
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS**

**Síntese e Caracterização de um Novo Complexo de Ag^I
Contendo Ligante Bioativo Lapachol e Estudo das Suas
Propriedades Biológicas**

Acadêmica: Natália Aparecida Cabeza

Dourados-MS
2015



Síntese e Caracterização de um novo complexo de Ag^{I} contendo ligante bioativo lapachol e estudo das suas propriedades biológicas

Acadêmica: Natália Aparecida Cabeza

Orientador: Prof. Dr. Alberto Adriano Cavalheiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Ademir dos Anjos

“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



FICHA CATALOGRÁFICA

C112s Cabeza, Natália Aparecida

Síntese e caracterização de um novo complexo de Ag^I contendo ligante bioativo lapachol e estudo das suas propriedades biológicas/ Natália Aparecida Cabeza. Dourados: UEMS, 2015.

91f.

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto Adriano Cavalheiro

1.Lapacholato-prata(I) 2.Atividade antimicrobiana 3.Atividade antitumoral. I. Título

CDD 23.ed. - 546.654

EPÍGRAFE

“Ninguém pode começar de novo, mas, qualquer um pode fazer um novo fim”
Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família

Ao meu amado namorado Anderson Taira

Às minhas queridas amigas Tamires Donizeth e Lis Regiane

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus todo poderoso, por sempre olhar e iluminar meu caminho.

A UEMS, em especial a unidade acadêmica de Naviraí, pelo acolhimento para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador Alberto Adriano Cavalheiro, pela oportunidade e paciência.

Ao meu professor co-orientador Ademir dos Anjos pelo apoio, confiança, amizade, pelos ensinamentos, e por nunca me deixar desamparada.

Aos professores do programa de pós graduação em recursos naturais, pelos ensinamentos e dedicação.

Ao professor Anderson Rodrigues Lima Caires e ao mestrando Gelson Tiago Tavares 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 membros da banca examinadora, por aceitarem participar da avaliação do trabalho.

Aos meus amigos de pesquisa: Tamires, Debora, Natalí, Stefani, Michele, Alice, Eduardo, Amanda, Natali Cruz e a toda equipe do laboratório de pesquisa. Ao Junior Cabral e Leandro Biscoli pela realização dos testes antimicrobianos. A Debora Brotto pelas contribuições.

As amigas da pós graduação, em especial a Michele por sempre me receber de braços abertos em sua residência. As parceiras de viagem, Márcia e Tamires por tornar a trajetória mais curta e agradável.

A professora e amiga Daniela Manfroi pelos conselhos e contribuições.

Aos meus pais: Fátima Dutra e Antônio Cabeza, às minhas irmãs Franciely Dutra e Giovana Cabeza e sobrinha Eduarda Dutra que continuamente estiveram ao meu lado, me apoiando e me ajudando sempre que necessário.

Ao meu namorado Anderson Taira, por sempre estar do meu lado, me compreendendo e me deixando crescer.

A equipe da Bless Modas e Balada Store, que sempre me deram força, principalmente em suas orações.

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

Ao Órgão de fomento a pesquisas, FUNDECT no qual este trabalho esta inserido, pela bolsa concedida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos três principais grupos das quinonas.	7
Figura 2. Estrutura química da vitamina K.....	10
Figura 3. Lapachol- (a) Árvore família Bignoniaceae (Ipê) (b) Estrutura do química.....	11
Figura 4. (a) Estrutura com complexo $Zn(Lap)_2(EtOH)_2$ (Martinez et. al., 2003) e (b) estrutura do $[Co(Lap)_2(DMF)(H_2O)]$ (Martinez et. al., 2005).	14
Figura 5. Estrutura dos complexos $(Lp)(Ph_3Sb)OH$ e $(Lp)_2(Ph_3Bi)_2$ De -Oliveira et. al, 2011.	15
Figura 6. Complexo de prata - (a) Estrutura da sulfadiazina de prata. Em (b) sua respectiva estrutura em 3D.....	18
Figura 7. Modos de coordenação da prata.	19
Figura 8. Etapas de extração do lapachol.	29
Figura 9. Síntese do complexo lapacholato- $Ag(I)$	30
Figura 10. Curva de titulação potenciométrica do lapachol com solução titulante de NaOH $0,01036 mol L^{-1}$	32
Figura 11. Primeira derivada da curva de titulação potenciométrica do lapachol.....	33
Figura 12. Estrutura dimérica do lapachol estado sólido.	34
Figura 13. Espectro na região do infravermelho do Lapachol.	35
Figura 14. Espectro na região no infravermelho do complexo lapacholato- Ag^I	35
Figura 15. Ampliação dos espectros do ligante e complexo.	36
Figura 16. Curvas termogravimétricas obtidas para o lapachol e o complexo.....	38
Figura 17. Espectro eletrônico do ligante e complexo nas concentrações de $5,0 \times 10^{-4} mol L^{-1}$	39
Figura 18. Espectro de eletrônico do lapachol. Solvente acetonitrila, 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) $5,0 \times 10^{-5} mol L^{-1}$. Inserção: curvas analíticas relacionando absorvância e concentração.....	42
Figura 19. Espectro de eletrônico do complexo. Solvente acetonitrila, 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) $5,0 \times 10^{-5} mol L^{-1}$. Inserção: curvas analíticas relacionando absorvância e concentração.....	42
Figura 20. Mapa de contorno 3D. (esquerda) lapachol e (direita) o complexo.....	44

Figura 21. Espectro de emissão com excitação em 325 nm em concentração de $6,4 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	44
Figura 22. Representação estrutural dos três principais estados de oxidação das quinonas. ...	45
Figura 23. Voltamogramas via 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).	46
Figura 24. Voltamogramas via onda quadrada do lapachol. Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho), Ag/Ag ⁺ (referência) e fio platina (auxiliar).	48
Figura 25. Voltamogramas via onda quadrada do complexo de prata(I). Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho), Ag/Ag ⁺ (referência) e fio platina (auxiliar).	49
Figura 26. Voltamograma cíclico do lapachol imobilizado em pasta de carbono.....	51
Figura 27. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos contendo lapachol (preto) e complexo (vermelho) medidos em velocidade de 1 mV s ⁻¹	51
Figura 28. Atividades antiproliferativas do padrão doxorubicina.....	55
Figura 29. Atividades antiproliferativas do lapachol.	56
Figura 30. Atividades antiproliferativas do complexo.	57

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.....	27
Tabela 2. Solubilidades relativas do ligante livre e do complexo de Ag ^I empregando vários solventes.	31
Tabela 3. Porcentagens teóricas e experimentais obtidos através da análise elementar de CHN.....	33
Tabela 4. Principais bandas e atribuições, em cm ⁻¹ , dos espectros no IV para o lapachol livre e para o complexo.....	37
Tabela 5. Valores das absorvidades molares expressos em mol L ⁻¹ cm ⁻¹	41
Tabela 6. Valores de Potenciais em V vs Fc ⁺ /Fc para o lapachol e o complexo.....	48
Tabela 7. Valores (µg mL ⁻¹) da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).	52
Tabela 8. Concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular TGI (µg mL ⁻¹).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MMA - Ministério do Meio Ambiente

NCI – National Cancer Institute

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

CHN – Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Oxigênio

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

IV - Infravermelho

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

RNA- Ácido Ribonucleico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMF – Dimetilformamida

IUPAC – União Internacional da Química Pura e Aplicada

TG - Termogravimetria

DTG - Termogravimetria derivada

λ - Comprimento de Onda

nm – nanômetro

$\mu\text{g/mL}$ - Microgramas por mililitros

TCLM – Transferência de Carga Ligante Metal

CIM – Concentração Inibitória mínima

CBM – Concentração Bactericida Mínima

TGI- Concentração que inibe total crescimento celular

GI₅₀. Concentração que inibe 50% do crescimento celular

T0- Tempo zero - Controle do crescimento celular no dia da adição das amostras

RESUMO

A utilização de compostos naturais como agentes terapêuticos tem engajado diversas pesquisas, sendo que dentre estes está o lapachol, uma naftoquinona com múltiplas atividades biológicas. Uma vez que este composto pode ser utilizado como ligante coordenativo a íons metálicos, o que pode potencialmente ocasionar um aumento significativo de suas atividades. Este trabalho objetiva a síntese e caracterização de um complexo metálico lapacholato- Ag^{I} , bem como o estudo das suas propriedades biológicas (antimicrobiana e antitumoral). As diferenças de solubilidade e ponto de fusão, assim como a análises térmica e elementar de CHN indicaram a formação de um complexo mononuclear com estequiometria 1:1 ligante/metálico e com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{Ag}$ (massa molar = $349,13 \text{ g mol}^{-1}$). A espectroscopia no infravermelho sugere que a coordenação ocorreu de forma bidentada pelos oxigênios carbonílico (C1) e fenólico. A espectroscopia de absorção no UV-Vis mostra claramente a influência do processo de coordenação com o aparecimento de uma banda com máximo de absorção em 510 nm, a qual pode ser atribuída a transferências de carga do tipo TCML; embora não ocorram deslocamentos das bandas atribuídas ao lapachol, as mesmas sofrem aumento de intensidade (efeito hipercrômico) após a complexação, o que é comprovado pela determinação das absorvidades molares. Os espectros de emissão indicam que a intensidade de luminescência apresentada pelo complexo foi superior a do ligante livre, ao mesmo tempo em que se mostram concordantes quanto ao perfil encontrado na absorção. As técnicas eletroanalíticas, além de demonstrar a pureza do lapachol, mostram que o mesmo comportou-se como um ácido fraco; 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 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. Por fim, os ensaios biológicos apontaram uma excelente potencialização das atividades após a coordenação: nos testes antimicrobianos o complexo foi mais ativo que o lapachol e o sal metálico, mostrando-se, inclusive, ativo frente a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*; os ensaios antitumorais *in vitro* demonstraram o melhor desempenho do complexo sobre praticamente todas as linhagens de células, quando comparado ao ligante e ao padrão doxorrubicina, o que abre boas perspectivas quanto ao seu emprego como possível fármaco.

Palavras chave: *lapacholato-prata(I); propriedades físico-químicas; atividade antimicrobiana; atividade antitumoral.*

ABSTRACT

The use of natural compounds as therapeutic agents has engaged in various researches, and among these can be mentioned the lapachol, a naphthoquinone with multiple biological activities. Since this compound can be used as a coordinative ligand to metal ions, which can potentially cause a significant increase in their activities. This work aims to synthesize and characterize a metal complex lapacholate- Ag^{I} , and study its biological properties (antimicrobial and antitumoral). This compound when coordinated to metal ions can potentially lead to a significant increase in its activities. Many researches are carried out on the use of natural compounds as therapeutic agents including lapachol, a naphthoquinone with many biological activities. The differences between solubility and melting point showed metallic coordination. Mononuclear complex formation with stoichiometry 1:1 ligand/metal ion, and a molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{Ag}$ (molecular weight = $349.13 \text{ g mol}^{-1}$) was determined by CHN elemental analysis, thermal analysis and infrared spectroscopy. The coordination possibly occurred in order for bidentate on phenolic and carbonyl oxygen's (C1). The appearance of a band with maximum absorption at 510 nm in UV-Vis spectra shows the coordination process assigned to the charge transfer type MLCT; have not been observed shifts on the bands assigned to lapachol, only their intensity increase (hyperchromic effect) after complexation, evidenced by molar absorptivities determination. Emission spectra indicated that the complex luminescence intensity was higher than the free ligand, which agrees with absorption resultant profile. The lapachol purity, extracted from ipe, was determined in 90% via potentiometric titration. Who also found their behavior as weak acid. The voltammetry of immobilized carbon paste complex showed its instability in acidic medium. The electrochemical behavior for lapacholate- Ag^{I} showed differences from lapachol profile, expanding the understanding of the redox system of quinones, and assisting the explanation of complex biological activities. Finally, the bioassays showed excellent enhancement of biological activities after metallic coordination: the complex was more active in antimicrobial testing, even against *Escherichia coli* gram-negative bacteria. Furthermore their activity was also higher for *in vitro* antitumor tests on almost all cell strains, and even superior to standard doxorubicin. These good results show good potential for the use of lapacholate- Ag^{I} complex as possible drug.

Keywords: *lapacholate-silver(I); physicochemical properties; antimicrobial activity; antitumoral activity.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo Geral	4
2.2	Objetivos Específicos	4
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
3.1.	Química Inorgânica e os Produtos Naturais	5
3.2.	Quinonas	6
3.3.	Naftoquinonas.....	9
3.4.	Lapachol	10
3.5.	Química de coordenação do lapachol	12
3.6.	Prata	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1.	Reagentes e Solventes Utilizados	20
4.2.	Métodos e Instrumentação	20
4.2.1	<i>Teste de Solubilidade</i>	20
4.2.2	<i>Ponto de Fusão</i>	21
4.2.3	<i>Análise Elementar de CHN</i>	21
4.2.4	<i>Espectroscopia no Infravermelho</i>	21
4.2.5	<i>Análise Térmica</i>	21
4.2.6	<i>Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do UV-Vis</i>	22
4.2.7	<i>Espectroscopia de Fluorescência</i>	22
4.2.8	<i>Eletroquímica</i>	22
4.2.9	<i>Testes antimicrobianos</i>	24
4.2.10	<i>Ensaio Antitumoral in vitro</i>	26
4.2.11	<i>Extração do lapachol e determinação da pureza via titulação potenciométrica</i>	28
4.2.12	<i>Síntese do Complexo</i>	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Considerações gerais: solubilidade e ponto de fusão.....	31
5.2	Titulação potenciométrica do lapachol	32
5.3	CHN	33
5.4	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	34

5.5	Análise térmica	37
5.6	Espectroscopia no UV-Vis	38
5.7	Absortividade molar	40
5.8	Espectroscopia de Fluorescência	43
5.9	Eletroquímica.....	45
5.9.1.	<i>Medidas Via Voltametria de Onda Quadrada</i>	45
5.9.2.	<i>Voltametria Cíclica em Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados</i>	50
5.10	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) ...	52
5.11	Ensaio Antitumoral	53
6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países com a maior biodiversidade do planeta, com aproximadamente 55.000 espécies nativas distribuídas ao longo dos biomas (VIEIRA, 1999). De acordo com um levantamento realizado pelo MMA (Ministério do Meio Ambiente) o cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma área de 2.036,448 Km², cerca de 22% do território nacional. A diversidade florística deste bioma é dita como a mais rica entre as savanas do mundo, possuidor de 6.429 espécies já catalogadas. Dessas espécies uma ampla gama é dotada de poder medicinal (RODRIGUES, 2005; PAGOTTO et. al., 2006; SILVA et. al., 2002).

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapêuticamente. Ao longo do tempo, essas plantas foram usadas desde em tratamentos simples como gripes, alergias, náuseas, dor de barriga entre outros, até mais tarde na fabricação de remédios, sendo as vezes elemento principal ou coadjuvante (GIRALDI & HANASAKI, 2010).

Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. No caso das drogas anticancerígenas e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70% (CALIXTO, 2003).

O Câncer tem sido a segunda causadora de mortes no mundo, ficando atrás, apenas das doenças cardíacas. Alguns programas de produtos naturais, conduzidos pelo Instituto Nacional do Câncer norte-americano (NCI) têm identificado que plantas ricas em naftoquinonas possuem um importante poder farmacológico contra essa doença (WEI et. al., 2009).

Essas quinonas são vastamente distribuídas na natureza e são estruturas com elevada capacidade medicinal devido ao grande potencial biológico apresentado pela espécie (KUMAGAI et. al., 1997; SILVA et. al., 2003). Elas são classificadas quimicamente em benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, e exercem importante desempenho em processos bioquímicos vitais (VASCONCELLOS et. al., 1998; NETTO et. al., 2000; TUKAJ & AKSMANN, 2007; AUCÉLIO et. al., 2013; SILVA et. al., 2014).

Algumas dessas moléculas ganharam destaque na química de coordenação por apresentarem papel admirável no cenário de possíveis fármacos para o tratamento de câncer. (FONSECA et. al., 2003; GALM, 2005; WOLKENBERG et. al., 2005; YONG et. al., 2008). Muitas destas quinonas bioativas encontram-se facilmente em plantas do cerrado brasileiro, principalmente, na família das bignoniáceas, entretanto elas também são amplamente disseminadas em outras plantas típicas da América do Sul (PATERNO, 1882).

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona), extraído da serragem do Ipê, pertence à classe das naftoquinonas e apresenta importantes propriedades farmacológicas como antiinflamatória (ALMEIDA et. al., 1990), antiviral (SILVA, 2003), atividades microbidas, moluscicida (CAMARA et. al., 2008), antimalárica (ANDRADE-NETO et. al., 2004) e outras inúmeras atividades (GOULARD et. al., 1997). Porém, segundo alguns autores esta naftoquinona também apresenta alguns efeitos adversos (SILVA, 2003; VERMA, 2006; ESTEVES-SOUZA et. al., 2007; SALUSTIANO, 2010), como a sua interferência no metabolismo do oxigênio celular, impedindo a respiração das células, causando danos a alguns componentes celulares, tanto de células tumorais como em células normais (HARADA et. al., 2009).

Os produtos naturais tem sido de grande importância na descoberta de novas moléculas biologicamente ativas (PUPO et. al., 2007). No entanto, devido a sua toxicidade, modificações químicas são realizadas para melhorar sua ação farmacológica. Desta forma a interação do lapachol com íons metálicos pode servir como artifício para eliminar seus efeitos negativos, além de proporcionar um avanço em suas propriedades (De OLIVEIRA et. al., 2011).

