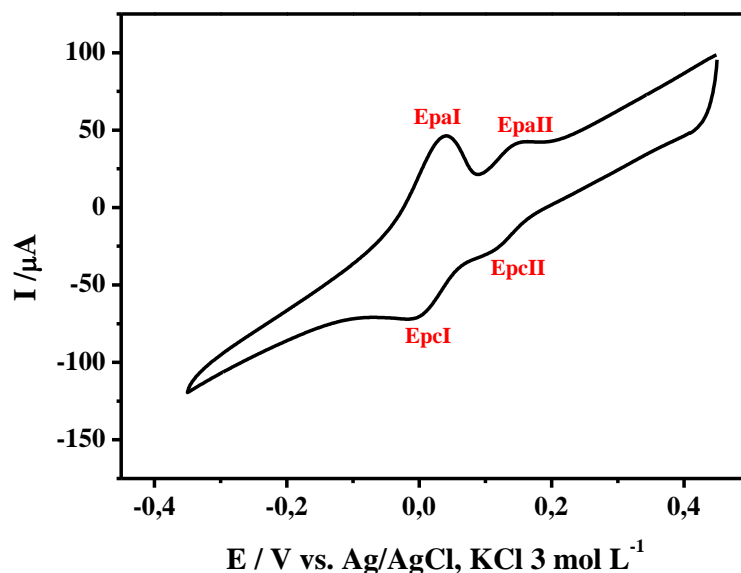
### 5.7.3 Voltametria Cíclica Utilizando Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado Quimicamente

Os estudos de voltametria cíclica utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com o lapachol e o complexo foram realizados inicialmente como forma de auxiliar na caracterização de ambos, bem como obter dados sobre a estabilidade do eletrodo montado, visando sua posterior utilização. Esses estudos utilizaram-se do lapachol em estado sólido imobilizado na pasta de carbono com registro de voltamograma em meio aquoso ácido, condição na qual a solubilidade do lapachol em água é muito baixa.

No voltamograma do lapachol obtido em meio ácido (Figura 30), observou-se dois pares de picos (EpaI: 0,145 e EpcI: 0,118 V vs Ag/AgCl; AEpaII: 0,033 e EpcII: 0,002 V vs Ag/AgCl) ambos semi-reversíveis, sendo que a atribuição da presença destes pares deve-se provavelmente ao equilíbrio tautomérico com formação de uma forma enólica. Ebelle e colaboradores no ano de 2010 realizaram testes eletroquímicos com a naftoquinona em seu estado sólido (assim como na presente análise), e obtiveram de forma

semelhante dois pares de picos, referentes a presença da naftoquinona em duas diferentes formas, resultantes da capacidade de ressonância da molécula.

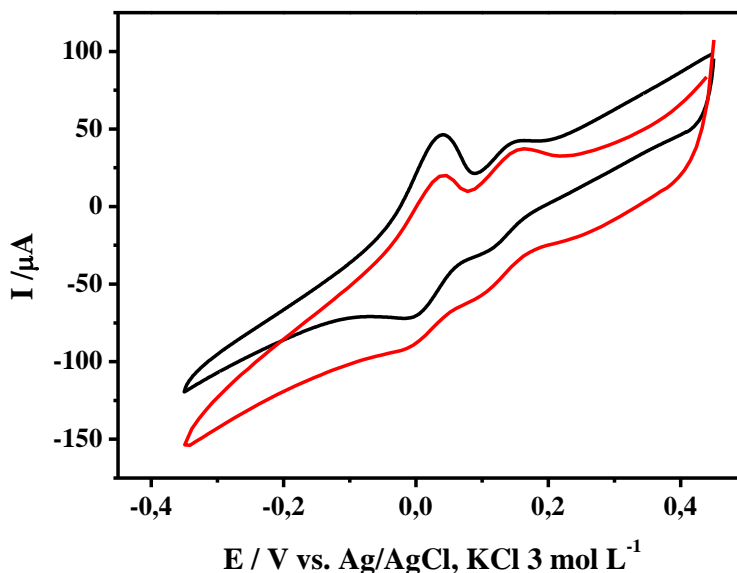
**Figura 30-** Voltamograma cíclico do lapachol imobilizado em pasta de carbono.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Para que se pudesse caracterizar o complexo obtido, foram realizados os testes eletroquímicos em meio ácido com o composto, sendo os resultados comparados com o ligante não coordenado (Figura 31). Ao observar o voltamograma comparativo entre o ligante e o complexo, nota-se que existe grande semelhança no perfil de ambos, bem como deslocamentos pouco significativos nos valores dos potenciais. Sugere-se que devido a necessidade de realização das medidas para o complexo em meio ácido, já que o mesmo não apresentou resultados em outros meios (como solução aquosa de sulfato de sódio), ocorreu a degradação do composto restando apenas o ligante. O estudo permitiu então obter uma característica importante sobre o composto de coordenação sintetizado, demonstrando que o mesmo é instável em meio ácido.

Figura 31 – Voltamogramas cíclicos do lapachol (preto) e complexo (vermelho) medidos em velocidade de 1 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

## 5.8 Testes de Atividade Antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana para o lapachol e complexo foram realizados utilizando como solvente DMSO 5%, o qual mostrou-se eficiente na solubilização dos compostos e adequado a realização dos testes, já que não demonstrou inibição nas cepas bacterianas selecionadas (Gram-negativa *Escherichia coli* e Gram-positiva *Staphylococcus aureus*). O lapachol mostrou-se ativo contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, assim como descrito em demais trabalhos da literatura (ANTUNES *et. al.*, 2006; OLIVEIRA *et. al.*, 2001), mostrando sua seletividade, característica interessante na busca por novos fármacos.

O complexo manteve a mesma característica que o ligante sendo ligeiramente mais ativo que o mesmo quando testado frente a bactéria Gram-positiva. Ambos os compostos são considerados bactericidas, pois apresentam razão CBM/CIM  $\leq 4$ , sendo que se os valores fossem superiores, as amostras seriam consideradas bacteriostáticas (ABOU *et. al.*, 2013). Quando testados frente a bactéria Gram-negativa *E. Coli* o lapachol mostrou-se inativo (CIM > 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o complexo fracamente ativo (CIM entre 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (HOLETZ *et. al.*, 2002; DALMARCO *et. al.*, 2010; KONATÉ *et. al.*, 2012;

SANTOS, 2013). Os valores de CIM e CBM para o complexo e o ligante não coordenado encontram-se descritos na Tabela 8.