O desenvolvimento de compostos inorgânicos como agentes terapêuticos tem se intensificado no panorama atual, e a complexação desta molécula bioativa utilizando metais de transição, como a prata, pode ser de grande relevância, já que o presente metal demonstra baixa toxicidade e inúmeras propriedades, sendo a de maior destaque as antimicrobianas (HOFFMAN, 1984; HUGO 1992).

O estudo dos complexos metálicos leva ao entendimento de suas propriedades tais como sua cor, potencial redox, propriedades magnéticas, ópticas e estruturais. São essas

propriedades que despertam cada vez mais o interesse dos pesquisadores para aplicação desses compostos, principalmente na área medicinal e tecnológica (LEE, 1999).

Desta forma é de grande relevância estudos que demonstrem a interação da naftoquinona natural com o íon metálico prata, visando potencializar as atividades terapêuticas apresentada pela molécula, assim como estudar e caracterizar o ambiente químico do composto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A partir do ligante natural lapachol (extraído do ipê), promover a síntese e caracterização de um complexo metálico contendo íon Ag^{I} , 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- $\text{Ag}(\text{I})$.
- 3- Caracterizar e estudar as propriedades físico-químicas do complexo obtido através de análise elementar de CHN, análise térmica e técnicas espectroscópicas (Infravermelho, UV-Vis e Luminescência).
- 4- Realizar estudos eletroquímicos (voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica em eletrodo modificado na pasta de carbono)
- 5- Realizar estudo das atividades biológicas (antimicrobiana e antitumoral) no ligante livre e complexo sintetizado.
- 6- Comparar os resultados obtidos para o complexo com aqueles apresentados pelo ligante não coordenado e com os padrões utilizados.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Química Inorgânica e os Produtos Naturais

Trabalhos multidisciplinares têm contribuído expressivamente para o desenvolvimento da química de coordenação com produtos naturais, sendo que esses trabalhos não só contribuem, como auxiliam na compreensão dos processos biológicos da espécie em questão. Além disso, os conhecimentos agregados por pesquisas em áreas entrelaçadas como: biologia, medicina, farmácia, química e física, permitem um maior embasamento científico e tem colaborado amplamente para a melhoria dos trabalhos, da qualidade de vida e, conseqüentemente, para a sociedade de modo geral (THOMPSON et. al., 2006; CASTILLO-BLUM et. al., 2000; PUPO, et. al., 2007).

A utilização das plantas que contêm substâncias bioativas com propriedades terapêuticas tem sido usada durante muitos séculos, sendo o único recurso medicinal de muitas comunidades no controle de inúmeras doenças (MACIEL et. al., 2002; SIMÕES et. al., 2007).

O desenvolvimento de compostos de coordenação a partir de produtos naturais demonstra um avanço promissor na busca de novas drogas. O estudo dessas interações, entre metais transições e ligantes bioativos tem sido foco de empenho científico recentemente, o interesse se dá em promover alterações estruturais nos compostos *in natura*, visando melhorar suas propriedades benéficas à saúde. Estas pesquisas voltadas para o isolamento de compostos naturais biologicamente ativos vem aumentado significativamente (FOGLIO, et, al., 2006; SIMÕES, 2002).

A química de coordenação envolvendo produtos naturais se tornou um alvo de pesquisa promissora, e alguns estudos tem focado na síntese de complexos metalo-flavonolatos e metalo-quinonas, indicando uma potencialização das já conhecidas atividades farmacológicas dos flavonóides e naftoquinonas.

Simões (2013) realizou a síntese e caracterização de um novo complexo de gálio(III) com o flavonóide natural quercetina, sendo que os autores avaliaram as propriedades eletroquímicas e biológicas do novo composto. No estudo da atividade antioxidante

baseado no radical livre DPPH, foi observado um aumento nessa propriedade quando se comparou o complexo ao ligante livre, o que demonstra claramente a importância da coordenação do íon metálico para o processo.

De Oliveira (2011) realizou coordenação do lapachol aos metais antimônio(V) e de bismuto(V). Em seus estudos além de analisar a estrutura cristalina dos mesmos, também avaliaram a atividade citotóxica de ambos. O resultado apresentou inibição do crescimento de uma linha celular de leucemia mielóide crônica, sendo o complexo de Bi^V cinco vezes mais ativo que o lapachol livre, mostrando assim a importância da coordenação.

Vários outros trabalhos relatam a síntese de compostos de coordenação com produtos naturais (PARRILHA et. al., 2012; CARUSO et. al., 2009, SOUZA & GIOVANI, 2005; TAN, 2008; BERREAU et. al., 2010; BUKHARI et. al., 2009).

Dentre os produtos naturais em destaque atualmente estão as quinonas, conhecidas na literatura por suas variadas atividades biológicas, das quais se sobressaem seu potente efeito antitumoral e antimicrobiano (SILVA et. al., 2014).

3.2. Quinonas

Um dos maiores desafios da química, bioquímica e farmacologia é o isolamento e elucidação dos componentes ativos presente em plantas e seus mecanismos de ação (SILVA et. al., 2003; PUPO, et. al., 2007).

Segundo Simões e colaboradores (2007) “os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em metabólitos primários e secundários”. O metabolismo primário é responsável pela síntese de proteínas, carboidratos e lipídeos, com funções vitais contudo é pouco visado na indústria farmacêutica. O metabolismo secundário já produz a maioria dos compostos bioativos das plantas e despertam um maior interesse na indústria farmacológica. Estas moléculas são encontradas em baixas concentrações, apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e grande atividade biológica (DOS SANTOS et. al., 2007; SIMÕES et. al., 2007; RAVEN, 2001).

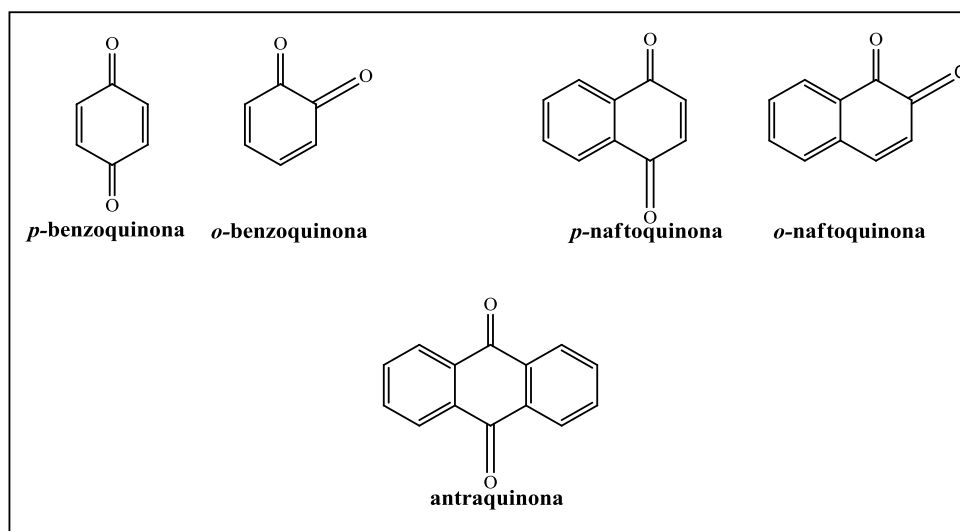
Dentre os metabólitos secundários destacam-se os flavonóides, taninos e as quinonas. As quinonas constituem uma classe de produtos naturais de ampla distribuição,

que vai dos vegetais superiores até bactérias, fungos, entre outros (GARCEZ, et. al., 2006; GAUTAM, et. al., 2014). Elas são um grupo de substâncias orgânicas fortemente coloridas presentes na natureza, são derivadas de compostos aromáticos como benzeno, naftaleno e antraceno (FARIAS, 1998; SILVA, 2003).

A característica principal da estrutura das quinonas é a presença de dois grupos carbonílicos em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados relativamente em posições “orto” (adjacentes) ou “para” (LOPES et. al., 1996; VASCONCELLOS et. al., 1998). Na Figura 1 tem-se três classes principais de quinonas que é dada em função do clico no qual o sistema de duplas e cetonas conjugadas está inserido, os grupos de quinonas são:

- benzoquinonas – um anel benzênico
- naftoquinonas – um anel naftilênico
- antraquinonas – um anel antracênico

Figura 1. Estrutura dos três principais grupos das quinonas.



Fonte: OLIVEIRA, 2012.

As quinonas são metabólitos secundários que correspondem a compostos de grandes famílias de ocorrência natural, exercendo funções na respiração, fotossíntese e

como elementos essenciais no processo de acoplamento energético (HARADA, 2009; KUMAGAI et. al., 1997; SILVA, 2003).

O avanço de estudos com quinonas tem-se dado em virtude de propriedades farmacológicas, devido à grande biodinamicidade que elas apresentam, com ênfase nas suas propriedades microbicidas, tripanossomicidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares, processos nos quais atuam de diferentes formas (TUKAJ & AKSMANN 2007; BOLTON et. al., 2000; CASTRO et. al., 2008).

Estudos sobre o mecanismo de ação biológica das quinonas destacam a importância do grupo quinonoídico como grupo farmacofórico, indispensável para geração de espécies reativas de oxigênio que induzem a apoptose (SILVA, 2003). Há vários modos de ação pelos quais as quinonas exercem atividade citotóxica, no entanto, não está claro qual dessas ações é mais importante para induzir danos celulares, porém o principal alvo da ação citotóxica é o DNA (SAIFY 1999; GALM, 2005; WOLKENBERG et. al. 2005).

As quinonas são potencialmente ativas em vários sistemas biológicos em sua forma nativa, isso ocorre por elas serem facilmente oxidadas e reduzidas. Algumas quinonas participam da fosforilação oxidativa, transportando elétrons entre a coenzima da flavina e os citocromos. Estas moléculas naturais também participam de processos biológicos tais como: fotossíntese (plastiquinonas), respiração mitocondrial (ubiquinona ou coenzima Q) e em processos enzimáticos, em que atuam como cofatores e são ativas na inibição do crescimento de bactérias e fungos, além da inibição do complexo das topoisomerasas, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular (SILVA, 2003; MONKS et. al., 1992; BUDZIAK et. al., 2004; SALMON-CHEMIN et. al., 2001).

A química das quinonas, já há muito tempo vem sendo descrita em trabalhos publicados, conforme relatado por DE OLIVEIRA et. al., (2011), MOLINA et. al., (2007), demonstrando não só sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também, o destaque que vem apresentando em estudos de diversas áreas da química.

3.3. Naftoquinonas

As naftoquinonas são quinonas dicetonas derivadas do naftaleno, suas carbonilas estão nas posições 1,2 do anel naftaleno e são chamadas de orto-naftoquinonas ou nas posições 1,4 e são chamadas de para-naftoquinonas (SIMÕES et. al., 2007).

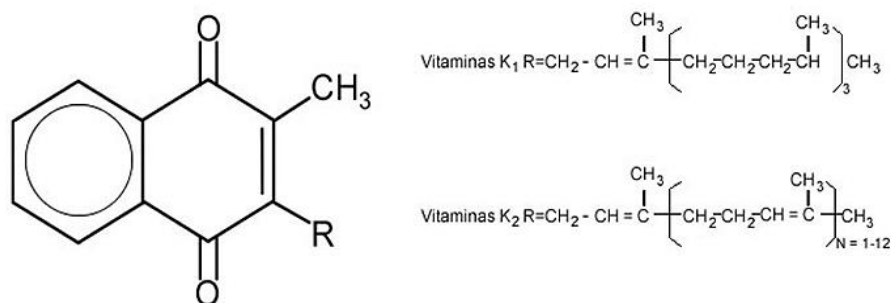
Elas estão disseminadas nos mais diversificados reinos, em relação à distribuição entre os vegetais, com sua maior parte encontradas nas famílias da Bignoniácea e Verbenácea, abundantes em vários biomas brasileiros, incluindo o cerrado. No Brasil, estima-se existir 46 tipos diferentes destas árvores, popularmente conhecidas como ipês (gênero *Tabebuia*) (DE CASTRO, 2006).

Por ser fortemente pigmentada, o primeiro uso dessas substâncias foi na indústria dos corantes, mais tarde as naftoquinonas naturais, como a lausona, junglona, plumbagina, lapachol entre outras, foram isoladas de fontes vegetais e destacou-se por seus usos na medicina tradicional (KUMAGAI et. al., 1997; SILVA et. al., 2003).

As naftoquinonas foram descritas como responsáveis por uma significativa redução do crescimento celular em linhagens tumorais, quando conjugadas a outros agentes ou quando formado complexos com metais (CHEN et. al., 2004). Este subgrupo das quinonas são atualmente os que vem recebendo maior atenção de pesquisadores de todo o mundo, devido às suas propriedades redox interferirem em diferentes processos oxidativos (BABULA, et. al., 2012; NEVES, et. al., 2012; PINTO, et. al., 2014). São moléculas altamente redox, e por este motivo conduzem à formação de espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 e O_2^- que são as principais espécies responsáveis pelo estresse oxidativo, danificando a membrana celular (SILVA, et. al., 2003; ROYO, et. al., 2013).

Uma naftoquinona importante pode-se citar a vitamina K (Figura 2), que é essencial na manutenção da coagulação sanguínea e na prevenção de doenças cardiovasculares, e no tratamento da osteoporose (MORRISON et. al., 1970; EBELLE et. al., 2010).

Figura 2. Estrutura química da vitamina K.



Fonte: PARILHA, 2012.

Nos grupos das naftoquinonas naturais tem-se destacado em especial o lapachol, que pode ser considerado um dos principais representantes do grupo. As atividades biológicas do mesmo vem sendo estudadas a séculos, até os dias de hoje, e o principal interesse no lapachol é devido a sua capacidade de induzir o estresse oxidativo, através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio (SILVA, et. al., 2003).

3.4. Lapachol

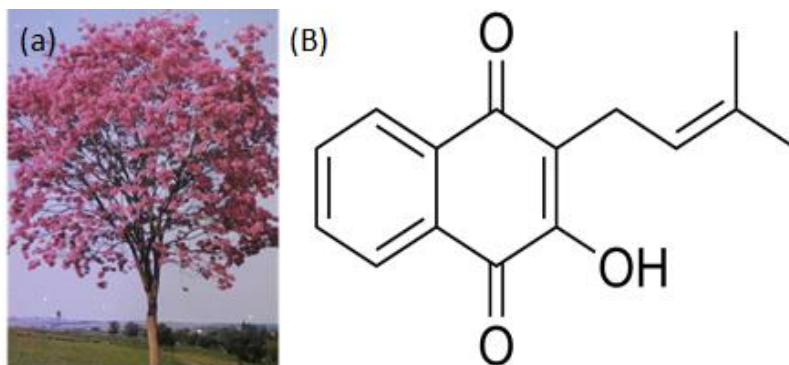
O lapachol é uma naftoquinona natural que foi isolada pela primeira vez em 1882 por E. Paterno. Sua extração ocorreu do lenho de uma árvore argentina conhecida popularmente pelo nome de lapacho, da qual se originou seu nome. De acordo com a IUPAC sua nomenclatura é 2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, possui peso molecular 242,26 g. mol⁻¹ com fórmula molecular C₁₅H₁₄O₃ e ponto de fusão entre 139,5 a 140,2 °C. Apresenta solubilidade em acetona, etanol, metanol, clorofórmio, benzeno, ácido acético, éter etílico, hexano, diclorometano, acetonitrila, DMSO, DMF e sendo insolúvel somente em água a frio (EPIFANO et. al., 2013; De OLIVEIRA, et. al. 2011).

É facilmente obtido por extração da serragem do cerne de várias espécies de plantas, como as árvores das famílias Scrophulariaceae, Malvaceae, Verbenáceae, Proteáceae e Sapotaceae, porém possui uma maior abundância na família Bignoniaceae (Tabebuia e Tecoma) (Figura 3a).

A elucidação estrutural do lapachol ocorreu através dos trabalhos publicados por Hooker e colaboradores (Figura 3b) (ROSA, 2000).

Um amplo leque de atividade terapêutica tem sido atribuído ao lapachol e seus derivados, tais como anticarcinoma, anti-inflamatório, antimalárica, antisséptico, antitumoral, antiviral, bactericida, fungicida, entre outras (ROSA, 2000; SILVA et. al., 2003; HUSSAIN et. al., 2007).

Figura 3. Lapachol- (a) Árvore família Bignoniaceae (Ipê) (b) Estrutura química do lapachol.



Fonte: ADAPTADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2015

Os primeiros estudos sobre as atividades biológicas do lapachol foi iniciado no Instituto de Antibióticos/UFPE, pelo Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima a partir de 1956, que encontrou atividade antimicrobiana do ipê-roxo frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Myotis flavus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus. cereus* e *Escherichia coli*, notando maior eficácia em microorganismos Gram-positivos, e baixa ação contra Gram-negativos, porém alguns os experimentos mostraram também acentuada atividade contra o gênero *Brucella*. Nesses estudos verificou-se também que à medida que se eleva o grau de pureza da quinona, diminui-se progressivamente a atividade antimicrobiana do mesmo (LIMA, et. al., 1962; FONSECA, et. al., 2003).

Outra importância biológica do lapachol encontra-se na sua atividade antiparasita, usado como barreira tópica para a pele, ativo contra o *Trypanosoma cruzi*, causador da

doença de Chagas, sem cura conhecida até hoje. Já sua ação antifúngica pode estar relacionada a capacidade do mesmo interagir com a membrana celular desses micro-organismos (SALMON et. al., 2001).

As avaliações dos efeitos terapêuticos do lapachol contra o câncer iniciou por volta dos anos 60, muitos estudos confirmaram a eficácia desta naftoquinona como um agente antineoplásico. Entretanto, ensaios clínicos revelaram que as concentrações elevadas necessárias para que esta droga atue como um agente quimioterápico, eficaz contra o câncer humano, resultaram em efeitos secundários muito tóxicos, além do surgimento de efeitos colaterais como náusea, vômito e efeito anticoagulante (SILVA et. al., 2003; OLESON, et. al., 1968). Sua atividade antitumoral pode estar relacionada à sua interação com ácidos nucleicos. Ao mesmo tempo, tem sido proposto que as naftoquinonas interagem com os pares de bases da dupla hélice do DNA, inibindo a síntese do RNA e sua replicação.

Desse modo, frente às várias pesquisas que demonstram a potencialidade das propriedades químicas e biológicas do lapachol, torna-se evidente que este se apresenta como um composto promissor.

3.5. Química de coordenação do lapachol

Compostos de coordenação têm ofertado novas possibilidades para a pesquisa com o foco em propriedades biológicas, isto em função dos diversos estudos da interação de íons metálicos com ligantes orgânicos, especialmente aqueles que já possuem atividades de ação biológica (CASTILLO-BLUM et. al., 2000, AHAMAD, et. al., 2006).

O lapachol é capaz de se coordenar a diversos íons metálicos de relevância biológica, o que influencia diretamente nas propriedades redox das naftoquinonas. Sabe-se que, em geral a introdução de metais de transição na sua estrutura pode levar a profundas mudanças em suas atividades, o que pode resultar em um avanço significativo.

Seus ambientes de coordenação a metais são através dos oxigênios em posição orto, no qual adquire a função cetona-enólica. Dependendo do metal envolvido e de seu estado de

oxidação, a coordenação pode ocorrer somente pelo oxigênio enólico (grupo hidroxil) ou por ambos os oxigênios (OLIVEIRA et. al., 1997).

Os íons metálicos utilizados na química de coordenação são dos mais variados, e possuem amplas aplicações. Complexos de ouro(I), por exemplo, são usados no tratamento de artrite, com destaque para a auranofina (OTT, 2009), complexos de prata(I) são comuns no tratamento de infecções bacterianas, com destaque para a sulfadiazina de prata, complexos contendo platina(II) e platina(IV), como o *cis*-diaminodicloroplatina(II) (*cis*-platina), são utilizadas no tratamento do câncer. Compostos de vanádio(V) e vanádio(IV) são empregados no tratamento de diabetes, complexos de ferro como anti-hipertensivos (CHEM, 2009) e complexos à base de lítio para o tratamento de distúrbios psíquicos (KLEIN & MELTON, 1966).

Relatos da literatura demonstram o uso do produto natural lapachol na síntese de complexos metálicos. Vários metais de transição já foram investigados, juntamente com essa molécula promissora.

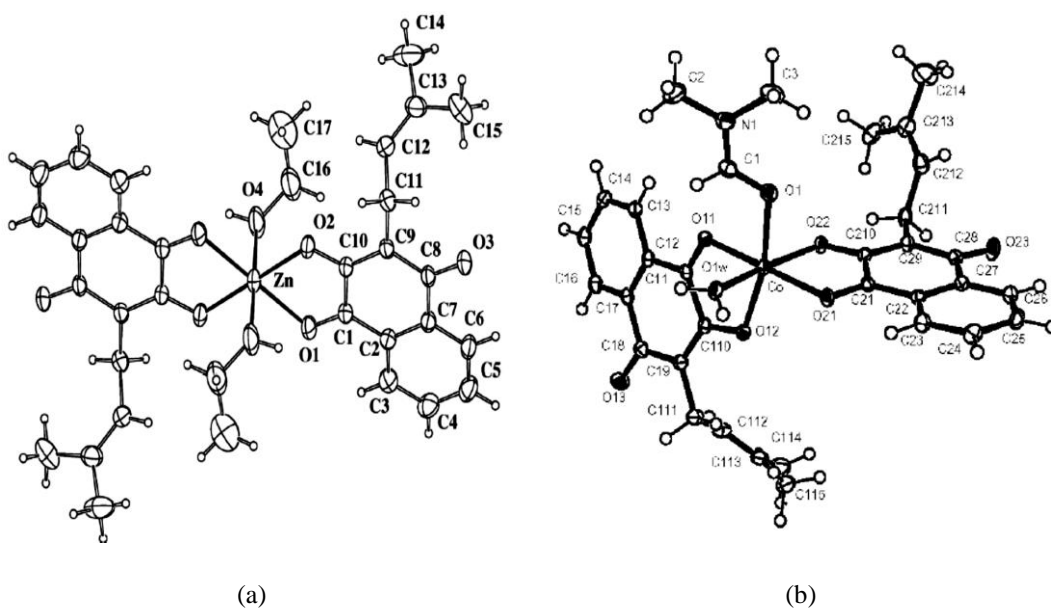
Em 2003, Martinez e colaboradores realizaram a síntese de um complexo de zinco(II) com o referido ligante bioativo, utilizando etanol como solvente. A coordenação ocorreu de forma bidentada, onde o metal ligou-se através dos oxigênios (função ceto-enol) presente no lapachol, obtendo-se assim uma geometria de coordenação octaédrica, completada através de 2 moléculas do solvente $[Zn(Lap)_2(EtOH)_2]$.

Um pouco mais tarde, Martinez (2005) relatou sínteses e as estruturas moleculares de dois complexos isoestruturais de Co(II) e Zn(II), que foram elucidados por difração de raios-X e outras técnicas. Os dois novos complexos hexacoordenados (Figura 4) apresentaram DMF (dimetilformamida) e água em suas estruturas cristalinas $[Co(Lap)_2(DMF)(H_2O)]$ (a) e $[Zn(Lap)_2(DMF)(H_2O)]$ (b).

Molina e colaboradores (2007) realizaram a síntese de complexos utilizando cobalto, níquel e cobre, todos em estado de oxidação II, utilizando etanol como solvente na síntese dos complexos. Nos três casos o lapachol desprotonado se comporta como quelante bidentado, através dos oxigênios carbonílicos e fenólicos.

Em 2009 Farfán, obteve uma estrutura cristalina utilizando íon lapacholato com níquel (II). A estrutura cristalina do complexo apresenta geometria octaédrica com átomos de lapachol coordenados através da carbonila, além de águas e o solvente DMF coordenados nas posições axiais do complexo. Ainda no mesmo ano Caruso e colaboradores, publicou um trabalho apresentando a síntese do composto utilizando íons manganês (II).

Figura 4. (a) Estrutura com complexo $Zn(Lap)_2(EtOH)_2$ (Martinez et. al., 2003) e (b) estrutura do $[Co(Lap)_2(DMF)(H_2O)]$ (Martinez et. al., 2005).

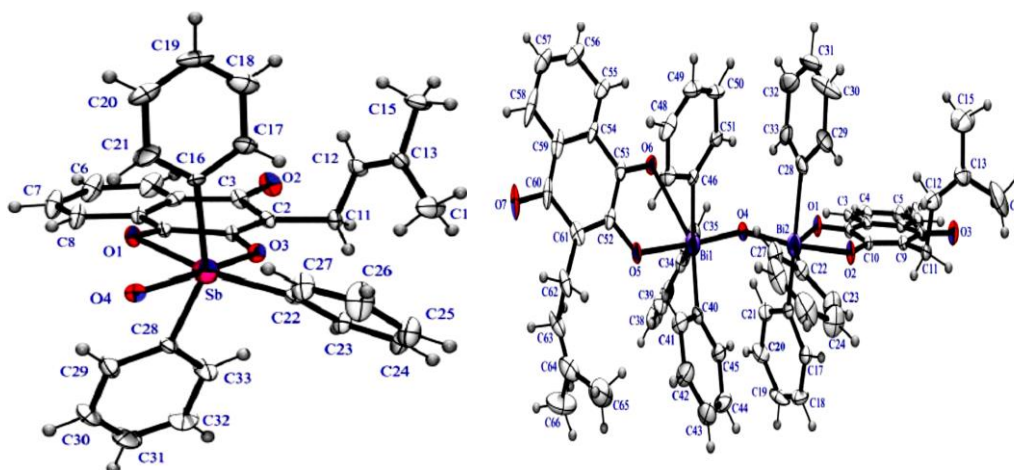


Fonte: MARTINEZ et. al., 2003; MARTINEZ et. al., 2005.

De Oliveira et. al., (2011) realizou a coordenação do lapachol aos metais antimônio(V) e de bismuto(V), utilizando fosfina (Ph_3) na síntese (Figura 5). Em seus estudos, além de analisar a estrutura cristalina dos mesmos, também avaliaram a atividade citotóxica de ambos. O resultado apresentou inibição do crescimento de uma linha celular de leucemia crônica, sendo o complexo de Bi^V cerca de cinco vezes mais ativo do que o lapachol livre.

Outro relato de coordenação desta naftoquinona foi publicado em 2012 por Parrilha et. al., onde foi sintetizado um complexo de bismuto(III), neste caso os autores visaram os estudos das atividades anti-inflamatórias e anti-angiogênicas do ligante. A coordenação ocorreu 2:1 razão ligante/metal, de modo bidentado através do oxigênio carbólico e fenólico.

Figura 5. Estrutura dos complexos $(Lp)(Ph_3Sb)OH$ e $(Lp)_2(Ph_3Bi)_2$ De -Oliveira et. al, 2011.



Fonte: DE OLIVEIRA et. al., 2011.

O artigo publicado por Kandioller e colaboradores (2013), traz a síntese de organometálicos obtidos a partir de complexos Lapacholato-M (Ru^{II} , Os^{II} e Rh^{III}) com arenos. Em 2014 foi relatado em um trabalho de Barbosa et. al., a elucidação estrutural de um complexo lapachol rutênio(II) e estudos voltados para as atividades leshimanicidas do mesmo.

Por apresentarem inúmeras características desejáveis, a busca por complexos metálicos oferece muitas possibilidades para o avanço da ciência. Vista importância do ligante propõe-se obter um novo complexo de prata, como uma possível alternativa frente à multirresistência bacteriana.

3.6. Prata

As atividades exercidas por íons metálicos nos meios biológicos têm estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de compostos inorgânicos como agentes terapêuticos. Nos últimos anos, a química inorgânica tem demonstrado a eficácia no desenvolvimento dessa área, baseando-se no conhecimento da funcionalidade de alguns metais de transição em várias reações no sistema biológico, fazendo parte de metaloenzimas fundamentais no organismo.

Dentre os metais de transição classificados como elementos essenciais e/ou traços no corpo humano, é possível citar vários desses como imprescindíveis a vida humana como: ferro, cobre, zinco, cálcio, magnésio, entre outros.

Embora não seja um elemento biológico essencial, a prata metálica e seus derivados apresentam várias aplicações que a faz de extrema importância para o ser humano, como as aplicações medicinais, isto, por possuir propriedades antimicrobianas, além de ser de baixa toxicidade em seres humanos (FARRELL, 2004; SADLER, 1999; PERCIVAL, 2007).

A prata encontra-se entre os três primeiros metais descobertos pelo homem, juntamente com o ouro e o cobre sendo conhecidos também como metais de cunhagem.

Localiza-se no bloco d da Tabela Periódica (metal de transição), grupo 11, período 5 distribuição eletrônica $[\text{Kr}]4d^{10}5s^1$, seu estado de oxidação pode variar de 0 a 3. Porém, os estados mais conhecidos e estáveis são 0 e 1. Possui cor prateada, é brilhante, maleável, dúctil e apresenta ótima condutividade elétrica. É pouco reativa e bastante resistente à corrosão. Embora não seja muito abundante, pode ser encontrada no estado nativo e na forma combinada, como no mineral argentita (Ag_2S).

Seu potencial de redução padrão é positivo e por isso, não é suscetível à oxidação pelos íons H^+ sob condições padrão, esse caráter nobre justifica sua aplicação em joias e ornamentos. No entanto, objetos de prata perdem lentamente o brilho quando expostos ao ar, pois ocorre a formação de sulfeto de prata (Ag_2S) devido à pequena presença de compostos sulfurados no ar atmosférico (DE SOUZA, et. al., 2013)

A prata possui atividade antimicrobiana, assim como o ouro, o cobre e o zinco, porém com maior eficácia (CASAGRANDE, 2010). Moyer e colaboradores em (1965) foram, provavelmente os primeiros a abordarem o uso tópico da prata no cuidado de feridas desenvolvendo um tratamento eficaz contra queimaduras infectadas utilizando-se de um creme a base de nitrato de prata a 0,5%. Seus estudos concluíram que o mesmo era eficaz contra microorganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus hemolyticus* sem causar resistência por conta da prata.

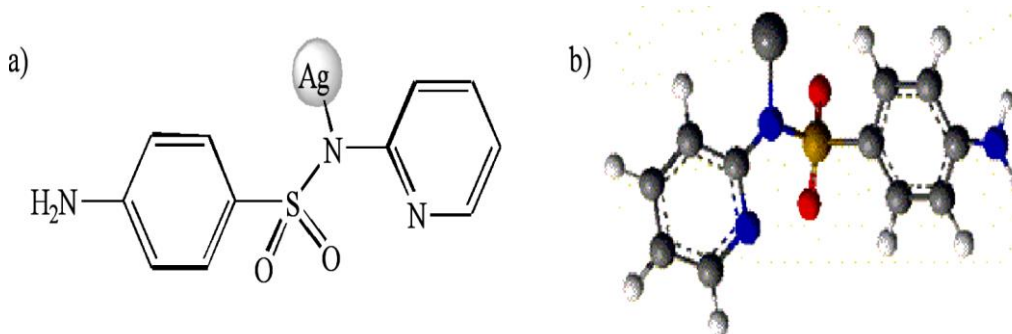
A ação ocorre na interferência do metabolismo bacteriano, íons prata agem na estrutura das proteínas, desativando-as, logo desativa-se a bactéria, as enzimas das bactérias transportam íons e geram energia, ao serem desativadas, ocorre o bloqueio da respiração e a consequente morte da bactéria (FENG et. al., 2000). Íons prata interagem com ácidos nucleicos, preferencialmente com o DNA, gerando uma inibição da divisão celular das bactérias e consequentemente a inibição do crescimento e a morte da bactéria, o mecanismo é sempre o mesmo, independente de sua forma de apresentação. (JUNG et. al., 2008).

Compostos de prata têm sido empregados como agentes antissépticos desde o início do século XIX, onde soluções de nitrato de prata eram usados como antisséptico e para prevenir a oftalmia neonatal. Por volta de 1940, surgiu o complexo sulfadiazina de prata (SSD) (Figura 6), um medicamento que consiste na reação entre a sulfadiazina de sódio e o nitrato de prata em solução, este composto ainda é amplamente utilizado na medicina em pacientes queimados para evitar e tratar infecções, possuindo amplo espectro de atividade, tendo alta eficiência contra *Pseudomonas aeruginosa*, um dos principais organismos responsáveis pelas infecções decorrentes de queimaduras (McDONNELL & RUSSEL, 1999).

Em relação a sua toxicidade é baixa em humanos, sendo considerado mínimo o risco de intoxicação por inalação, ingestão, absorção pela pele e ferimentos ou mesmo por aplicação intravenosa. Porém quando uma quantidade excessiva de prata é aplicada através de medicamentos usados tópicos ou sistemicamente, pode levar a deposição de partículas de

prata metálica e de Ag_2S principalmente na pele (argiria), olhos (argirose) e em outros órgãos (LANDSDOWN, 1995).

Figura 6. Complexo de prata - (a) Estrutura da sulfadiazina de prata. Em (b) sua respectiva estrutura em 3D.



Fonte: DE SOUZA, 2013.

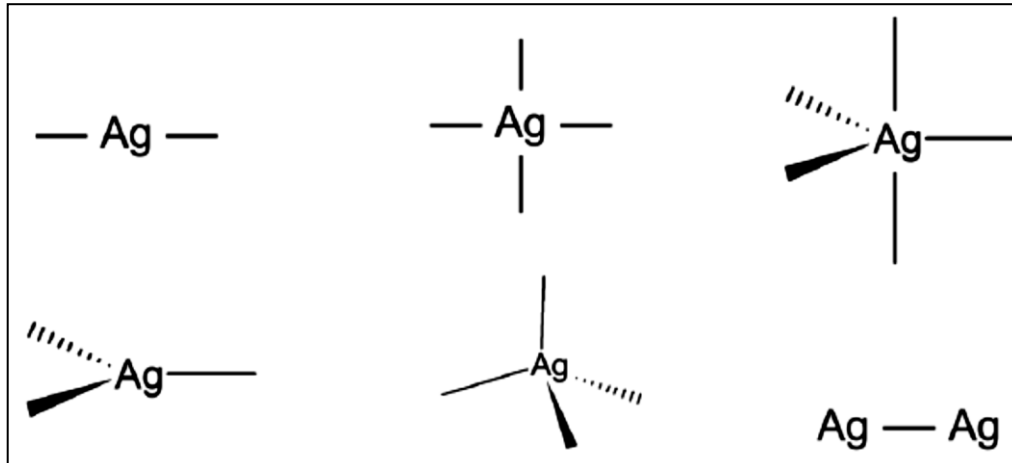
Estes compostos são absorvidos pelo corpo e permanecem no sangue até se depositarem nas membranas mucosas, formando uma película acinzentada. Essas condições podem não causar risco de morte, mas são cosmeticamente indesejáveis (DRAKE; HAZELWOOD, 2005; BRANDT et. al., 2005; LANSDOWN, 2006; HADRUP LAM, 2014).