**Tabela 8** - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), valores expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Composto/Cepas Bacterianas	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
Lapachol	>1000	>1000	250	1000
Complexo	>500	>1000	200	800

Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

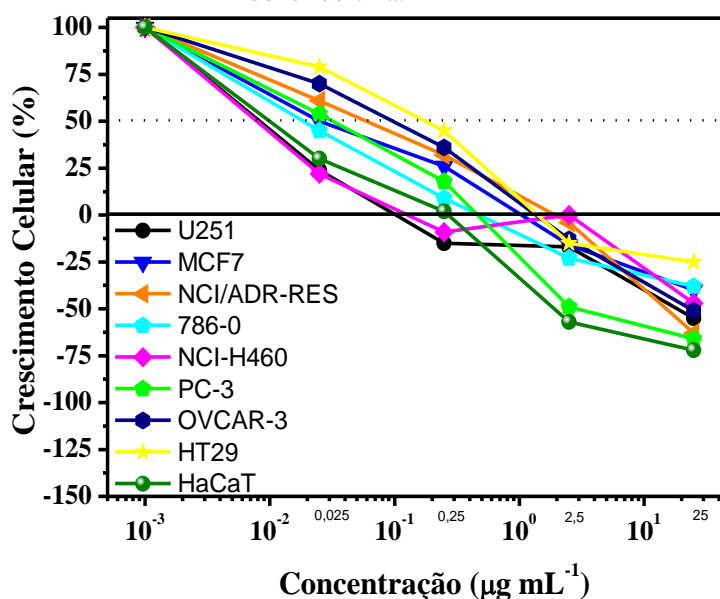
Os resultados obtidos demonstram que o complexo apresenta-se mais ativo que o ligante livre em ambas as bactérias, porém possuindo maior eficiência frente *S. aureus* (Gram-positiva), mantendo a importante característica de seletividade já apresentada pelo ligante.

## 5.9 Ensaio Antitumoral *in vitro*

As Figuras 32, 33 e 34 apresentam os gráficos que se referem aos resultados do ensaio antitumoral do lapachol e do complexo em culturas de células tumorais humanas, relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração das amostras, onde os valores observados abaixo de cem e acima de zero representam a inibição do crescimento celular, enquanto os valores negativos são atribuídos a morte celular. O padrão utilizado foi a doxorrubicina (vide Figura 3), um composto com propriedades antitumorais e que já é utilizado como medicamento (FERNANDES *et. al.*, 2013).

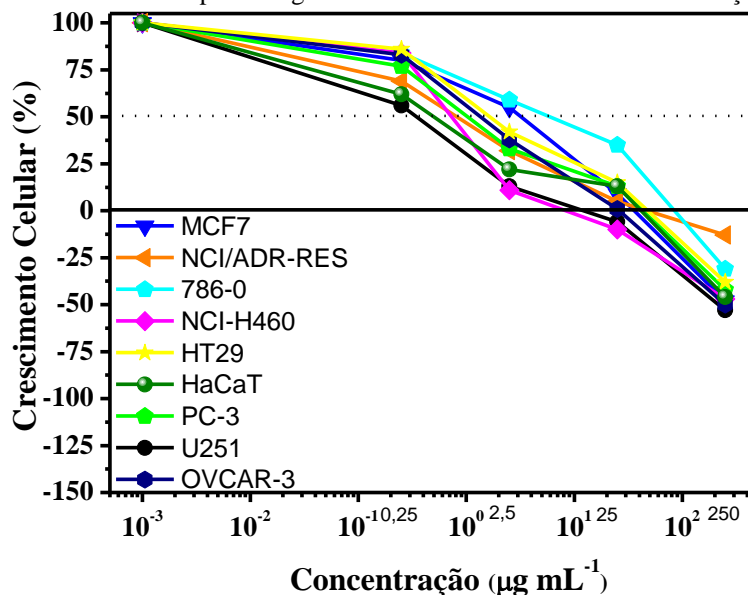
O padrão doxorrubicina (Figura 32) mostrou-se eficaz contra as diversas linhagens de células testadas obtendo 100% de inibição na concentração de 0,16 e 0,31  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as linhagens celulares de U251 e NCI-H460 e 0,41  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para PC-3. A partir da concentração de 2,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  o composto comportou-se como citocida.

Figura 32 - Gráficos correlacionando a porcentagem de crescimento celular e a concentração do padrão doxorubicina.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Figura 33 - Gráficos correlacionando a porcentagem de crescimento celular e a concentração do lapachol.

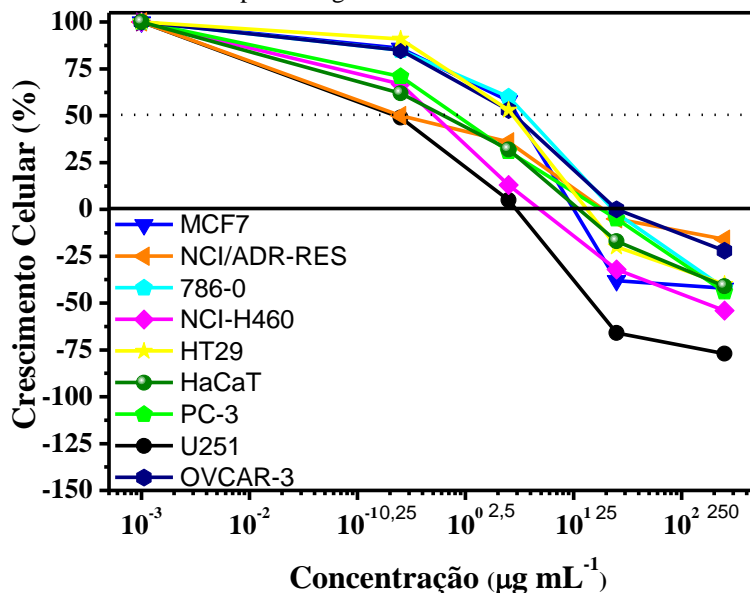


Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

O lapachol (Figura 33) apresentou bons resultados, possuindo efeito citostático sob as linhagens de NCI-H460 e U251 inibindo o crescimento celular nas concentrações de 12,8 e 9,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, e mostrando-se seletivo a estas linhagens celulares.