Na área inorgânica a prata possui uma química de coordenação rica e ainda com muito a ser explorada. Na literatura é possível encontrar compostos com diversos modos de coordenação e geometrias (HUHEEY et. al., 1993; ATKINS, 2010).

Dentre as geometrias mais comuns, destacam-se a geometria linear (número de coordenação = 2), trigonal planar (número de coordenação = 3), tetraédricas (número de coordenação = 4) e octaédricas (número de coordenação = 6). Alguns exemplos dos modos de coordenação dos complexos de prata(I) são apresentados na Figura 7.

Além das propriedades já mencionadas a prata é, dentre, os metais o melhor condutor de corrente elétrica, por isso, é uma escolha natural para diversos componentes eletrônicos, desde telefones, computadores, placas de circuito impresso, entre outros.

Figura 7. Alguns exemplos de modos de coordenação da prata.



Fonte: SEGURA, 2014

Levando em consideração a sua essencialidade em um enorme número de processos biológicos, é de considerável interesse a interação desses íons com ligantes ativos biologicamente (LIPPARD & BERG, 1994).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Solventes Utilizados

Os reagentes e solventes empregados na síntese do complexo, extração do lapachol e análises, foram utilizados sem nenhuma purificação adicional, foram adquiridos de fontes comerciais (com exceção do lapachol que foi extraído pelo grupo de pesquisa): Nitrato de prata (Synth; 99%), Hidróxido de amônio (Cinética; P.A), 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 tetrabutylamônio (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 (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 *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).

4.2.2 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão dos compostos foram medidos através do aparelho Quimis modelo Q340M13, com termômetro de temperatura máxima em 310 °C, na Unidade Universitária de Naviraí.

4.2.3 Análise Elementar de CHN

A determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo em um analisador Perkin Elmer - CHN 2400, a partir das amostras devidamente purificadas de cada composto. Foram realizadas as análises para o ligante e seu respectivo complexo.

4.2.4 Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho (4000 a 450 cm^{-1}) foram obtidos em um espectrofotômetro Thermo Nicolet Nexus 650, com acessório de detecção por fotoacústica (resolução 8 cm^{-1} , média de 256 espectros por segundo) 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 °C min^{-1} , partindo da temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) até 900 °C, em atmosfera oxidante de ar sintético com fluxo de 60 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 de Absorção Molecular na Região do 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 acetonitrila (grau espectroscópico) e celas de quartzo com capacidade para 4,0 mL com 1 cm de caminho óptico (concentração $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). As medidas de absorvidade molar foram realizadas com o preparo das amostras (ligante e complexo) em acetonitrila 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 ambiente e as análises realizadas em triplicata, com os resultados obtidos reprodutíveis. As análises foram realizadas utilizando-se acetonitrila (grau espectroscópico) na concentração $6,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em parceria com o Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires na Universidade Federal da Grande Dourados.

4.2.8 Eletroquímica

4.2.8.1 Medidas Via 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^+ 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).

4.2.8.2 Testes Eletroanalíticos com Pasta de Carbono

4.2.8.2.1 Purificação do grafite utilizado na 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^{-1} . 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 no dessecador.

4.2.8.2.2 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_2SO_4 2 mol L^{-1} 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 Ag^{I} foi similar ao descrito anteriormente para o lapachol, utilizando-se as mesmas quantidades.

4.2.8.2.3 *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 ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$), além de cada um dos eletrodos modificados que atuaram como eletrodo de trabalho. Como eletrólito utilizou-se uma solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. 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_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (lapachol) e aproximadamente 30 minutos em uma solução de Na_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (complexo).

4.2.9 *Testes antimicrobianos*

4.2.9.1 *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 (100, 50, 25, 12,5, 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

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 $1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ (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 $5,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹.

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 $5,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, exceto no tubo de controle negativo.

Os tubos de ensaio com a solução teste foram incubados a $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 *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 1). 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 cm³ (Nunc[®]), com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc[®]), de cada suspensão celular, em meio RPMI/5% SFB, acrescido de penicilina: estreptomicina (1000 U mL⁻¹: 1000 µg mL⁻¹; 1,0 mL L⁻¹ RPMI). Após 24h de incubação, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹).

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 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No momento da adição das amostras, foi realizada a fixação, com ácido tricloroacético (TCA) a 50%, da placa controle chamada T0, o que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Tabela 1. Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem Celular	Órgão/Doença	Densidade de Inoculação (10^4 cel mL^{-1})
Linhagem Tumoral		
U251	SNC; glioma	3,0
MCF-7	Mama; adecarcinoma	6,0
NCI-ADR/RES*	Ovário; adenocarcinoma	5,0
786-0	Rim; adenocarcinoma	3,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma	4,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	4,5
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	7,0
HT-29	Colón; adenocarcinoma	5,0
Linhagem não Tumoral		
HaCaT	Pele (queratinócito)/Normal	3,0

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

Ao final de 48 horas de incubação, as células foram fixadas com 50 μL /compartimento de TCA a 50% e as placas incubadas por 1 hora a 4 $^{\circ}\text{C}$; 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

T₁ = absorbância do branco de células.

T₀ = absorbância do controle de células na placa T₀.

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 e determinação da pureza via titulação potenciométrica

4.2.11.1 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 buchner 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). A Figura 8 apresenta diferentes etapas da extração até a obtenção do produto final lapachol.

Figura 8. Etapas de extração do lapachol.



Fonte: PROPRIO AUTOR, 2015.

4.2.11.2 Titulação potenciométrica do lapachol

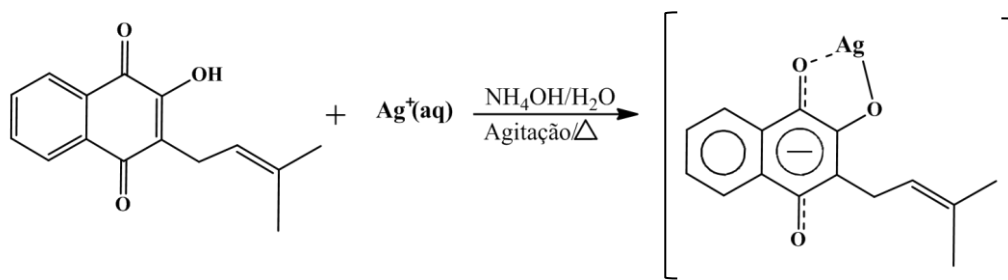
As soluções de LiCl 1 mol L^{-1} , NaOH $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 2 mol L^{-1} , H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e Na_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas segundo metodologia descrita na literatura (BACCAN, 1979; SKOOG et. al., 2007), assim como a padronização da solução de NaOH com padrão primário bifitalato de potássio, utilizando titulação potenciométrica com eletrodo de vidro combinado.

Foram solubilizados $0,012 \text{ g}$ de lapachol em um béquer de 100 mL utilizando uma mistura etanol/água ($50\% \text{ v/v}$). 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 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ 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.

4.2.12 Síntese do Complexo

A síntese do complexo $[Ag^I(lap)]$ foi realizada em estequiometria 1:1 (lapachol/ $AgNO_3$) utilizando hidróxido de amônio e água como solventes. Na primeira etapa o lapachol (0.134 g) foi solubilizado em NH_4OH e o sal de prata (0.0858 g) em H_2O , sendo que foram misturados e levados para aquecimento e agitação constante até a total volatilização da amônia (Figura 9). O pH foi controlado até que apresenta-se neutro. Obteve-se um sólido de coloração vermelho escuro (rendimento de 76%), que foi seco e caracterizado.

Figura 9. Síntese do complexo lapacholato- $Ag(I)$.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais: solubilidade e ponto de fusão

A extração do lapachol a partir da serragem do ipê, ocorreu de forma adequada, obtendo um produto final na forma de cristais amarelos. O complexo mononuclear foi obtido através da reação estequiométrica entre o nitrato de prata e o lapachol (1:1), em uma mistura de solventes (proporção 1:2 amônio e água). Esta mistura reacional foi levada para aquecimento e agitação constante até a total evaporação da amônia e redução do volume de água. Observa-se a formação do complexo no final da síntese obtendo-se um pó de coloração vermelho intensa o qual foi seco e caracterizado por CHN, técnicas espectroscópicas e termogravimétricas.

O estudo da solubilidade foi realizado como caráter preliminar para as análises subsequentes. A Tabela 2 mostra os resultados da solubilidade em diferentes solventes. O teste mostrou uma afinidade do lapachol em diversos solventes, sendo insolúvel somente em água. O complexo apresentou maior afinidade em solventes mais polares, mostrando ser solúvel somente em acetonitrila, DMF e DMSO.

Tabela 2. Solubilidades relativas do ligante livre e do complexo de Ag^I empregando vários solventes.

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

Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2015

Além da diferença de solubilidade, o ligante e complexo apresentaram diferentes pontos de fusão: o lapachol funde entre 138/140 °C, estando de acordo com a literatura (ARAÚJO et. al., 2002), para o complexo observa-se ponto de fusão de 168 °C. Esses dados preliminares apontam para formação do complexo.

5.2 Titulação potenciométrica do lapachol

A titulação potenciométrica 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 10), 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 hidróxido de amônio na síntese do complexo para auxiliar na desprotonação do ligante.

A partir do gráfico da primeira derivada do pH em função do volume de titulante (Figura 11) obteve-se o volume de equivalência, que foi utilizado na determinação do índice de pureza da naftoquinona natural. O índice de pureza, calculado a partir da média de três titulações, foi de 90,3% (grau técnico), porcentagem adequada para sua utilização na síntese do complexo metálico.

Figura 10. Curva de titulação potenciométrica do lapachol com solução titulante de NaOH 0,01036mol L⁻¹.

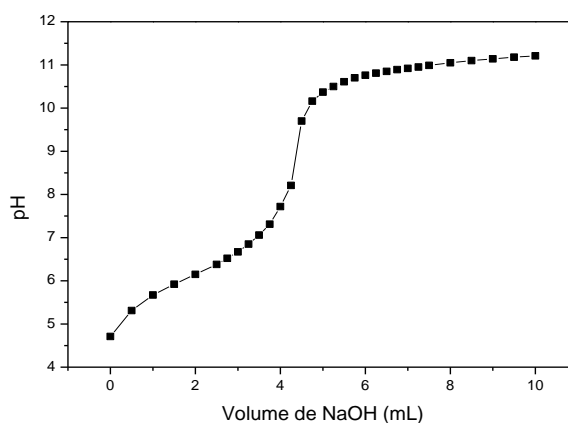
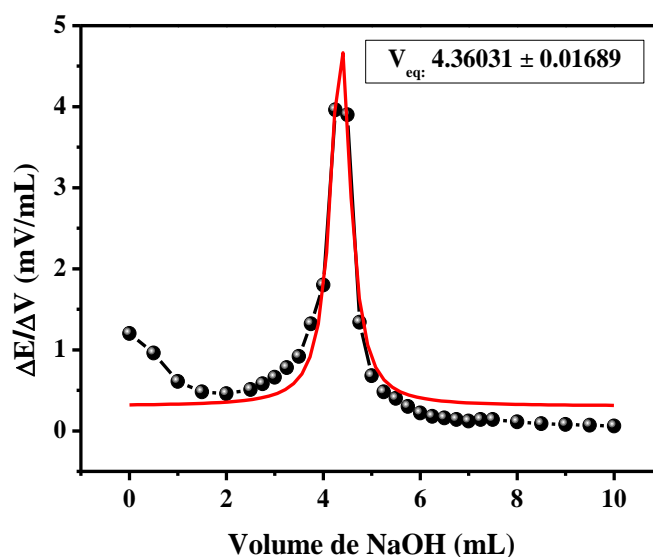


Figura 11. Primeira derivada da curva de titulação potenciométrica do lapachol



5.3 CHN

As quantidades de C e H foram determinadas através da análise elementar de CHN para o complexo, sendo que o resultado experimental está em concordância com os dados teóricos calculados, mostrados na Tabela 3, demonstrando que o complexo foi obtido através de uma estequiometria 1:1 e indicando um elevado grau de pureza. A análise apresenta um resultado concordante com a fórmula molecular $C_{15}H_{13}O_3Ag$ ($MM = 349,130 \text{ g mol}^{-1}$), apontando também que o complexo encontra-se na forma neutra. Os percentuais resultantes calculados indicam 13,75% oxigênio e 30,89% de prata.

Tabela 3. Porcentagens teóricas e experimentais obtidos através da análise elementar de CHN.

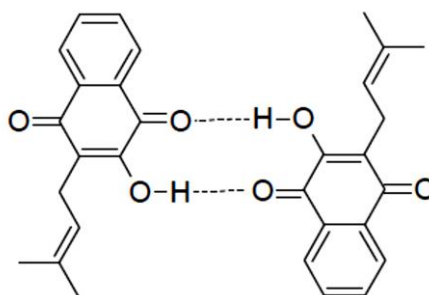
	Carbono	Hidrogênio
Calculadas	51,59%	3,74%
Encontradas	51,62%	3,68%

5.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada como ferramenta de caracterização estrutural dos compostos, auxiliando na determinação do modo de coordenação do lapachol ao centro metálico de prata(I). Alguns modos vibracionais, como, por exemplo, o estiramento da ligação O-H (ν O-H), são relevantes para sugerir a formação do composto de coordenação.

No estado sólido o lapachol apresenta-se sob a forma dimérica, em que sua estrutura é estabilizada por ligações de hidrogênio intermoleculares entre o oxigênio da carbonila e hidrogênio da hidroxila em *orto*, como mostrado na Figura 12 (FÁRFAN, R. A. et. al., 2009, DA SILVA, 2009; PARILHA et. al., 2012).

Figura 12. Estrutura dimérica do lapachol no estado sólido.



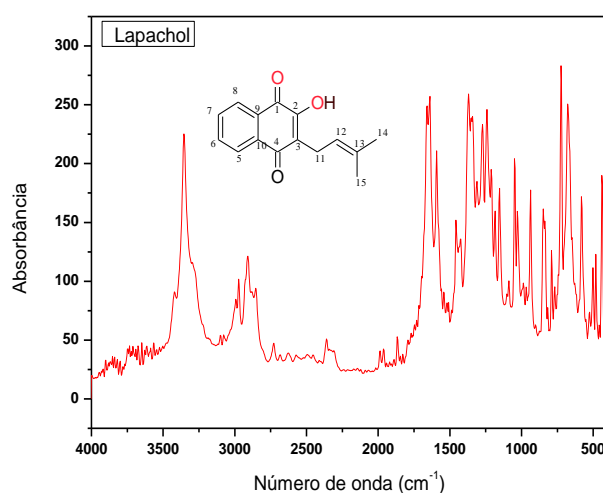
Fonte. PARILHA et. al., 2012.

Na Figura 13 é mostrado o espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante livre, onde observa-se uma banda intensa e aguda na região de 3352 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento da ligação O-H da hidroxila, além de uma banda de menor intensidade em 3420 cm^{-1} , indicando a interação de hidrogênio (FARFÁN et.al., 2012).

Outra região de interesse é a região de 1600 cm^{-1} característica de grupamentos carbonílicos. Verifica-se no espectro dois picos de absorção, um em 1657 cm^{-1} referente ao ν C=O do C1 e outro em 1638 cm^{-1} correspondente ao ν C=O do C4. Demais bandas características são observadas, como as bandas em 2971 , 2914 e 2855 cm^{-1} , referentes, respectivamente, aos estiramentos CH (C-12), CH₃ (14 e 15) e CH₂ (C-11). Na região 724

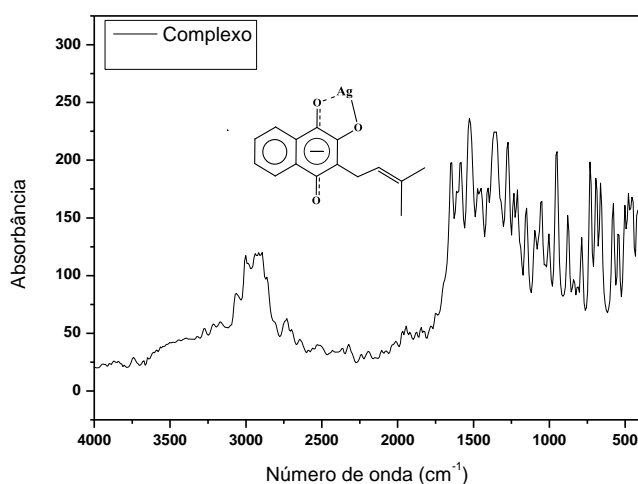
cm^{-1} , encontram-se as vibrações fora do plano do anel aromático, como: C-C, C-H e C=C (PARRILHA et.al., 2012; DE OLIVEIRA et.al., 2011; CARUSO et. al., 2009; MARTÍNEZ et. al., 2003).

Figura 13. Espectro na região do infravermelho do Lapachol.



Após a síntese do complexo observa-se mudanças significativas no espectro de infravermelho, demonstrando a influência do centro metálico no perfil vibracional do complexo, como pode ser observado na Figura 14 e na ampliação Figura 15 que compara ambos os espectros do ligante e complexo.

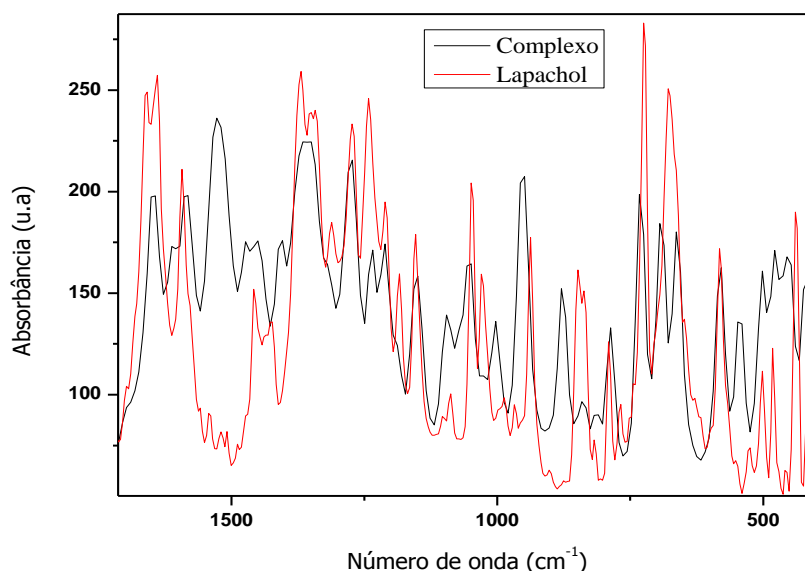
Figura 14. Espectro na região no infravermelho do complexo lapacholato- Ag^{I} .



Observa-se que a coordenação provoca alterações das bandas referentes ao lapachol, verificando-se o desaparecimento do pico em 3352 cm^{-1} referente estiramento da ligação O-H do grupamento fenol, esta ausência pode estar relacionada com a desprotonação deste grupo, o que sugere a coordenação do ligante ao íon metálico Ag^{I} através do oxigênio presente no carbono 2 do anel quinonoidico. Deslocamentos para menores números de onda (1657 cm^{-1} para 1647 cm^{-1}) são observados na região de absorção dos grupamentos carbonílicos, indicando também a coordenação através do oxigênio presente no carbono 1, a qual enfraquece o caráter da dupla ligação como previsto na literatura (FARFÁN et.al., 2012; MARTÍNEZ, M. A. et. al., 2003).

Na ampliação dos espectros (Figura 15) pode-se observar os deslocamentos apresentados quando compare-se o ligante e o complexo. A banda de estiramento C-O (fenol) foi observada em região de maior energia no complexo passando de 1240 cm^{-1} para 1290 cm^{-1} , enquanto a de deformação C-O (fenol) foi observada em menor número de onda deslocando-se de 1270 para 1232 cm^{-1} . Demais bandas como as atribuídas as ligações C=C, que foi deslocada para menor energia (1592 para 1528 cm^{-1}), e as mudanças correspondentes à deformação fora do plano das ligações C-H do anel que são observadas na região de 732 cm^{-1} (lapachol: 724 cm^{-1}). A sobreposição de bandas não permite verificar as alterações referentes aos estiramentos da carbonila na posição C-4, e C-O de fenol.

Figura 15. Ampliação dos espectros do ligante e complexo.



Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos via espectroscopia vibracional na região do infravermelho, reúne-se na Tabela 4 as principais bandas e atribuições para os grupos funcionais presentes nas estruturas dos compostos analisados.

Tabela 4. Principais bandas e atribuições, em cm^{-1} , dos espectros no IV para o lapachol livre e para o complexo

Atribuições	<i>Lapachol</i>	<i>Complexo</i>
$\nu(\text{O-H}_{\text{fenol}})$	3352	-----
$\nu(\text{C-H})$	2971	2971
$\nu(\text{CH}_3)$	2914	2914
$\nu(\text{CH}_2)$	2855	2856
$\nu(\text{C=O})_{\text{C1}}$	1657	1647
$\nu(\text{C=O})_{\text{C4}}$	1638	1585
$\nu(\text{C=C})$	1592	1528
$\delta(\text{C-O}_{\text{fenol}})$	1270	1232
$\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$	1240	1290

---- ausência da banda

5.5 Análise térmica

A análise termogravimétrica foi realizada para verificar o comportamento térmico e também para confirmar a proporção metal/ligante do complexo. As perdas de massa em função da temperatura para o ligante livre e o complexo são apresentadas na Figura 16.

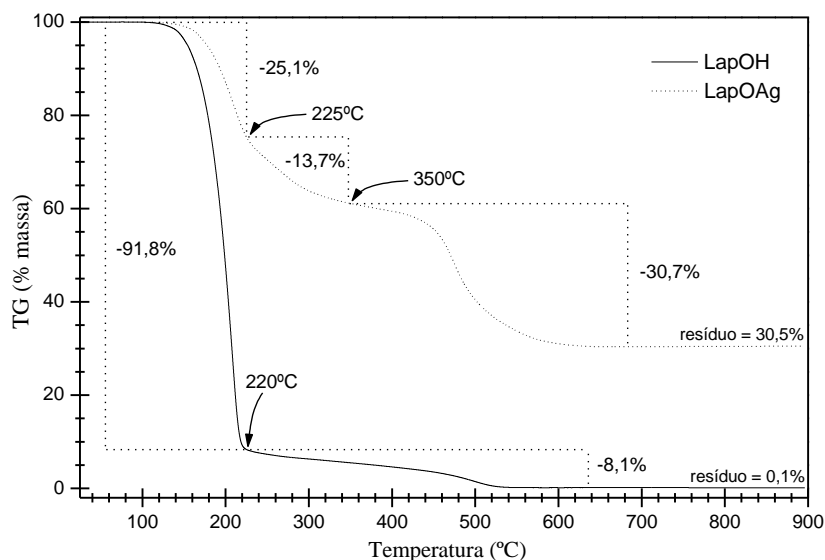
A decomposição da molécula de lapachol ocorre em duas perdas de massa: uma primeira perda que se inicia em $137\text{ }^{\circ}\text{C}$ e vai até $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ (91,8%), e uma segunda que vai de 220 até $540\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8,1%), onde o composto orgânico é totalmente carbonizado. Estes dados são concordantes com os estabelecidos pela literatura (SANTANA, et.al, 2008; KATAWATE, et.al, 2013; LIRA, et.al, 2007; MACEDO e NASCIMENTO, 2001)

Já no complexo, a decomposição ocorre em mais etapas do que no ligante. As duas primeiras etapas de degradação indicam a perda de uma parcela da molécula orgânica (38,87 %), sendo que estas decomposições ocorrem em uma faixa de temperatura entre 156

a 350°C. A terceira etapa envolve uma perda de massa de 30,7%, a qual é associada a decomposição da outra parte da molécula, ocorrendo em uma faixa de temperatura entre 350 e 600°C. O resíduo obtido após 600°C, cujo valor residual encontrado é de 30,5%, é concordante com o valor teoricamente calculado, indicando a formação de prata metálica (isto é verificado visualmente no cadinho).

Nota-se que não houve perda de massa na faixa anterior a 120 °C, o que indica que não há moléculas de água presentes na estrutura do complexo. Estes resultados concordam com os resultados obtidos através da análise elementar e espectroscopia no infravermelho, confirmando que o complexo mononuclear é formado pela estequiometria 1:1 metal/ligante, sendo que a partir daí é possível sugerir uma possível estrutura para o complexo (Figura 9).

Figura 16. Curvas termogravimétricas obtidas para o lapachol e o complexo.



5.6 Espectroscopia no UV-Vis

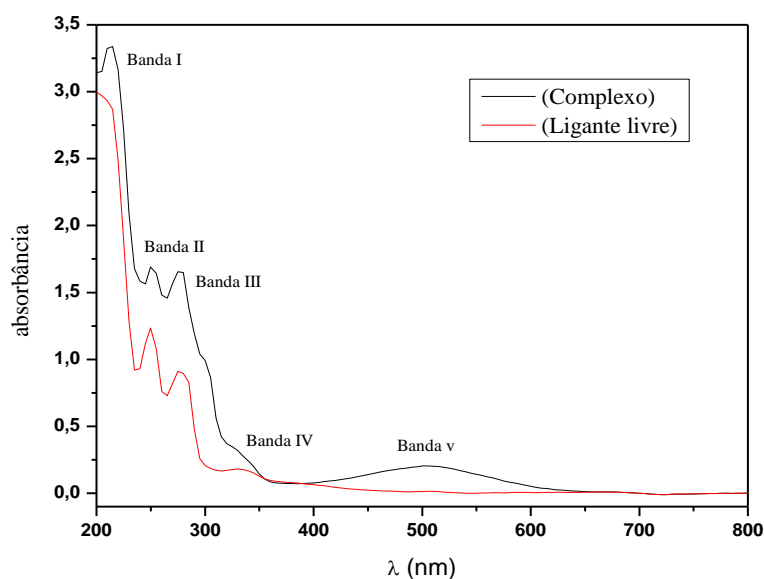
O comportamento espectroscópico de complexos de metais de transição coordenados a ligantes orgânicos está relacionado às prováveis transições eletrônicas entre os orbitais localizados no metal e nos ligantes. Os espectros na região do UV-Vis em

acetonitrila mostram diferenças significativas entre o lapachol puro e o complexo, demonstrando claramente a influência do centro metálico.

De acordo com a literatura (PORTUGAL et. al., 1997; CARUSO et. al., 2009; FARFÁN, et. al., 2012), o lapachol exibe três principais bandas de absorção na região do UV-Vis. A banda de absorção I com máximo de intensidade igual a 223 nm é atribuída as transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, oriundas dos anéis aromáticos enquanto, as bandas II e III que absorvem em máximo de 249 e 282 nm respectivamente são referentes às transições do sistema quinonoídico. Uma quarta banda de absorção com menor intensidade é observada em máximo igual a 330 nm e pode ser atribuída as transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \pi^*$, provenientes dos grupamentos carbonílicos presentes no lapachol (MARTÍNEZ, M. A. et. al 2003).

Na análise de absorção molecular na região do ultravioleta e visível realizado para o complexo verificou-se uma mudança no perfil espectral do mesmo, quando comparado ao seu respectivo ligante, como pode ser observado na Figura 17.

Figura 17. Espectro eletrônico do ligante e complexo nas concentrações de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Analisando-se o espectro eletrônico, verifica-se a presença de um ombro em 300 nm possivelmente está relacionado a modificações na distribuição eletrônica correspondente ao sistema quinonídico. O aparecimento de uma nova banda em λ máximo de 500 nm, sugere a coordenação do ligante ao centro metálico de Ag^{I} , sendo que este processo de absorção pode estar relacionado as transições eletrônicas do tipo TCLM (fenolato $\rightarrow \text{Ag}^{\text{I}}$). As bandas de absorção características do lapachol (Banda I-IV), que são atribuídas as transições eletrônicas do tipo TCIL (intraligantes) são observadas na região de maior energia sofrendo. Nota-se também um aumento referente as intensidades de absorção das bandas com efeito hipercrômico do complexo, notavelmente maiores que do ligante, também confirmando a influência do íon metálico (DA SILVA, 2009; FARFÁN et. al., 2012; CARUSO et. al., 2009).

5.7 Absortividade molar

Em estudos quantitativos envolvendo absorção de radiação, necessita-se de uma medida experimental que caracterize a quantidade de radiação eletromagnética absorvida por uma amostra, através de uma lei geral conhecida como Lei de Lambert-Beer. Ela demonstra que para uma dada substância em determinado comprimento de onda, a absorbância é diretamente proporcional à concentração deste absorvente para um mesmo caminho óptico ou diretamente proporcional a ele para uma mesma concentração.

A absortividade molar é um parâmetro que indica a intensidade da absorção relacionando a absorbância (A) e comprimento de onda específico à concentração molar da amostra (b), a partir do comprimento do caminho óptico (c) da célula espectroscópica (SOLOMONS & FRYHLE, 2001; SKOOG et. al., 2007), sendo que a relação entre estes parâmetros são expressos pela equação Lambert-Beer (Equação 1).

$$\epsilon = \frac{A}{b \cdot c} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: ϵ é a absortividade molar, A absorbância, b concentração molar da amostra e c caminho óptico.

A análise foi realizada para o lapachol e o complexo (Figura 18 e 19) utilizando-se como solvente acetonitrila (grau espectroscópico), sendo que os resultados obtidos (Tabela 5) mostram diferenças nos valores de absorvidade.

Tabela 5. Valores das absorvidades molares expressos em $\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

	Banda II	Banda III	Banda IV	Banda V
Lapachol	23.063	18.633	3.370	-----
Complexo	32.968	30.576	-----	3.257

Conforme visualizado no espectro comparativo da Figura 17, nota-se que a complexação potencializou a absorção de radiação eletromagnética, implicando diretamente no aumento das absorvidades molares (\AA) de todas as bandas, o que reflete as alterações na estrutura eletrônica. O processo de coordenação é o principal responsável pelo aumento das absorbâncias observadas, sendo que este efeito é denominado hipercrômico.

Figura 18. Espectro de eletrônico do lapachol. Solvente acetonitrila, 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) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Inserção: curvas analíticas relacionando absorbância e concentração.

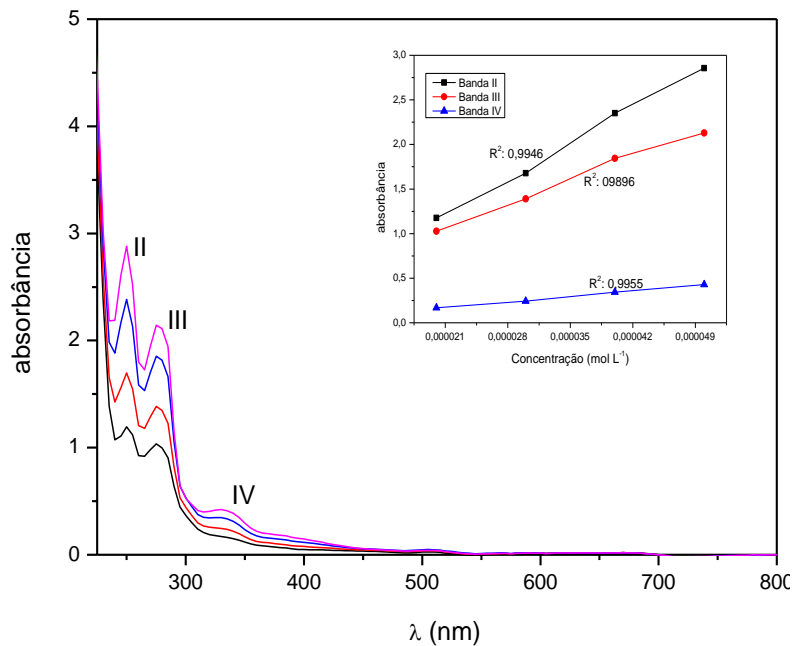
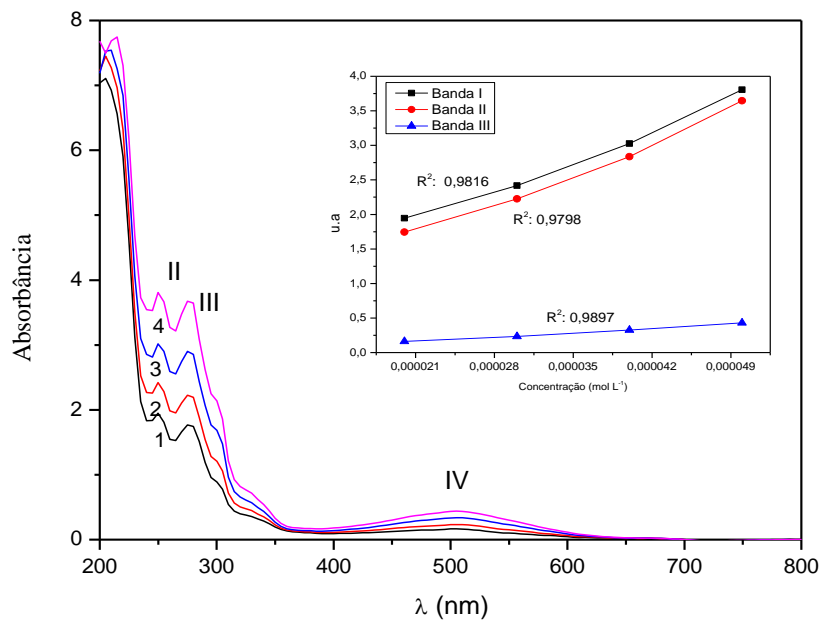


Figura 19. Espectro de eletrônico do complexo. Solvente acetonitrila, em concentrações de (1) $1,0 \times 10^{-5}$, (2) $2,0 \times 10^{-5}$, (3) $3,0 \times 10^{-5}$, (4) $4,0 \times 10^{-5}$ e (5) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Inserção: curvas analíticas relacionando absorbância e concentração.



5.8 Espectroscopia de Fluorescência

Atualmente tem havido um grande interesse no desenvolvimento de complexos metálicos com configuração d^{10} que possam apresentar propriedades luminescentes, devido a possíveis aplicações em áreas tecnológicas e farmacológicas.