Na concentração de  $22,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  o composto foi ativo frente a célula OVACAR-3 e, em sua maior concentração, causou morte celular em todas as linhagens.

Figura 34 - Gráficos correlacionando a porcentagem de crescimento celular e a concentração do complexo.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

O complexo (Figura 34) demonstrou-se bastante ativo frente as linhagens de U251, NCI-H460 e MCF7, inibindo o crescimento destas células nas concentrações de 22, 6,5 e  $15,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  sendo seletivo a estas linhagens celulares. A partir da concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  o composto foi citocida contra todas as células avaliadas.

A tabela 9 expõe os valores de TGI (Total Growth Inhibition), a concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento. Os resultados demonstram que a coordenação da naftoquinona natural ao íon metálico  $Fe^{II}$ , potencializou o efeito antitumoral, tendo-se como exceção apenas a linhagem OVACAR-3. O complexo é mais ativo que o ligante livre em todas as demais linhagens celulares, apresentando melhores resultados para U251 e NCI-H460, sendo que mostra seletividade, característica importante na busca por novos fármacos.



Tabela 9 - Valores de TGI expressos em µg mL<sup>-1</sup>.

Linhagens Celulares	Lapachol	Complexo	Padrão	*Comparativo
U251 (glioma)	9,5	2,2	0,16	76,8% mais ativo
MCF-7 (mama)	32,4	15,3	1,1	52,7% mais ativo
NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos)	57,3	38,1	1,2	33,5% mais ativo
786-0 (rim)	78,1	31,4	0,65	59,8% mais ativo
NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células)	12,8	6,5	0,31	49,21% mais ativo
PC-3 (próstata)	30,0	18,4	0,41	38,7% mais ativo
OVCAR-03 (ovário)	22,2	48,1	1,4	53,8% menos ativo
HT29 (colon)	39,5	21,7	2,8	45,1% mais ativo
HaCat (queratinócito/ linhagem não tumoral humana)	20,9	14,2	0,16	32,1% mais ativo

Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015. \*Comparativo: diferença de atividade do complexo relacionado ao lapachol.

Outro fator importante foi a concentração de complexo necessária para inibir o desenvolvimento da linhagem não tumoral HaCat, que foi consideravelmente maior comparado aos melhores resultados obtidos (U251 e NCI-H460), demonstrando a possibilidade de aplicação do composto, já que o mesmo não apresentaria grandes efeitos negativos.

Os resultados assemelham-se aos compostos sintetizados por KANDIOLLER *et. al* (2013) (Ru<sup>II</sup> e Rh<sup>III</sup>) e OLIVEIRA *et. al* (2011) (Bi<sup>III</sup>), onde nos dois casos os complexos mostraram-se também mais ativos que o ligante livre quanto testados para atividade antitumoral. No entanto, as estruturas de ambos os compostos de coordenação diferem da proposta para o complexo apresentado, onde no primeiro caso têm-se compostos organometálicos e no segundo um complexo de lapachol combinado com ligante sintético. Nota-se então a importância de se estudar a química de coordenação da naftoquinona natural, uma vez que a interação com íons metálicos potencializa significativamente as atividades já apresentadas pelo ligante livre. Os estudos atrelados as atividades biológicas dos complexos contendo naftoquinonas são recentes e ainda podem ser bastante explorados.

## 6. CONCLUSÕES

Através dos dados apresentados pode-se concluir que a coordenação da naftoquinona natural lapachol ao íon metálico Fe<sup>II</sup> ocorreu de forma satisfatória. A espectroscopia no infravermelho permitiu sugerir, através das diferenças no perfil estrutural, que a coordenação da molécula bioativa ocorreu de maneira bidentada através de oxigênios fenólico e carbonílico, bem como a presença de moléculas de água de hidratação, previstas através do alargamento do espectro. Estes dados foram confirmados por meio das técnicas de análise elementar de CHN e termogravimetria, que mostraram-se concordantes, sugerindo um composto com fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub>Fe e massa molar 610,44 g mol<sup>-1</sup>. Os ensaios de solubilidade também demonstraram uma significativa diferença entre o ligante livre e o complexo formado.

As espectroscopias de absorção e emissão apresentaram dados similares, onde observaram-se deslocamentos nos comprimentos de onda e diferenças na intensidade de absorção e emissão, bem como o surgimento de uma nova banda atribuída a transições de carga do tipo ligante para metal (LMCT), dados de suma importância para afirmar a formação do complexo, bem como demonstrar a mudança do perfil óptico devido ao novo rearranjo eletrônico. O perfil diferenciado de emissão do complexo o qualifica para ser utilizado como sensor químico fluorescente, mesmo com a presença do efeito CHEQ.

A voltametria de onda quadrada contribuiu para uma melhor compreensão do comportamento redox da naftoquinona natural, além de auxiliar na caracterização do composto obtido. A titulação potenciométrica do lapachol contribuiu com a informação da pureza do composto extraído considerado de grau técnico e adequado para a síntese do complexo. As análises de voltametria em estado sólido trouxeram informação sobre a instabilidade do complexo obtido em meio ácido.

A junção das técnicas realizadas permitiu propor uma estrutura mononuclear para o composto formado, onde o íon ferro<sup>II</sup> encontra-se ligado a duas moléculas do ligante (que coordenou-se de maneira bidentada através de oxigênios fenólico e carbonílico) e duas moléculas de água, possuindo também duas águas de hidratação.

O teste antimicrobiano mostrou que o complexo é ligeiramente mais ativo que o ligante livre, principalmente, frente a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (CIM lapachol: 250 µg mL<sup>-1</sup>; Complexo: 200 µg mL<sup>-1</sup>), inclusive demonstrando ser seletivo, característica importante na busca de novos fármacos.

Por fim, no ensaio antitumoral *in vitro* verificou-se que o composto de coordenação formado é mais ativo que o lapachol e o padrão doxorrubicina, em praticamente todas as linhagens celulares avaliadas, possuindo maior eficiência frente as linhagens U251 (glioma) e NCI-H460 (pulmão) (2,2 e 6,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente), necessitando de concentrações significativamente inferiores as necessárias para inibição da linhagem não tumoral, demonstrando sua possibilidade de aplicação.