As investigações das propriedades luminescentes foram realizadas para o complexo e seu ligante livre. Para a caracterização dos compostos através de luminescência inicialmente realizou-se um mapa de contorno 3D do ligante natural e do complexo metálico (Figura 20), com o intuito de observar a região de maior intensidade de luminescência dos mesmos. Os espectros de emissão do ligante e do complexo (Figura 21) foram plotados excitando-se na região de 325 nm.

A intensidade de luminescência apresentada pelo complexo lapacholato- Ag^I foi superior a do ligante livre, a qual pode estar relacionado ao enrijecimento do sistema resultando no aumento da intensidade de fluorescência (WANG, et. al., 2014). De acordo com FORMICA e colaboradores (2012) a coordenação de um íon metálico pode promover uma potencialização da emissão fluorescente, efeito chamado de (CHEF) do inglês Chelation Enhanced Fluorescence Effect, ou uma diminuição da fluorescência, efeito chamado (CHEQ) Chelation Enhancement Quenching effect, sendo que ambos podem estar atrelados a deslocamentos da banda de emissão.

A intensidade luminescente apresentada pelo complexo (Figura 20 e 21) foi superior a do lapachol não coordenado, atribuindo-se o efeito CHEF, o qual 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 esta 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. Nota-se que no complexo metálico há o surgimento de uma nova banda situada

na região do vermelho (~556 nm) que pode ser atribuída as transferências de carga ligante → metal (HUANG & ZHANG, 2014), sendo que estes dados são concordantes com os resultados obtidos nos estudos espectroscópicos por absorção.

Figura 20. Mapa de contorno 3D. (esquerda) lapachol e (direita) o complexo.

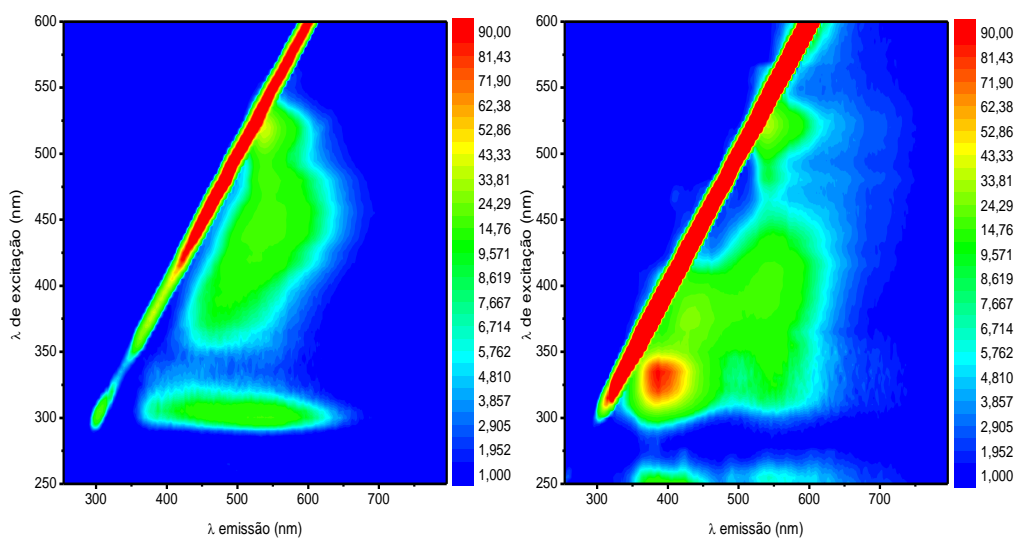
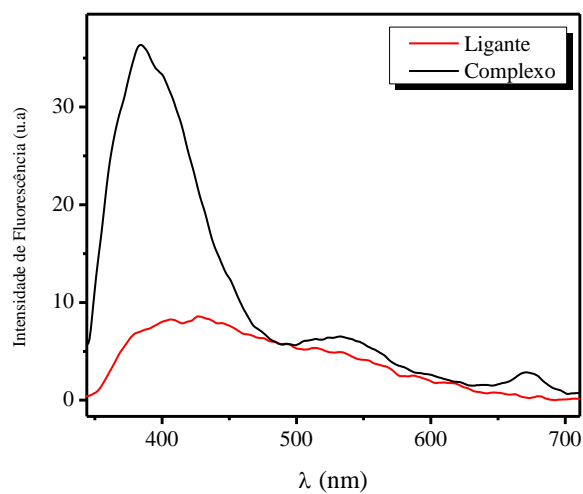


Figura 21. Espectro de emissão com excitação em 325 nm em concentração de $6,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



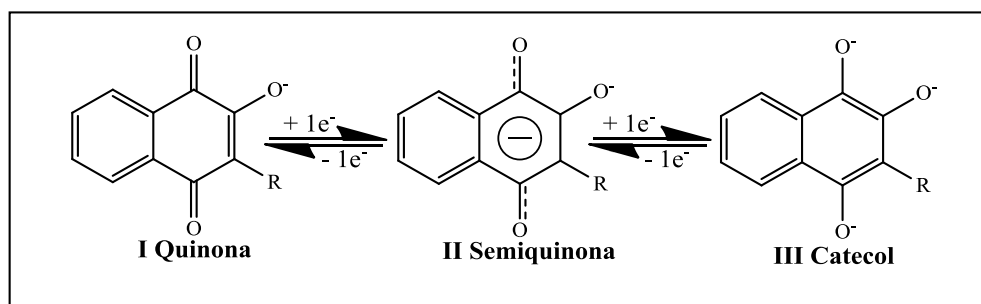
Uma vez que o composto de coordenação apresenta uma potencialização da fluorescência da quinona natural, ao mesmo tempo em que é dotado de potencial antitumoral perante diversas linhagens de células cancerígenas (conforme veremos adiante), o mesmo pode tornar-se um futuro medicamento antineoplásico com uma propriedade adicional relevante, ser um sensor químico fluorescente, o que pode servir como um biomarcador eficiente.

5.9 Eletroquímica

5.9.1. Medidas Via Voltametria de Onda Quadrada

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 22) (SALMON, et. al., 2001).

Figura 22. Representação estrutural dos três principais estados de oxidação das quinonas.



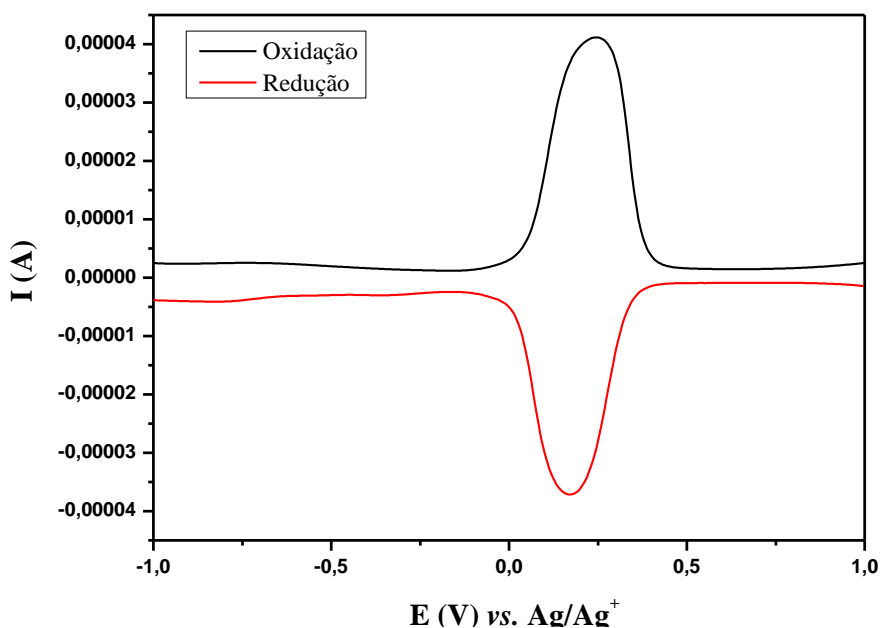
Fonte: KATHAWATE, 2014.

Estas espécies podem ter participação fundamental em processos vitais, assim como podem, em outros casos, danificar biomoléculas, como DNA e proteínas, alterando e possivelmente controlando a sua atividade biológica (De 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.

O comportamento eletroquímico do lapachol e do complexo foram investigados através da técnica voltamétrica de onda quadrada, sendo que todos os valores dos potenciais foram referenciados versus Fc^+/Fc (GAGNÉ, 1980), onde $E(Fc^+/Fc) = 0,209$ V vs. Ag/Ag^+ (Figura 23).

Figura 23. Voltamogramas via 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).



No caso do voltamograma de onda quadrada do lapachol (Figura 24 e Tabela 6), observa-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.

Embora sejam amplamente conhecidas várias formas redox das quinonas, algumas das quais representadas na Figura 22, 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 radicalares, entre outros) podem influenciar no mecanismo, originando diversas outras espécies e conseqüentemente 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 (DE LUCAS, 2015; KATHAWATE, 2013; BUSTAMANTE, 2012; GUIN et. al., 2011; EBELLE, et., al., 2010; BOURROUET, 2010; 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[•]). 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[•]/Q-O^{•-}, Q-OH[•]/Q-O²⁻), que posteriormente originam formas catecolatos (O-Q-O); a partir dos catecolatos podem ser formados hidroquinonas (OH-Q-OH), obtidas por mais um ganho eletrônico e protonação. Paralelamente, também podem estar ocorrendo equilíbrios cetona-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 24 e Tabela 6): 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. Fc^+/Fc , devido a sua deposição na superfície do eletrodo de trabalho. O processo irreversível localizado em $E_{pa3} = -0,387$ V vs. Fc^+/Fc é de difícil atribuição, haja visto as inúmeras reações químicas acopladas as espécies anteriormente citadas (De LUCAS, 2015; KATHAWATE, 2013; BOURROUET, 2010).

Figura 24. Voltamogramas via onda quadrada do lapachol. Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho), Ag/Ag^+ (referência) e fio platina (auxiliar).

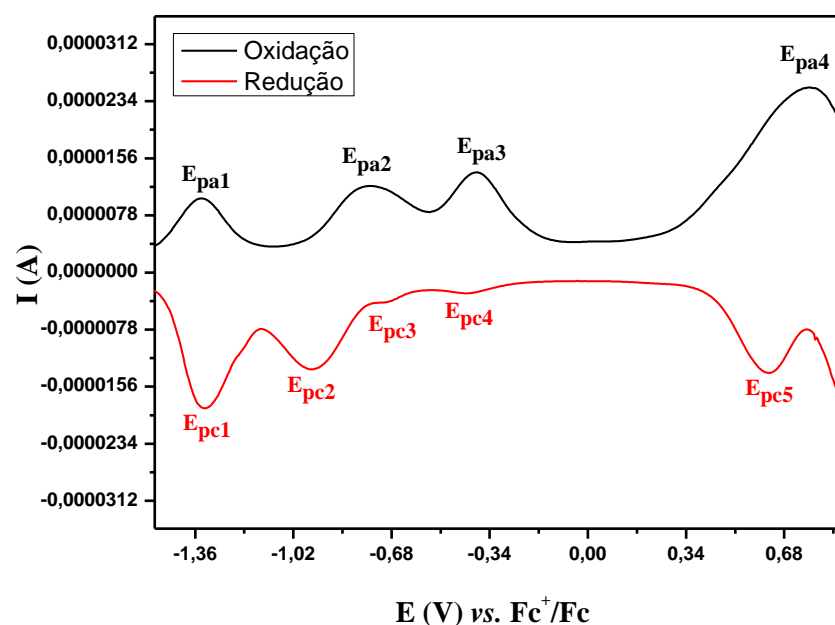


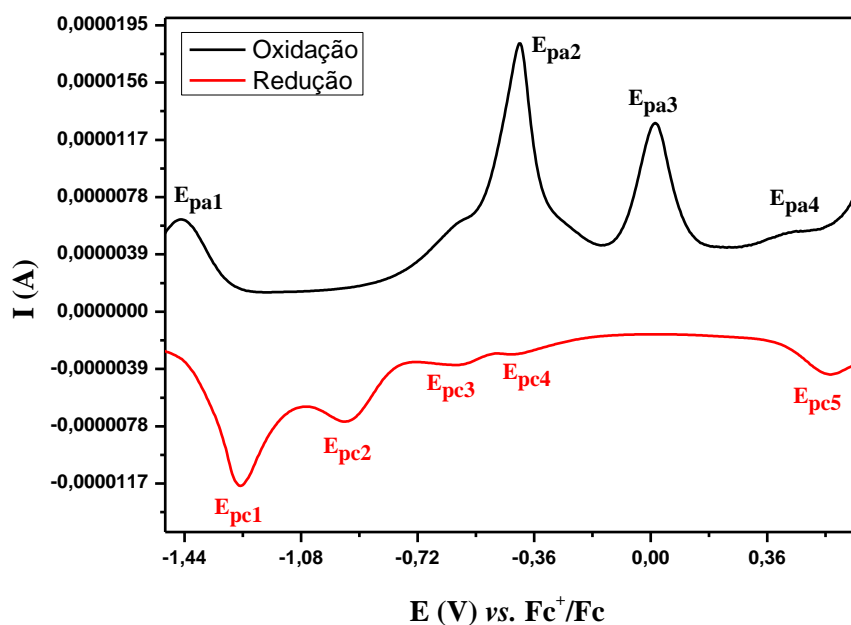
Tabela 6. Valores de Potenciais em V vs Fc^+/Fc para o lapachol e o complexo.

	Lapachol	Complexo
E_{pa1}	-1,334	-1,449
E_{pc1}	-1,326	-1,268
E_{pa2}	-0,753	-0,407
E_{pc2}	-0,947	-0,941
E_{pa3}	-0,387	0,002
E_{pc3}	-0,683	-0,592
E_{pa4}	0,767	0,454
E_{pc4}	-0,423	-0,423
E_{pc5}	0,631	0,548

Os voltamogramas do complexo (Figura 25) 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 único processo que pode ser tentativamente atribuído ao centro metálico é o localizado em $E_{pa2} = -0,407 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$, devido a sua acentuada resposta eletroquímica. Os demais processos estão relacionados ao ligante. Os processos irreversíveis de oxidação ($E_{pa1} = -1,449 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$) e de redução ($E_{pc1} = -1,268 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$) podem estar centrados no equilíbrio que envolve as espécies hidroquinonoídicas, enquanto que os demais processos são baseados na formação da semiquinona radicalar ($E_{pa4} = 0,454 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$; $E_{pc5} = 0,548 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$) e das espécies aniônicas radicalares ($E_{pc3} = -0,592 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$; $E_{pc4} = -0,423 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$).

Figura 25. Voltamogramas via onda quadrada do complexo de prata(I). Condições experimentais: DMSO (solvente), carbono vítreo (trabalho), Ag/Ag⁺ (referência) e fio platina (auxiliar).



A princípio ocorre a formação da forma catecolato ($E_{pc2} = -0,941 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$), 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-prata(I). O processo irreversível localizado em $0,02 \text{ V vs. Fc}^+/\text{Fc}$ (E_{pa3}) não pode ser convenientemente atribuído em virtude dos vários equilíbrios químicos-eletrouímicos presentes.

5.9.2. Voltametria Cíclica em Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados

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 26), observou-se dois pares de picos (E_{paI} : 0,145 e E_{pcI} : 0,118 V vs Ag/AgCl; $A_{E_{paII}}$: 0,033 e E_{pcII} : 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.

Para a caracterização do complexo obtido, foram realizados os testes eletroquímicos em meio ácido com o composto, sendo os resultados comparados com o ligante não coordenado (Figura 27). 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 26. Voltamograma cíclico do lapachol imobilizado em pasta de carbono.

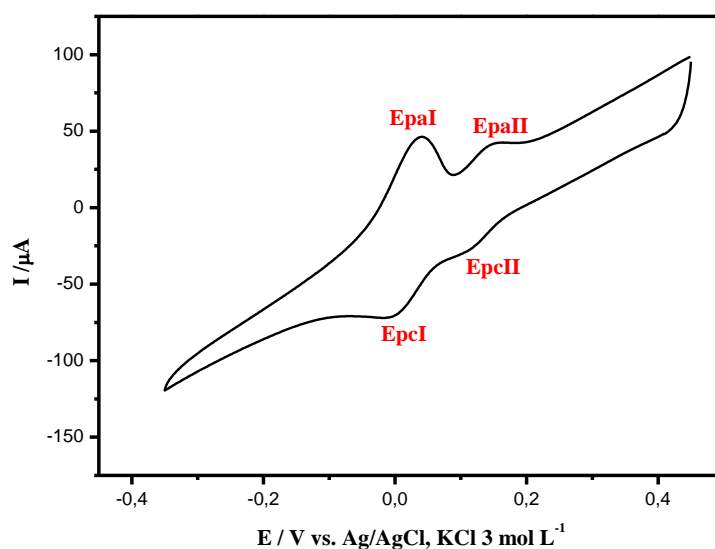
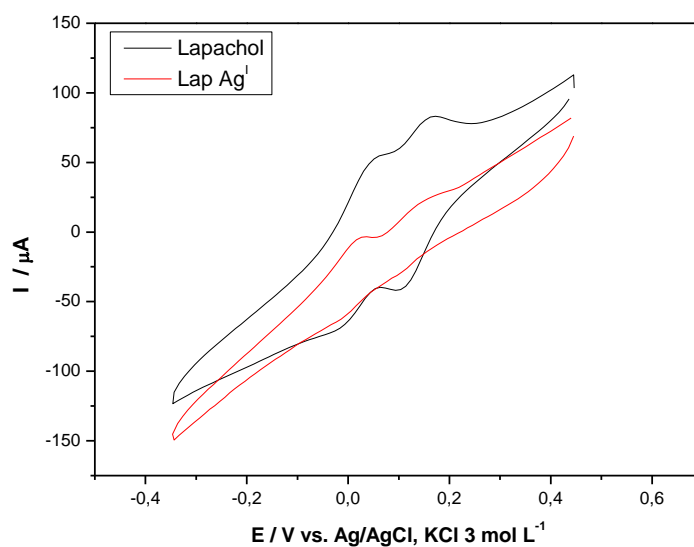


Figura 27. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos contendo lapachol (preto) e complexo (vermelho) medidos em velocidade de 1 mV s^{-1} .