Os resultados obtidos através deste trabalho demonstram a relevância da pesquisa na área de síntese de complexos metálicos com naftoquinonas naturais, principalmente com o intuito de avaliá-los como possíveis fármacos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU, O.; KARAMOKO, O.; ADAMA, C.; AUGUSTIN, A. A. Phytochemical Screening and Evaluation of the Antibacterial Activity of Bark Extracts of *Pericopsis (Afrosmia) laxiflora* (Benth.) of *Scherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* ESBL. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Vol. 5, p. 86-90, 2013.

AHMAD, S.; ISAB, A. A.; ALI, S.; AL-ARFAJ, A. R. Perspectives in Bioinorganic Chemistry of Some Metal Based Therapeutic Agents. **Polyhedron, Pakistan**, Vol. 25, p.1633–1645, 2006.

AHMED, S. & KHAN, A. Y. Mechanistic Study of Quinone\_Polyalcohol Interaction through Cyclic Voltammetry. **Russian Journal of Electrochemistry, Pakistan**, Vol. 49, No. 4, p 336–343, 2013.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T.M. S. Atividade Antimicrobiana “in vitro” e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Fitoconstituintes e Produtos Sintéticos Sobre Bactérias e Fungos Leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Paraíba, Vol.16, No.4, p.517-524,2006.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GUIMARÃES, D. G.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; ALMEIDA, J. R. G. DA S.; GONSALVES, A. A. Síntese e Determinação in Vitro do FPS-UVB de Oximas Derivadas do Lapachol. **Revista Virtual de Química**, Vol.6, No. 6, p. 1702-1712, 2014.

ARAÚJO, E.L.; ALENCAR, J.R.B.; ROLIM, P.J.N. Lapachol: Segurança e Eficácia na Terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Recife, Vol.12, p. 57-59, 2002.

AUCÉLIO,R. Q.; CORDOVÉS, A. I. P.; LIMA, J. L. X.; FERREIRA,A. B. B.; GUAS, A. M. E.; da SILVA, A. R. Determination of Lapachol in the Presence of Other Naphthoquinones Using 3MPA-Cdte Quantum Dots Fluorescent Probe. **Spectrochimica**

**Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Rio de Janeiro, Vol.100, p. 155–160, 2013.

BABULA, P.; Vanco, J.; Krejcova, L.; Hynek<sup>2</sup>, D.; Sochor, J.; Adam, V.; Trnkova, L.; Hubalek, J.; Kizek, R. Voltammetric Characterization of Lawsone-Copper(II) Ternary Complexes and Their Interactions with dsDna. **International Journal of Electrochemical Science**, Czech Republic (European Union), Vol. 7, p. 7349 – 7366, 2012.

BACCAN, N.; ANDRADE, J.C. DE; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J.S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**, São Paulo, Ed. Edgar Blucher, 1979.

BALEK, V. & SUBRT, J. Thermal Behaviour of Iron(III) Oxide Hydroxides. **Pure and Applied Chemistry, Czech Republic**, Vol. 67, No. 11, p. 1839-1842, 1995.

BARBOSA, T. P. & NETO, H. D. Preparação de Derivados do Lapachol em Meio Ácido e em Meio Básico: Uma Proposta de Experimentos para a Disciplina de Química Orgânica Experimental. **Química Nova**, João Pessoa, Vol. 36, No. 2, 331-334, 2013.

BARBOSA, M. I.F.; CORRÊA, R. S.; OLIVEIRA, K. M.; RODRIGUES, C.; ELLENA, J.; NASCIMENTO, O. R.; ROCHA, V. P.C.; NONATO, F. R.; MACEDO, T. S.; FILHO, J. M. B.; SOARES, M. B.P.; BATISTA, A. A. Antiparasitic Activities of Novel Ruthenium/Lapachol Complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, São Carlos, Vol. 136, p. 33–39, 2014.

BARRY, N. P E. & SADLER, P. J. Exploration of the Medical Periodic Table: Towards New Targets. **Chemical Communications**, Vol. 49, p. 5106—5131, 2013.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: “Uma Resposta dos Microorganismos”. **Química Nova**, Rio de Janeiro, Vol. 25, No. 6B, p. 1155-1164, 2002.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. Uma Visão da Química Bioinorgânica Medicinal. **Química Nova**, Goiânia - GO, Vol. 30, No. 8, p. 2062-2067, 2007.

BHATIA, B.M.L. & SAWHNEY, S.S. Kinetic Studies on the Non-Isothermal Decomposition of Some Metal Complexes of Lapachol and Juglone. **Thermochimica Acta**, Vol. 47, p. 363-366, 1981.

BODINI, M. E.; ARANCIBIA, V. Manganese Complexes with 2-hydroxy-3(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (Lapachol). Redox Chemistry and Spectroscopy in Dimethylsulphoxide. **Polyhedron**, Chile, v.8, No.11, p. 1407-1412, 1989.

BORG, C. A.; LAZARIN, A. M.; DAVANZO, C. U.; GUSHIKEM, Y. Preparação e Caracterização do Complexo Cobaloxima e sua Utilização na Construção de um Eletrodo Modificado: Um Experimento Eletroquímico no Curso de Graduação. **Química Nova**, Campinas – SP, Vol. 26, No. 6, p. 943-947, 2003.

BOURROUET, G. V.; SALDÍVAR, V. M. U.; GÓMEZ, M.; FRADE, L. A. O.; GONZÁLEZ, I.; FRONTANA, C. Magnetic Interactions as a Stabilizing Factor of Semiquinone Species of Lawsone by Metal Complexation. **Electrochimica Acta**, Costa Rica, Vol. 55, p. 9042–9050, 2010.

BUSTAMANTE, F. L. S.; SILVA, M. M. P.; ALVES, W. A.; PINHEIRO, C. B.; RESENDE, J. A. L. C.; LANZMASTER, M. Isomerism and Nuclearity Control in Bis(lawsonato)zinc(II) Complexes. **Polyhedron**, Niterói, Vol. 42, p. 43–49, 2012.

CARO, Y.; ANAMALE, L.; FOUILLAUD, M.; LAURENT, P.; PETIT, T.; DUFOSSE, L. Natural Hydroxyanthraquinoid Pigments as Potent Food Grade Colorants: An Overview. **Natural Products and Bioprospecting**, Ile de la Réunion (France), Vol. 2, p. 174–193, 2012.

CARUSO, F.; MARTINEZ, M. A.; ROSSI, M.; GOLDBERG, A.; VILLALBA, M. E. C.; AYMONINO, P. J. Crystal and Molecular Structure of Manganese(II) Lapacholate, a Novel Polymeric Species Undergoing Temperature-Reversible Metal to Ligand Electron Transfer. **Inorganic Chemistry**, Rome (Italy), Vol. 48, p. 3529-3534, 2009.

CASTRO, S. L.; EMERY, F. S.; SILVA JR, E. N. Synthesis of Quinoidal Molecules: Strategies Towards Bioactive Compounds with an Emphasis on Lapachones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Rio de Janeiro, Vol. 69, p. 678-700, 2013.

CHEMIN, L. S.; BUISINE, E.; YARDLEY, V.; KOHLER, S.; DEBREU, M. A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C.; CROFT, S. L.; SIEGEL, R. L. K.; CHARVET, E. D. 2- and 3-Substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and in Vitro Cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Inglaterra, Vol. 44, No. 4, p. 548-565, 2001.

DALMARCO, J. B.; DALMARCO, E. M.; KOELZER, J.; PIZZOLATTI, FRODE, M. G.; T. S. Isolation and Identification of Bioactive Compounds Responsible for the Antibacterial Efficacy of *Lotus comiculatus*: var. São Gabriel. **International Journal Green Pharmacy**, Florianópolis, Vol. 4, No. 2, p. 108-114, 2010.

DA SILVA, M. N, FERREIRA, V. F., DE SOUZA, M. C. B. V. Um Panorama Atual da Química e da Farmacologia de Naftoquinonas, com Ênfase na  $\beta$ -Lapachona e Derivados. **Química Nova**, Niterói, Vol. 26, No. 3, p. 407-416, 2003.

DA SILVA, A. R. **Obtenção de Derivados do Lapachol e de Compostos Relacionados**. 2009. 281p. Tese (Doutor em Ciências – Química Orgânica) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Ciências Exatas, 2009.

DEMCHENKO, A. P. **Introduction to Fluorescence Sensing**, Springer, 2009.

DE OLIVEIRA, L. G.; SILVA, M. M.; DE PAULA, F. C. S.; MAIA, E. C. P.; DONNICI, C. L.; DE SIMONE, C. A.; FRÉZARD, F.; JÚNIOR, E. N. S.; DEMICHELI, C. Antimony(V) and Bismuth(V) Complex of Lapachol: Synthesis, Crystal Structure and Cytotoxic Activity. **Molecules**, Belo Horizonte, Vol. 16, p. 10314-10323, 2011.

DERIKVAND, F.; Bigi, F.; Maggi, R.; Piscopo, C. G.; Sartori, G. Oxidation of Hydroquinones to Benzoquinones with Hydrogen Peroxide Using Catalytic Amount of Silver Oxide Under Batch and Continuous-Flow Conditions. **Journal of Catalysis**, Parma (Italy), Vol. 271, p.99–103, 2010.

DUFOSSÉ, L. Anthraquinones, the Dr Jekyll and Mr Hyde of the Food Pigment Family. **Food Research International**, France, Vol. 65, p. 132–136, 2014.

EBELLE, C. T.; NASSI, A.; NJANJA, E.; NGAMENI, E. Characterization of Lapachol in Artificial Organic-Film Membrane: Application for the Trans-Membrane Transport of Mg<sup>2+</sup>. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Yaoundé, Vol. 642, p. 61–68, 2010.

EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; KISS, R. Lapachol and Its Congeners as Anticancer Agents: A Review. **Phytochemistry Reviews**, Chieti Scalo (Italy), 13 p., 2013.

FARIAS, M. 1998. **Estudo da Síntese da 5-laurilamino-8-hidróxi-1,4-naftoquinona e sua Complexação com Metais de Transição**. 1998. p.103. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Instituto de Química) – Curso de Pós-graduação em Química, Rio Grande do Sul.

FARFÁN, R. A.; ESPÍNDOLA, J. A.; MARTÍNEZ, M. A.; PIRO, O. E.; AYMÓNINO, P. J. Synthesis and Crystal Structure of a New Lapacholate Complex With Nickel(II), [Ni(Lap)<sub>2</sub>(DMF)(H<sub>2</sub>O)]. **Journal of Coordination Chemistry**, Argentina, Vol. 62, No. 23, 3738-3744, 2009.

FARFÁN, R. A.; ESPÍNDOLA, J. A.; GOMEZ, M.I.; DE JIMÉNEZ, M. C. L.; MARTÍNEZ, M. A.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E. Structural and Spectroscopic Properties of Two New Isostructural Complexes of Lapacholate with Cobalt and Copper. **International Journal of Inorganic Chemistry**, Argentina, Vol. 2012, 1-6, 2012.

FARFÁN, R. A.; ESPÍNDOLA, J. A.; GOMEZ, M.I.; DE JIMÉNEZ, M. C. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; MARTÍNEZ, M. A. Crystal Structure, Spectroscopic and Thermal Properties of [Zn(Lap)<sub>2</sub>(DMF)(H<sub>2</sub>O)] and Isomorphous [M(Lap)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (M: Cd, Mn) Complexes. **Journal of Molecular Structure** (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.01.042>.

FERRAZ, P. A.L.; ABREU, PINTO, F. C. A. V.; GLEZER, V.; TONHOLO, J.; GOULART, M. O.F. Electrochemical Aspects of the Reduction of Biologically Active 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Alagoas, Vol. 507, p. 275–286, 2001.



FÖLDVÁRI, M. Handbook of Thermogravimetric System of Minerals and Its Use in Geological Practice. **Occasional Papers of the Geological Institute of Hungary**, Budapest, Vol. 213, 179 p, 2011.

FORMICA, M.; FUSI, V.; GIORGI, L.; MICHELONI, M. New Fluorescent Chemosensors for Metal Ions in Solution. **Coordination Chemistry Reviews**, Italy, Vol. 256, 170–192, 2012.

GAWALI, S. S.; RANE, S.Y.; PURANIK, V.G.; DUHAYON, C. G.; VARRET, F. Three Dimensional Hydrogen-Bonding Network in a Copper Complex of 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone: Structural, Spectroscopic and Magnetic Properties. **Polyhedron**, Pune (India), Vol. 23, p. 2541–2547, 2004.