5.10 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A verificação das ações biológicas antimicrobianas para o lapachol e o complexo foi realizada frente as cepas bacterianas *gram*-negativa *Escherichia coli* (ATCC SP 11229) e *gram*-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC SP 25923), em soluções de DMSO a 5% . Nessa concentração o solvente não é eficiente na inibição do desenvolvimento microbiano das cepas analisadas.

Na tabela 7 são descritos os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para o complexo e o ligante livre. Analisando-se os mesmos, verifica-se que o complexo metálico é significativamente mais ativo que o lapachol livre na inibição das cepas, principalmente, na *gram*-negativa *Escherichia coli*. Este resultado é bastante relevante, uma vez que na literatura descreve-se que o lapachol apresenta uma predominância de atividade contra certos microrganismos *gram*-positivos, porém, uma baixa atuação contra *gram*-negativos (ANTUNES, 2006; OLIVEIRA, 2001). Sugere-se que a coordenação do centro metálico ao ligante proporciona uma melhor permeabilidade na parede celular da bactéria, o que não é observado para o ligante livre.

Tabela 7. Valores ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).

<i>Composto/Cepas Bacterianas</i>	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
Lap-Ag^I	12,5	12,5	25	50
Lapachol	Não ativa	Não ativa	250	1000
AgNO₃[*]	69,5	-	69,4	-
[Ag(hnc)][*]	41,1	-	143,3	-
[Ag(hmnc)][*]	151,6	-	129,3	-
[Ag(phen)₂(hnc)][*]	44,7	-	32,1	-

^{*} Segundo CREA VEN (2005).

Embora a cepa *gram*-positiva *Staphylococcus aureus* tenha apresentado uma maior resistência ao complexo quando comparada a *gram*-negativa *Escherichia coli*, sua

concentração inibitória mínima é considerada como boa, principalmente quando se compara ao lapachol (HOLETZ et. al, 2002; DALMARCO, 2010).

Outro dado significativo está relacionado a maior efetividade do complexo quando comparado ao sal nitrato de prata(I) (CREAVEN, 2005), onde o composto de coordenação é cerca de cinco vezes mais ativo na inibição da cepa *gram*-negativa *Escherichia coli*, e duas vezes para a *gram*-positiva *Staphylococcus aureus*.

Quando se compara as atividades do complexo lapacholato- Ag^I com outros complexos da literatura (CREAVEN, 2005), também nota-se uma ação bactericida mais efetiva.

A ação dos compostos analisados (lapachol e complexo) é considerada **bactericida**, como sugerido por BERCHE e colaboradores (1988), os quais sugerem esta classificação em virtude do valor obtido a partir da razão CBM/CIM: quando a mesma é igual ou inferior a 4, o efeito de inibição é considerado bactericida e, quando superior a 4, considerado bacteriostático (SANTOS, 2014; KONATÉ, 2012).

5.11 Ensaio Antitumoral

O estudo das atividades antitumorais do lapachol e do complexo foi realizado contra dez linhagens celulares tumorais e uma não tumoral, a saber: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário) e HT29 (colon), como linhagens tumorais; e a linhagem não-tumoral humana HaCat (queratinócito) extraída da pele.

O perfil das atividades antiproliferativas nas diferentes culturas celulares, empregando-se o lapachol, o complexo e o quimioterápico dexorubicina (controle positivo), após 48 horas de tratamento, são representados pelas Figuras 28 a 30, enquanto os dados são sumarizados na Tabela 8. Nestas figuras, os gráficos correlacionam as porcentagens de crescimento com as concentrações dos compostos testados. Dentre os valores mais importantes, destacam-se o controle negativo (CN), representado pelo valor 100%, demonstrando o quanto as células que não foram expostas aos compostos cresceram

ao término do experimento; o ponto 50% (GI_{50}) aponta a concentração do composto necessária para inibição de 50% do crescimento celular; e o tempo zero (T_0), que é apresentado em 0%, indica a inibição total do crescimento.

O quimioterápico doxorrubicina (Figura 28), utilizado como controle positivo, demonstrou potência elevada e seletividade. Este padrão apresentou bom perfil citostático nas concentrações de 0,025 e 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na concentração de 0,025 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou valores de GI_{50} muito próximos para a célula MCF7 (mama), 786-0 (rim) (com valores um pouco abaixo do ponto para que ocorra a inibição de 50%) e PC-3 (próstata) (valor pouco acima da inibição de 50%). Na concentração de 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o quimioterápico apresentou excelente inibição em praticamente todas as linhagens, ocasionando a inibição total na linhagem não tumoral HaCat (queratinócito) e a morte celular nas linhagens tumorais NCI-H460 e U251. Nas concentrações de 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o padrão apresentou um perfil citocida para todas as linhagens testadas.

Tabela 8. Concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular TGI ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

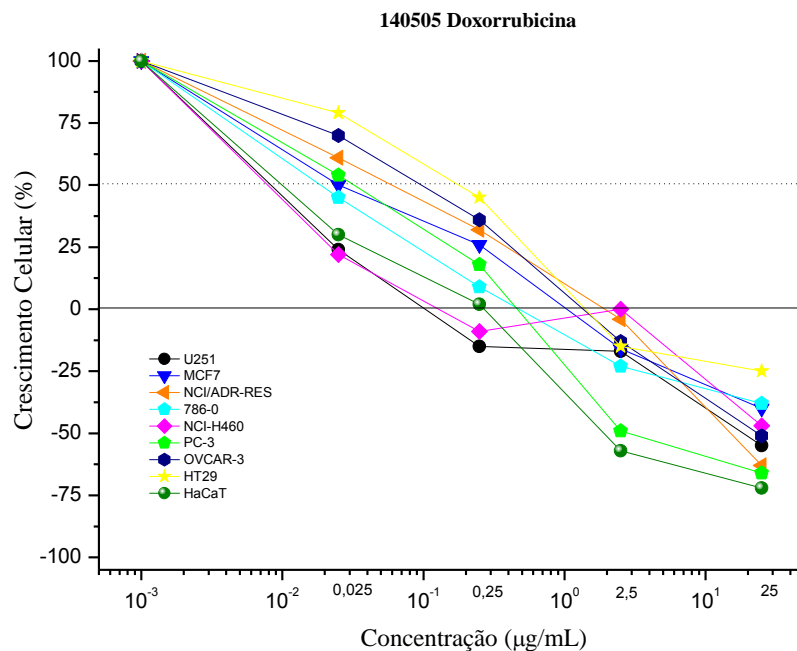
Linhagem Tumoral	Dexorrubicina	Lapachol	Lapachol Ag¹	Razão de eficácia*
U251	0,16	9,5	1,7	5x
MCF-7	1,1	32,4	3,7	9x
NCI-ADR/RES	1,2	57,3	2,4	24x
786-0	0,65	78,1	6,6	12x
NCI-H460	0,31	12,8	7,9	1,6x
PC-3	0,41	30,0	3,3	9x
OVCAR-03	1,4	22,2	3,7	6x
HT29	2,8	39,5	6,5	6x
Linhagem Não Tumoral				
HaCat	0,16	20,9	3,9	5x

Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-03 (ovário); HT29 (colon). Linhagem não-tumoral humana: HaCat (queratinócito) pele.

* Razão de Eficácia (complexo X lapachol) número de vezes maior para que ocorra 0% de crescimento TGI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

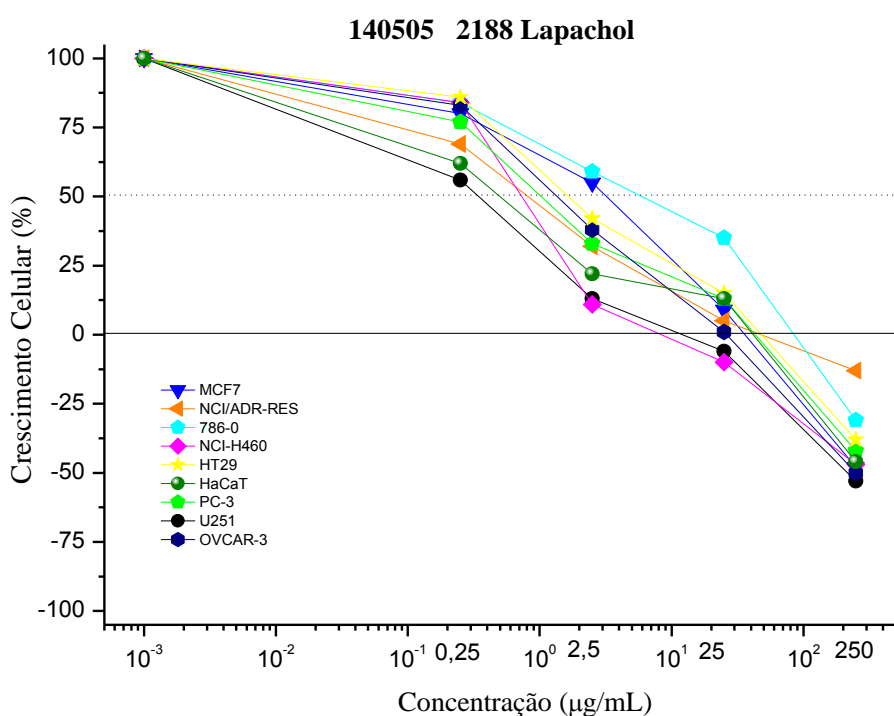
No gráfico representativo para o lapachol, exposto na Figura 29, nota-se que o ligante não coordenado apresentou boa eficiência de inibição de crescimento das linhagens. Na concentração de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, o composto demonstrou uma perfil citostático, onde todas as linhagens apresentaram crescimento celular próximos do GI_{50} . Na concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ o composto já apresentou ação citostática satisfatória, exibindo baixo crescimento celular para as linhagens analisadas; As linhagens NCI-H460 (pulmão) e U251(glioma) tiveram crescimento celular pequeno, com valores próximos de T0. Quando ocorre o aumento da concentração para $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, nota-se que a molécula bioativa apresentou boa eficiência para as linhagens 786-0 (rim), HT29 (cólon), HaCaT (célula não tumoral), MCF7 (mama) e NCI/ADR-RES (ovário resistente). Ainda nesta concentração, o lapachol impede totalmente o crescimento da linhagem celular tumoral OVCAR-3 (ovário), e causa morte celular somente em duas linhagens celulares tumorais: na U251 (glioma) e na NCI-H460 (pulmão).

Figura 28. Perfil das atividades antiproliferativas do padrão doxorubicina.



Conforme verificado na Figura 30, os resultados das atividades antiproliferativas do complexo foram significativamente mais eficientes que os encontrados para a naftoquinona livre (Tabela 8). Na concentração de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, o composto apresenta boa atuação citostática: a linhagem tumoral NCI-ADR-RES (ovário resistente) expressa uma inibição de crescimento de 50%, enquanto a linhagem U251 (glioma) exibe crescimento celular abaixo desse valor. Observa-se que o desenvolvimento celular para outras linhagens são próximos a GI_{50} , demonstrando que, mesmo em baixas concentrações, o complexo apresenta boa eficiência de inibição do crescimento celular.

Figura 29. Perfil das atividades antiproliferativas do lapachol.

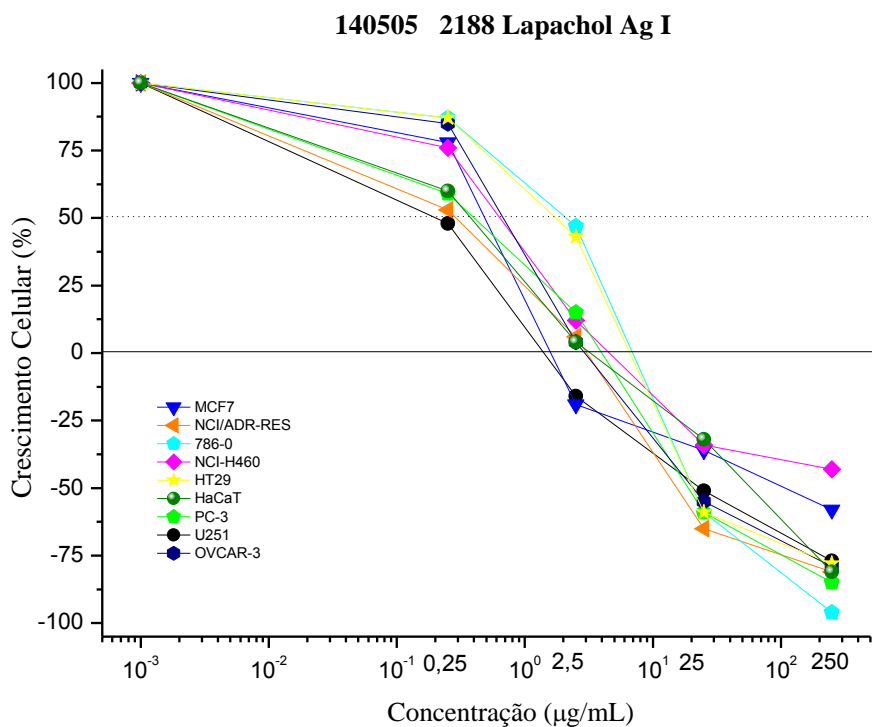


O complexo de Ag^I apresentou resultados satisfatórios também para a concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que a maior parte das linhagens apresentaram baixo crescimento celular. As linhagens NCI/ADR-RES e HaCaT exibiram crescimento celular praticamente nulo. Ainda nesta concentração nota-se morte celular de duas linhagens tumorais a U251 e OVCAR-3. Já em altas concentrações, 25 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, o complexo demonstra morte

celular para todas as linhagens. Vale salientar que na maior concentração ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) todos os compostos mostram efeito citocida contra todas as linhagens.

Como já observado nos resultados anteriores, o complexo apresenta uma melhor ação citostática quando comparado ao lapachol, necessitando de menores concentrações para que ocorra total inibição das linhagens analisadas. Em especial, no caso da linhagem NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), o complexo apresentou eficácia (em termos de concentração) cerca de 24 vezes menor que da naftoquinona (Tabela 8).

Figura 30. Perfil das atividades antiproliferativas do complexo.



6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam a coordenação da quinona natural lapachol ao íon metálico Ag^{I} . As distinções quanto a solubilidade e o ponto de fusão foram indicativos prévios do processo de coordenação, sendo que posteriormente isto foi reforçado pela interpretação dos dados obtidos via análise elementar, análise térmica e espectroscopia na região do infravermelho.

As informações obtidas sugerem a formação de um complexo mononuclear, obtido em estequiometria 1:1 ligante/metálico, com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{Ag}$ (massa molar = $349,13 \text{ g mol}^{-1}$), sendo que a coordenação possivelmente ocorreu de forma bidentada mediante oxigênios carbonílico (C1) e fenólico; não há evidências da presença de moléculas de solvente ou água, o que sugere uma geometria linear bastante distorcida.

A espectroscopia de absorção no UV-Vis mostra claramente a influência do processo de coordenação com o aparecimento de uma banda com máximo de absorção em 510 nm, a qual pode ser atribuída a transferências de carga do tipo TCML (fenolato \rightarrow prata^I); embora não ocorram deslocamentos das bandas atribuídas ao lapachol (bandas intraligantes do tipo transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$), as mesmas sofrem aumento de intensidade (efeito hiperacrômico) após a complexação, o que é comprovado pela determinação das absorvidades molares. Os espectros de emissão indicam que a intensidade de luminescência apresentada pelo complexo foi superior a do ligante livre, ao mesmo tempo que se mostram concordantes quanto ao perfil encontrado na absorção.

As técnicas eletroanalíticas, além de demonstrar a pureza do lapachol, mostram que o mesmo comportou-se como um ácido fraco; 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 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 excelente potencialização das atividades após a coordenação: nos testes antimicrobianos o complexo foi mais ativo que o lapachol e o sal

metálico, mostrando-se, inclusive, ativo frente a bactéria *gram*-negativa *Escherichia coli*; os ensaios antitumorais *in vitro* demonstraram o melhor desempenho do complexo sobre praticamente todas as linhagens de células, quando comparado ao ligante e ao padrão doxorrubicina, o que abre boas perspectivas quanto ao seu emprego como possível fármaco.

Na verdade, uma vez que o composto de coordenação é dotado de potencial antitumoral perante diversas linhagens de células cancerígenas e apresenta uma potencialização da fluorescência da quinona natural, o mesmo pode tornar-se um futuro medicamento antineoplásico com uma propriedade adicional relevante, ser um sensor químico fluorescente, o que pode servir como um biomarcador eficiente.

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 (Afroormosia) 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.

ALMEIDA, E. R. SILVA FILHO, A.A.; SANTOS, E.R.; LOPES, C.A. Antiinflammatory action of Lapachol. **Journal Ethnopharmacol.**, Vol. 29, p. 239-241, 1990.