GAWALI, S. S.; Kathawate, L.; Shinde, Y.; Puranik, V. G.; Weyhermüller, T. Single Crystal X-Ray Structure of Lawsone Anion: Evidence for Coordination of Alkali Metal Ions and Formation of Naphthosemiquinone Radical in Basic Media. **Journal of Molecular Structure**, India, Vol. 1010, p. 38–45, 2012.

GESSLER, N. N., EGOROVA, A. S, BELOZERSKAYA, T. A. Fungal Anthraquinones. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow (Russia), Vol. 49, No. 2, p.85–99, 2013.

GOULART, M. O. F.; FALKOWSKI, P.; OSSOWSKI, T.; LIWO, A. Electrochemical Study of Oxigem Interaction with Lapachol and Its Radical Anions. **Bioelectrochemistry**, Poland, Vol. 59, p. 85-87, 2003.

GUIN, P. S.; DAS, S.; MANDAL, P. C. Electrochemical Reduction of Quinones in Different Media: A Review. **International Journal of Electrochemistry**, India, p. 1-22, 2011.

HOOK, S. The Constitution of Lapachol and Its Derivatives. 1986.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for

the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n.7, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, T.H. & ZHANG, M. H. Novel Copper(I) Complexes with Extended  $\pi\cdots\pi$  Interactions: Synthesis, Structure, Characterization and Spectroscopic Properties. **Inorganica Chimica Acta**, China, Vol. 416, 28–34, 2014.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEN, I. R. Lapachol: An Overview. **ARKIVOC**, Germany, p.145-171, 2007.

KANDIOLLER, W.; BALSANO, E.; MEIER, S. M.; JUNGWIRTH, U.; GÖSCHL, S.; ROLLER, A.; JAKUPEC, M. A.; BERGER, W.; KEPLER, B. K.; HARTINGER, C. G. Organometallic Anticancer Complexes of Lapachol: Metal Centre-Dependent Formation of Reactive Oxygen Species and Correlation With Cytotoxicity. **Chemical Communications**, Austria, Vol. 49, 3348, 2013.

KATHAWATE, L.; SHINDE, Y.; YADAV, R.; KASABE, U.; NIKALJE, M.; GAWALIS, S. S. Thermal and Spectral Properties of Alkali Metal Complexes of 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Vol. 115, p. 2319–2330, 2014.

KLÜPFEL, L. Redox characteristics of quinones in natural organic matter (NOM). **Zurich: Institute of Biogeochemistry and Pollutant Dynamics**, 2009.

KONATÉ, K.; MAVOUNGOU, J. F.; LEPENGU, A. N.; AWORET-SAMSENY, R. R. R. HILOU, A; SOUZA, A.; DICKO, M. H.; M'BATCHI, B. Antibacterial Activity Against  $\beta$ - lactamase Producing Methicillin and Ampicillin-resistants Staphylococcus aureus: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) Determination. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. p. 11-18, 2012.

LAKOWICZ, J. R. **Topics in fluorescence spectroscopy: Probe design and chemical sensing**. Vol. 4. Kluwer Academic Publishers, 2002.

LUCAS, N. C.; FERREIRA, A. B. B.; NETTO-FERREIRA, J. C. Fotoquímica de Naftoquinonas. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, Vol. 7, No. 1 (no prelo), 2015.

MARTÍNEZ, M. A.; JIMÉNEZ, M. C. L.; CASTELLANO, E. E.; PIRO, O. E.; AYMONINO, P. J. Synthesis, Structure and Properties of a Zinc(II) Complex with the Lapacholate Anion and Ethanol as Ligands. **Journal of Coordination Chemistry**, Argentina, Vol. 56, p. 803-816, 2003.

MOLINA, R. H.; KALININA, I.; ESPARZA, P.; SOKOLOV, M.; PLATAS, J. G.; BRAUN, A. E. & SACAU, E. P. Complexes of Co(II) and Ni(II) with Lapachol. **Polyhedron**, Spain, Vol. 26, p. 4860-4864, 2007.

MONKS A., SCUDIERO D., SKEHAN P., SHOEMAKER R., PAULL K., VISTICA D., HOSE C., LANGLEY J., CRONISE P., VAIGRO-WOLFF A., GRAY-GOODRICH M., CAMPBELL H., MAYO J., BOYD M. Feasibility of a High-flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 83, p. 757-766, 1991.

NEVES, ADEMIR. **Química Bioinorgânica**. Universidade Federal de Santa Catarina – Secretaria da Educação do Estado da Bahia. Programa de Formação Continuada a Distância. 2001, 144 p.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D.; SOTO, C. A. T.; RAMOS, J. M.; VISENTIN, L. C.; PINHEIRO, C. B.; MANGRICH, A. S.; REZENDE, E. I.P. Novel Zinc(II) and Copper(II) Complexes of a Mannich Base Derived from Lawsone: Synthesis, Single Crystal X-Ray Analysis, *ab initio* Density Functional Theory Calculations and Vibrational Analysis. **Spectrochimica Acta Part A**, Rio de Janeiro, Vol. 94, p. 152– 163, 2012.

NGAMENI, E.; TONLE, I. K.; NANSEU, C. P.; WANDJI, R. Voltammetry Study of 2-hidroxy-3-isopropenil-1,4-naphthoquinone Using a Carbon Paste Electrode. **Electroanalysis**, Cameroon, Vol. 12, No. 11, p. 847-852, 2000.

OLIVEIRA, C. G. T.; MIRANDA, F. F.; FERREIRA, V. F.; FREITAS, C. C.; RABELLO, R. F.; CARBALLIDO, J. M.; CORRÊA, L. C. D. Synthesis and Antimicrobial Evaluation

of 3-Hydrazino-Naphthoquinones as Analogs of Lapachol. **Journal Brazilian Chemical Society**, Niterói, Vol. 12, No. 3, p. 339-345, 2001.

OLIVEIRA, L. G.; SILVA, M. M.; DE PAULA, F. C. S.; MAIA, E. C. P.; DONNICI, C. L.; de SIMONE, C. A.; FRÉZARD, F.; JÚNIOR, E. N. S.; DEMICHELI, C. Antimony(V) and Bismuth(V) Complexes of Lapachol: Synthesis, Crystal Structure and Cytotoxic Activity. **Molecules**, Belo Horizonte, Vol.16, p. 10314-10323, 2011.

OLIVEIRA, C. G. **Síntese e caracterização de Complexos de Metais da Primeira Série do Bloco d com Tiossemicarbazonas para Investigar seu Potencial contra *Mycobacterium Tuberculosis***. 2013. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal de São Carlos, 2013.

OSSOWSKI, T.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C.; SANT'ANA, A.E.G.; MIRANDA, P. R. B.; COSTA, C. O.; LIWO, A.; FALKOWSKI, P.; ZARZECZANSKA, D. Determination of the pKa Values of some Biologically Active and Inactive Hydroxyquinones. **Journal Brazilian Chemical Society**, Maceió, v. 19, p. 175-183, 2008.

PARRILHA, G. L.; VIEIRA, R. P.; CAMPOS, P. P.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; ANDRADE, S. P.; BERALDO, H. Coordination of Lapachol to Bismuth(III) Improves its Anti-inflammatory and Anti-angiogenic Activities. **Biometals**, Belo Horizonte, Vol. 25, 55-62, 2012.

PINTO, A. M. V.; LEITE, J. P. G.; NEVES, A. P.; da SILVA, G. B.; VARGAS, M. D.; PAIXÃO, I. C. N. P. Synthetic Aminomethylnaphthoquinones Inhibit the in Vitro Replication of Bovine Herpesvirus 5. **Archives of Virology**, Niterói, Vol. 159, p.1827–1833, 2014.

PORTUGAL, S. G. M.; HERRERA, J. O. M.; BRINN, I. M. N. Anomalous Electronic Absorption in Lapachol-Alcohol Solutions. **The Chemical Society of Japan**, Rio de Janeiro, Vol. 70, p. 2071-2076, 1997.

ROCHA, M. N.; NOGUEIRA, P. M.; DEMICHELI, C.; OLIVEIRA, L. G.; SILVA, M. M.; FRÉZARD, F.; MELO, M. N.; SOARES, R. P. Cytotoxicity and *In Vitro*

Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, Belo Horizonte, Vol. 2013, 2013.

ROSSO, M.E.D.; ARCOS, M. L. B.; ELINGOLD, I.; STERLE, H. A.; FERREIRA, S. B.; FERREIRA, V. F.; GALLEANO, M.; CREMASCHI, G.; DUBIN, M. Novel *O*-naphthoquinones Induce Apoptosis of EL-4 T Lymphoma Cells Through the Increase of Reactive Oxygen Species. **Toxicology in Vitro**, Buenos Aires, Vol. 27, n.7, p. 2094–2104, 2013.

ROYO, S. O.; TORREJÓN, C.; CUADRADO, I.; MOLINA, R. H.; HORTELANO, S.; BRAUN, A. E.; DE LAS HERAS, B. Synthesis and Cytotoxic Activity of Metallic Complexes of Lawsone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Tenerife (Spain), Vol. 21, p. 2471–2477, 2013.

SACAU, E. P.; BRAUN, A. E.; RAVELO, A. G.; FERRO, E. A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. Inhibitory Effects of Lapachol Derivatives on Epstein-Barr Virus Activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Tenerife (Spain), Vol. 11, p. 483–488, 2003.

SANTOS, A. F. **Avaliação de Metodologias para Estudos da Atividade Antimicrobiana com Ligantes Orgânicos e seus Respective Complexos Metálicos**. 2013. 95p. Dissertação (Pós-graduação em Recursos Naturais) Universidade Estadual do Mato grosso do Sul, 2013.

SANTOS, A. F.; BROTTTO, D. F.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; ANDRADE, G. R.; BATISTOTE, M.; CAVALHEIRO, A. A.; NEVES, A.; RODRIGUES, D. C. M.; DOS ANJOS, A. Study of the Antimicrobial Activity of Metal Complexes and Their Ligands Through Bioassays Applied to Plant Extracts. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Vol. 24, p. 309-315, 2014.

SERDA, M.; KALINOWSKI, D. S.; WILCZKIEWICZ, A. M.; MUSIOL, R.; SZURKO, A.; RATUSZNA, A.; PANTARAT, N.; KOVACEVIC, Z.; MERLOT, A. M.; RICHARDSON, D. R.; POLANSKI, J. Synthesis and Characterization of Quinoline-Based Thiosemicarbazones and Correlation of Cellular Iron-Binding Efficacy to Anti-Tumor

Efficacy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Poland, Vol. 22, p. 5527–5531, 2012.

SILVA, E. O.; CARVALHO, T. C.; PARSHIKOV, I.A.; SANTOS, R. A.; EMERY, F. S.; FURTADO, N.A. J. C. Cytotoxicity of Lapachol Metabolites Produced by Probiotics. **Applied Microbiology**, Ribeirão Preto, Vol. 59, p. 108 - 114, 2014.

SOUZA, M. A. A.; da SILVA, A. R.; FERREIRA, M. A.; LEMOS, M. J.; RAMOS, R. G.; FERREIRA, A. B. B.; SOUZA, S. R. Atividade Biológica do Lapachol e de Alguns Derivados Sobre o Desenvolvimento Fúngico e em Germinação de Sementes. **Química Nova**, Rio de Janeiro, Vol. 31, No. 7, 1670-1671, 2008.

SUNASSE, S. N.; Veale, C. G. L.; Gounden, N. S.; Osoniyi, O.; Hendricks, D. T.; Cairra, M. R.; de la Mare, J.A.; Edkins, A. L.; Pinto, Júnior, A. V.; E. N. S.; Coleman, M. T. D. Cytotoxicity of Lapachol,  $\beta$ -Lapachone and Related Synthetic 1,4-Naphthoquinones Against Oesophageal Cancer Cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2012.

SAWHNEY, S. S.; VOHRA, N.; CHANDEL, S. K. Formation Constants and Thermodynamic Functions of Cd(II), Zn(II), Pb(II), VO<sup>+</sup> and Ce(IV) with Lapachol. **Thermochimica Acta, India**, Vol. 52, p. 349-350, 1982.

SAWHNEY, S.S.; CHANDRA, R.M. S. N.; VOHRA, N. Kinetics of the Pyrolytic Decomposition of Some Metal Complexes of 2-Hydroxy-3-(3-Methyl-2-Butenyl) 1,4-Naphthalenedione (Lapachol) From DTG Curves. **Thermochimica Acta**, Vol. 54, p. 373-376, 1982.