ANDRADE-NETO, V.F.; DA SILVA FILHO, J.F.; DA SILVA, M.J.; PINTO, M.C.F.R.; PINTO, A. V., ZALIS, M. G., CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. V. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β - lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic. Medical. Chemistry. Lett.**, Vol.14, p. 1145–1149, 2004.

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, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: Segurança e Eficácia na terapêutica. **Rev. Brasileira. Farmacogn.** Vol. 12, p. 57-59, 2002.

ATKINS, P. Inorganic chemistry. 5th ed. **Oxford: Oxford University Press**, 2010.

ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. **3. ed. São Paulo: Bookman, 2005.**

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, D.; SOCHOR, J.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; HUBALEK, J.; KIZEK, R. Voltammetric Characterization of Lawsone-Copper(II) Ternary Complexes and Their Interactions with ds Dna. *International Journal Of Electrochemical Science*, Czech Republic (European Union), Vol. 7, p. 7349 – 7366, 2012.

BACCAN, N. *Química Analítica Quantitativa Elementar*, Edgard Blucher, Campinas, 1979.

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.

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

BERREAU, L. M.; GRUBEL, K.; RUDZKA, K. ARIF, A. M. KLOTZ, K. L. HALFEN, J. A. Synthesis, Characterization, and Ligand Exchange Reactivity of a Series of First Row Divalent Metal 3-Hydroxyflavonolate Complexes. *Inorganic Chemistry*, Logan – Utah, Vol. 49, n.22, p. 82-96, 2010.

BOLTON, J. L., TRUSH, M. A., PENNING, T. M., DRYHURST, G., MONKS, T. J. Role of Quinones in Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**. Vol. 13, n. 3, p. 135, 2000.

BORGIO, 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**, 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.

BRANDT, D.; PARK, B.; HOANG, M.; JACOB, H. T. Argyria secondary to ingestion of homemade silver solution. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Vol. 53, p. S105-S107, 2005.

BUDZIAK, C. R., MAIA, C. M. B. F., MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**. Vol. 27, n. 3, p. 399, 2004.

BUKHARI, S. B. MEMON, S. MAHROOF-TAHIR, M. BHANGER, M. I. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Pakistan, Vol. 71, p. 1901 – 1906, 2009.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade Como Fonte De Medicamentos. **Ciência e Cultura**. Vol. 55 n. 3 São Paulo, 2003.

CAMARA C, A.; SILVA, T. M. S.; DA-SILVA T. G.; MARTINS. R. M.; BARBOSA, T. P.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. **An. of the Brazilian Academy of Sciences** Vol. 80, n. 2, p. 329-334, 2008.

CARUSO, F.; MARTINEZ, M. A.; ROSSI, M.; GOLDBERG, A.; VILLALBA, M. E. C.; AYMÓNINO, 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.

CASAGRANDE, J. J. C.; SAVI, G. D.; GENEROSO, J S; POSSATO, J. C.; MICHELON, C. M.; ,RONCONI, J. V.; MERLINI,. Efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata, cobre, ouro e níquel contra Streptococcus mutans. **Journal Of Dental Research** Indian P.8, 2010.

CASTILLO-BLUM, S. E.; BARBA-BEHRENS, N. Coordination Chemistry of Some Biologically Active Ligands. **Coordination Chemistry Review**, México, Vol. 196, p. 3-30, 2000.

CASTRO, F. A. V., MARIANI, D., PANEK, A. D., ELEUTHERIO, E. C. A., PEREIRA, D. P. Cytotoxicity Mechanism of Two Naphthoquinones (Menadione and Plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS ONE**. Vol. 3, n. 12., p. 1, 2008.

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.

CHEN J, HUANG Y W, LIU G, AFRASIABI Z, SINN E, PADHYE S, MA Y. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. **Toxicol Appl Pharmacol**; (197): p. 40-48, 2004.

CREAVEN, B. S.; EGAN, D. A.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M., MAHON, M.; NOBLE, A.; THATI, B.; WALSH, M. Synthesis and antimicrobial activity of copper(II) and silver(I) complexes of hydroxynitrocoumarins: X-ray crystal structures of [Cu(hnc)2(H2O)2] · 2H2O and [Ag(hnc)] (hncH = 4-hydroxy-3-nitro-2H-chromen-2-one). **Polyhedron** Vol. 24 p.949–957, 2005.

DA SILVA, A. R. **Obtenção de Derivados do Lapachol e de Compostos Relacionados**. 2009. 281p. Tese Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Ciências Exatas, 2009.

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

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

DE 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, 2015.

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) Complexes of Lapachol: Synthesis, Crystal Structure and Cytotoxic Activity. **Molecules**, Belo Horizonte, Vol.16, p. 10314-10323, 2011.

DRAKE, P. L.; HAZELWOOD, K. J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. **The Annals of Occupational Hygiene**, Vol. 49, p. 575-585, 2005.

EBELLE, C. T.; NASSI, A.; NJANJA, E.; NGAMENI, E. Characterization of Lapachol in Artificial Organic-Film Membrane: Application for the Trans-Membrane Transport of Mg²⁺. **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.

ESTEVES-SOUZA, A.; FIGUEIREDO, D. V.; ESTEVES, A.; CÂMARA, C. A.; VARGAS, M.D.; PINTO, A. C.; ECHEVARRIA, A.; Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Brazilian Journal of Med. Biol. Res.**, Vol. 40, p. 1399-1402, 2007.

EYONG, K.O.; KUMAR, P. S.; KUETE, V.; FOLEFOG, G. N., NKENGFAK, E. A.; BASKARAN, S.; Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorganic. Med. Chemistry. Lett.**, Vol.18, p.5387-5390, 2008.

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. p.1-6, 2012.

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.

FARIAS, M.. **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 1998.

FARRELL, N. Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. **Comprehensive Coordination Chemistry II**, Vol. 9, p. 809-840, 2004.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Vol. 52, p. 662-668, 2000.

FONSECA, S.G.; BRAGA, R.M.C.; SANTANA, D.P. Lapachol-química farmacologia e métodos de dosagem. **Revista Brasileira de Farmacologia**, Vol.84(I), p.9-16, 2003.

FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F.; Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**. Vol. 7, 2006.

FORMICA, M.; FUSI, V.; GIORGI, L.; MICHELONI, M.; New fluorescent chemosensors for metal ions in solution **Coordination Chemistry Reviews**. Vol. 256 p. 170– 192, 2012.

GAGNÉ, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 2854-2855, 1980.

GALM, U.; HAGER, M. H., LANEN, S. G.V.; JU, J.; THORSON, J, S.; SHEN, B.; Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes and mitpmycin. **Chemical Reviews**, Vol, 105, p. 739-758, 2005.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S; SANTANA, A. L. B. D. J. Bioactive Flavonoids and Triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **Journal Brazilian Chemistry Society**, Vol. 17, No. 7, 1223-1228, 2006.

GIRALDI, M.; HANASAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão de Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Vol. 24, n. 2, p. 395- 406, 2010.

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.

GOULART, M.O.F. et al. Trypanomicidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.**, Vol 7, n. 15, p. 2043-2048, 1997.

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.

KLEIN, P.S.; MELTON, D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development, Proc. Natl. **Academy of Science USA**. Vol. 93 p.8455-8459, 1996.

HADRUP, N.; LAM, H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Vol. 68, p. 1-7, 2014.

HARADA, T. N. 2009. **Correlação entre os Ensaios de Citotoxicidade em Artemia Salina Leach e Atividade Antineoplásica sobre Linhagens de Células Tumorais para Algumas Classes de Produtos Naturais**. p. 92. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campo Grande 2009.

HARADA, Y.; WATANABE, S.; SUZUKI, T.; ICHIMURA, T. Photochemical reaction dynamics of 9,10-phenanthrenequinone and 1,2-naphthoquinone with hydrogen donors in solution. **Journal Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 179, 161. 2005.

HOFFMANN, S. Silver sulfadiazine: an antibacterial agent for topical use in burns. **Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery.**, Vol.18 p119-126, 1984.

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.

HOOKE S. C., The constitution of lapachol and its derivatives. Part III. The structure of the amylene chain, **Journal Chemistry Society**, Vol.69, p. 1355-1381, 1896.

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.

HUGO, W. IN: RUSSELL, A., HUGO, W., AYLIFFE, G., eds. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. **Blackwell Scientific** Vol.2, p:3-6 , 1992.

HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity. *New York: HarperCollins College Publishers*, 4th ed. 1993.

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

JUNG, W. K.; KOO, H. C.; KIM, K. W.; SHIN, S.; KIM, S. H.; PARK, Y. H. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 74, p. 2171-2178, 2008.

KATHAWATE, L.; SHINDE, Y.; YADAV, R.; KASABE, U.; NIKALJE, M.; GAWALI, 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.

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.

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 β - lactamase Producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*:

Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) Determination. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. p. 11-18, 2012.

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

KUMAGAI Y, TSURUTANI Y, SHINYASHIKI M; Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environ Toxicol Pharmacol**, Vol. 3 p.245-250, 1997.

LANSDOWN, A. B. G. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Current Problems in Dermatology**, Vol. 33, p. 17-34, 2006.

LANSDOWN, A. Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions. **Critical Reviews in Toxicology**. Vol. 25(5) p.397-462, 1995.

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

LEE, J. D. Química Inorgânica não tão Concisa, 5a ed., **Edgar Blucher**, São Paulo, 1999.

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; LIMA, C.G.; MAIA, M.H.D. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores - Comunicação XX: atividade antimicrobiana de alguns derivados do lapachol em comparação com a xiloidona, nova orto-naftoquinona natural isolada de extratos do cerne do Pau d'Arco rôxo, *Tabebuia avellaneda* Lor. Ex Griseb. **Revista do Instituto de Antibióticos**. Recife/UFPE. 4 (1/2): 03 – 17. Dez, 1962

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; MACHADO, M.P. SILVA, E & PINTO, G.P. Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do lapachol. **Separata dos Anais da Sociedade de Biologia** de Pernambuco. Vol. 14 p.129 – 135. 1956.

LIPPARD, S. J., BERG, J. M., Principles of bioinorganic chemistry. Mill Valley: **University Science Books**, p.1-20, 1994.

LIRA, A.M.; ARAUJO, A.A.S.; BASILIO, I.D.J.; SANTOS, B.L.L.; SANTANA, D.P.; MACEDO, R.O. Compatibility studies of lapachol with pharmaceutical excipients for the development of topical formulations. **Thermochemica Acta**. Vol.1-6, p.457, 2007.

LOPES, W. A., DE ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Revista Química Nova**. Vol. 19,n 5, p. 497, 1996.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F., Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Revista Química Nova**. Vol. 25, n 3, p.429-438, 2002.

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.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Vol. 12, p. 147-179, 1999.

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, T. J., HANZLIK, R. P., COHEN, G. M., ROSS, D. GRAHAM, D. G. Contemporary Issues in Toxicology. Quinone Chemistry and Toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Vol. 112, p. 2, 1992.

MORRISON, R.K.; BROWN, D.E.; OLESON, J.J.; COONEY, D.A. Oral toxicology studies with Lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Vol. 17: p.1- 11, 1970.

MOYER, C.A. BRENTANO, L. GRAVENS, D.L. MARGRAF, H.W. MONAFO, W.W. Treatment of large human burns with 0.5 % silver nitrate solution, **Archives of Surgery**. Vol. 90 p.812- 867 1965.

NETTO, A. D. P., MOREIRA, J. C., DIAS, A. E. X. O., ARBILLA, G., FERREIRA, L. F. V., OLIVEIRA, A. S., BAREK, J. Avaliação Da Contaminação Humana Por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (Hpas) E Seus Derivados Nitrados (Nhpas): Uma Revisão Metodológica. **Revista Química Nova**, Vol. 23,n 6, 2000.

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– 63, 2012.

OLESON, R.K., MORRISON, D.E., BROWN, E.K., TIMMENS, AND TASSINI, R.A Lapachol toxicol. toxicologic and pharmacologic studies with lapachol. **Chemical Abstracts**. Vol. 68:no.7, p.28403 ,1968.

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**. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal de São Carlos, 2013.

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, T. D.; **Complexo lapacholato-V(III): análise espectroscópica e eletroquímica**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, 2012.

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, Vol. 19, p. 175-183, 2008.

PAGOTTO, T. C. S.; SOUZA, P. R. **Biodiversidade do complexo Aporé-Sucuriú : subsídios à conservação e ao manejo do cerrado**. Campo Grande: UFMS, p. 18-30, 2006.

PARRILHA, G. L. 2012. **Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividade farmacológica e avaliação de relações estrutura-atividade**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte 2012.

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.

PATERNI, E. Ricerche sull'acido lapacico. **Guzzetta Chimica Ztaliana** Vol.12, p.337-392, 1882.

PERCIVAL SL, BOWLER PG, DOLMAN J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. **Journal International Wound**, Vol.4 p.186–191, 2007.

PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, Vol. 60, p. 1-7, 2005.

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.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C.; **Biologia química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais**. **Revista Química Nova**, Vol. 30, No. 6, p.1446-1455, 2007.

RAVEN, P. H. ; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. **Guanabara Koogan**, p. 31-36, 2001.

RODRIGUES, M. T. A biodiversidade dos cerrados: conhecimento atual e perspectivas, com uma hipótese sobre o papel das matas de galeria na troca faunística durante o ciclo climático. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Orgs.) *Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação*. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**, p.237-246, 2005.

ROSA, M. A. **Estudos Envolvendo a Modificação e a Interação do Lapachol com Compostos de Metais de Transição**. p. 95. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, Campinas, 2000.

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.

SADLER, P. J.; GUO, Z.; Metals in medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, Vo.38, p. 1512-1531, 1999.

SAIFY, Z. S.; MUSHTAQ, N.; NOO, F.; Role of quinines moiety as antitumour agents: a review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, Vol. 12(2), p.21-31, July 1999.

SALMON, C, L.; BUISINE, E.; YARDLEY, V.; KOHLER, S.; DEBREU, M. A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DAVIOUD, C. E. 2-and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry** Vol.44, p.548, 2001.

SALUSTIANO EJS, NETTO CD, FERNANDES RF. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational New Drugs** Vol.28 p.139–144, 2010.

SANTANA, D.P.; FONSECA, S.G.C.; BEDOR, D.C.G.; LEAL, L.B.; SILVA, J.A. Aplicação termoanalítica no desenvolvimento e caracterização de micropartículas de PLGA contendo lapachol **Revista de Ciência Farmaceutica Básica e Aplicada**, Vol. 29, n.3, p. 261-266, 2008.

SEGURA, D. F, **Síntese, caracterização e estudo de atividade biológica de complexos de prata(I) contendo ligantes baseados na 1,10-fenantrolina e tiouréia**. Tese de Doutorado, UNESP Araraquara, 2014.

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.

SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the south american cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, v. 52, n. 3, p. 225-233, 2002.

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

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 6. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2000.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P. Pesquisa e produção brasileira a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia** Vol. 12, n 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. ; SCHENKEL, E. P. ; GOSSMAN, G. ; MELLO, J. C. P. de. ; MENTZ, L. A. ; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 657-683, 2007.

SIMÕES, V. N.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; DE-OLIVEIRA, T. D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, S. J.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A. A.; DOS-ANJOS, A.; Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Revista Química Nova**, Vol.36 n.4, 2013.

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.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos S. A. v. 1, 645 p, 2001.

SOUZA, R.F.V. GIOVANI, W.F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. **Spectrochimica Acta Part A**, Ribeirão Preto - SP, Vol.61, p.1985-1990, 2005.

DE SOUZA, G. D.; RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Elemental Educacion química**. Vol.24(1), p14-16, 2013.

TAN, J.; WANG, B.; ZHU, L.; HE, X. Meletin with cell apoptosis inductive effect and metallic complex of glycoside compounds thereof, **Patent number: CN101220014-A**, 16 Jul 2008.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C., Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. **Dalton Transactions** Vol 6, p. 761-764, 2006.

TUKAJ, Z., AKSMANN, A. Toxic effects of anthraquinone and phenanthrenequinone upon *Scenedesmus* strains (green algae) at low and elevated concentration of CO₂. **Chemosphere**. Vol. 66. p. 480, 2007.

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

VASCONCELLOS, P. DE C., ARTAXO, P. E., CICCIONI, P., CECINATO, A., BRANCALEONI, E., E FRATTONI, M. Determinação Dos Hidrocarbonetos Saturados E Policíclicos Aromáticos Presentes No Material Particulado Da Atmosfera Amazônica. **Revista Química Nova**. Vol. 21, n.4, 1998.

VERMA, R. P. Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones: A QSAR Study. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**., Vol. 6, p. 489-499, 2006.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. **Perspectives on new crops and new uses**, p. 152-159, 1999.

WANG, L.; QIN, W.; LIU, W. Two highly sensitive Schiff-base fluorescent indicators for the detection of Zn²⁺. **Analytical Methods**, Vol. 6, p.1167–1173, 2014.

WEI, P.; ZHANG, X.; TU, S.; YAN, S.; YING, H.; OUYANG, P. New potential inhibitors of DNA topoisomerases. Part II: design and synthesis of α -lapachona derivatives under microwave irradiation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Vol 19, p. 828-830, 2009.

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.

WOLKEMBERG, S.E. & BOGER, D.L. Mechanisms of in situ activation for DNA-targeting antitumor agents. **Chemical Reviews**., Vol. 102, p. 2477-2495, 2005.