SAWHNEY, S.S.; MATTA, S.D.; JAIN, R.; KASHYAP, R. K.; PAINULI, V.K. Investigation on the Interaction of 2-Hydroxy-3-(3-Methyl-2-Butenyl)-1,4-Naphthoquinone (Lapachol) with Copper(II) and Iron(II). **Thermochimica Acta, India**, Vol.70, p. 367-371, 1983.

SAWHNEY, S.S. & BAINS, S.S. Thermal and pH-Metric Studies on Complexes of Hg(II) and Er(III) with 2-Hydroxy-3-(3-Methyl-2-Butenyl)-1,4-Naphthoquinone (Lapachol). **Thermochimica Acta, India**, Vol.71, p. 381-386, 1983.

SAWHNEY, S.S. & JAIN, R. Studies on the Interaction of Eu(III) with Lawsone (2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone), Lapachol (2-Hydroxy-3-(3-Methyl-2-Butenyl)-1,4-Naphthoquinone), Juglone (5-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone) and Plumbagin (2-Methyl-5-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone). **Thermochimica Acta**, India, Vol. 75, p. 347-352, 1984.

SAWHNEY, S.S. & ARORA, N.K. Equilibrium Analysis of La(III)- and Pr(III)-3-Methyl-5-Hydroxy-1,4-Naphthalenedione Systems. **Thermochimicu Acta**, India, Vol. 115, p.385-387, 1987.

SAWHNEY, S.S.; JAIN, R.; JASSAL, M. M. S. Thermal Studies on Tris(Zhydroxy-1,4-Naphthoquinonato) Eu(III), Gd(III) And Tb(III). **Thermochimica Acta**, India, Vol. 132, p. 275-278, 1988.

SKOOG, D.A; WEST, D.M; HOLLER, F.J.; STANLEY, R.C. **Fundamentos da Química Analítica**, Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed.Thomson, 2007.

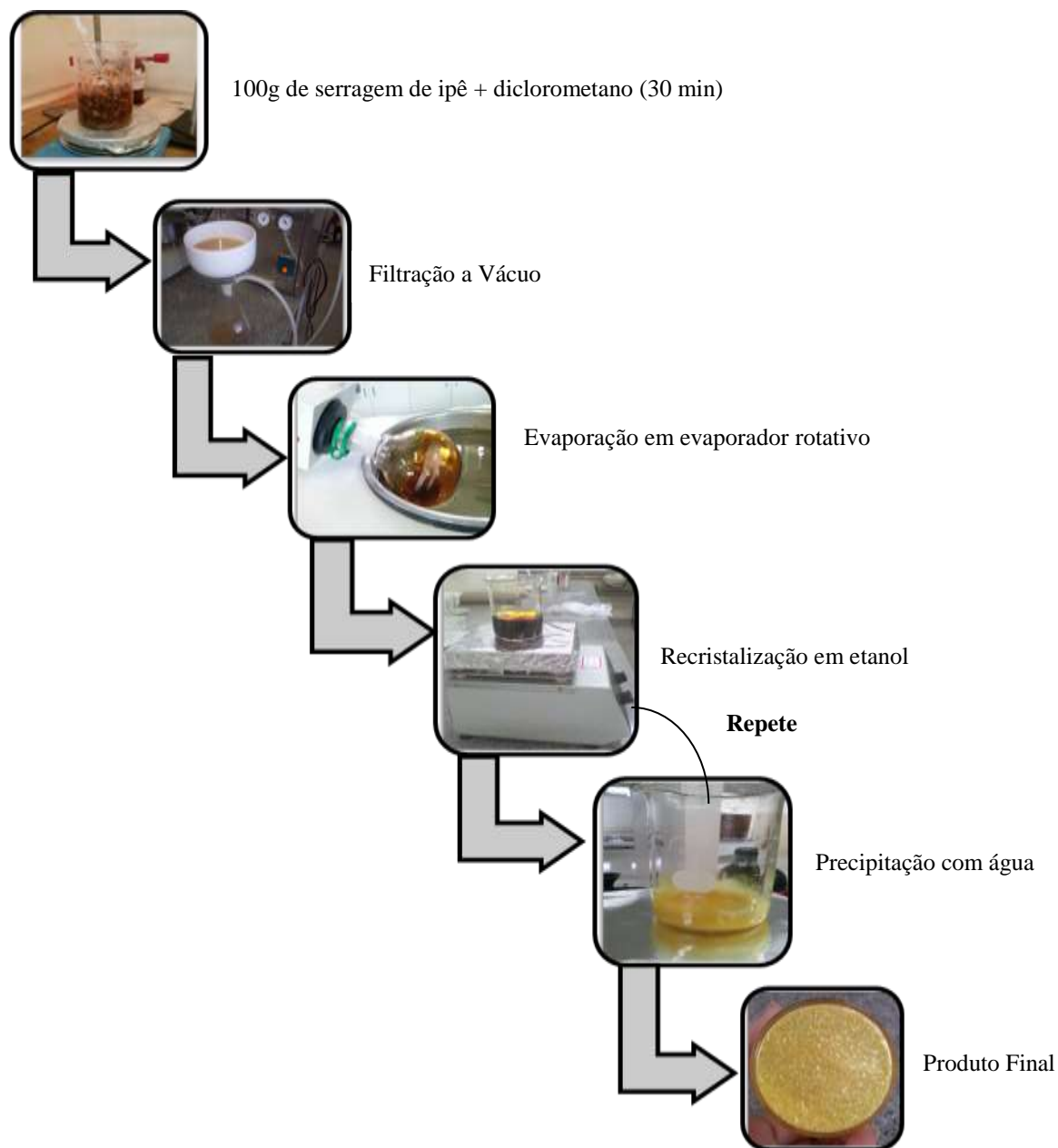
VALEUR, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley VCH, Weinheim, Germany, 2001.

WIPF, D. O.; WEHMEYER, K. R.; WIGHTMAN, R. M. Disproportionation of Quinon Radical Anions in Protic Solvents at High pH. **Journal of Organic Chemistry**, Indiana, Vol. 51, p. 4760-4764, 1986.

# **ANEXOS**



**Anexo 1** – Fluxograma de extração do lapachol.



**Anexo 2 – Fluxograma da síntese do complexo.**

