



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO



“Modificações estruturais em naftoquinonas de origem natural”

Vitor Tassara de Moraes

Ribeirão Preto - SP
2022



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO



“Modificações estruturais em naftoquinonas de origem natural”

Versão original

Vitor Tassara de Moraes

Trabalho aprovado pela Comissão
de Graduação da FCFRP/USP
da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki
Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Ribeirão Preto - SP
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Folha de Aprovação

Vitor Tassara de Moraes

“Modificações estruturais em naftoquinonas de origem natural”

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia-Bioquímica

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha mãe, Raquel, que sempre me incentivou e estimulou a buscar meu caminho e ser feliz.

Ao meu pai, Luiz Alberto, o qual me ensinou a amar o mundo da ciência e no qual me espelho desde sempre.

À minha irmã, Isabella, que me acompanha desde o início desta jornada.

À minha namorada, Carolina, que sempre me apoiou e amparou a qualquer momento.

Ao meu orientador, Professor Doutor Giuliano Clososki, que me acolheu para fazer parte do mundo científico e me guiou durante a trajetória.

Aos cientistas brasileiros, que persistem por tentar tornar do Brasil um país cientificamente desenvolvido.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Giuliano Clososki, pela confiança e orientação durante o processo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por ter me proporcionado o período mais especial da minha vida, e ter sido casa para o meu início na pesquisa científica.

Aos Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos por terem me acolhido, especialmente o aluno de doutorado Franco Jazon Caires pelos conselhos e discussões sobre os trabalhos.

Ao Prof. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, por ter disponibilizado o laboratório para o trabalho, bem como pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –CNPq por ter fomentado esta pesquisa via bolsa de iniciação científica (PIBIC)

À toda a minha família, amigos e namorada que estiveram comigo durante a caminhada, por todo incentivo e amor dado.

Sumário

Abstract	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Esquemas	xii
Lista de Figuras em Anexo	xiii
Lista de Abreviações	xv
1. Introdução	16
1.1. Produtos Naturais	16
1.2. Importância de naftoquinonas e seus derivados	17
2. Objetivos	21
2.1. Objetivos específicos	22
3. Materiais	22
3.1. Equipamentos	22
3.2. Reagentes, Solventes e outros	23
4. Métodos	24
4.1. Isolamento e purificação do produto de interesse	24
4.2. Condições cromatográficas	24
4.3. Modificações estruturais	25
4.3.1. Reação com isoniazida	25
4.3.2. Reação com fenilhidrazina	26
4.3.3. Reação com o-fenilenodiamina	27
5. Resultados e discussão	28
5.1. Isolamento e purificação do produto de interesse	28
5.2. Modificações estruturais	33
5.2.1. Reação com isoniazida	33
5.2.2. Reação com fenilhidrazina	40
5.2.3. Reação com o-fenilenodiamina	52
5.3. Caracterização estrutural	54
5.3.1. Material de partida 3,5,8-TMON	54
5.3.2. Reação com Isoniazida	57
5.3.3. Reação com a fenilhidrazina	60
6. Conclusão e considerações finais	69
7. Anexo	70
8. Referências	89

Resumo

O uso de substâncias de origem natural remonta momentos antepassados da história humana, sendo de grande importância na terapêutica. Os produtos naturais que possuem atividade farmacológica são metabólitos secundários. Dentre as classes de produtos naturais de importância na terapêutica está a classe das naftoquinonas, a qual apresenta diversos exemplos de importância que possuem ampla atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e antineoplásica. Por conta dessa atividade, as naftoquinonas são alvo de modificações estruturais na tentativa de criar compostos bioativos com potencial de se tornarem fármacos. Com isso, este trabalho buscou isolar uma naftoquinona, o 3,5,8-TMON, e posteriormente realizou modificações estruturais, para avaliar a reatividade desta molécula e sua viabilidade como ponto de partida para a produção de fármacos. Para isso, foram realizados processos extractivos para se obter material de partida, bem como reações de adição nucleofílica a carbonila, a fim de verificar a reatividade da molécula frente, à isoniazida, fenilhidrazina e *o*-fenilenodiamina. Dentre os resultados obtidos, pode-se observar que o método de isolamento do produto de interesse se mostrou eficiente, o que permite o acesso a grandes quantidades de material de partida. Também se observou que a reação de 3,5,8-TMON com isoniazida e fenilhidrazina produziu produtos com a massa do produto de interesse. Na primeira reação, foi possível purificar o produto final apenas com lavagem utilizando acetona, resultando em um produto insolúvel que, quando analisado, possibilitou a proposição de um produto inédito. Na segunda reação, observou-se que ocorreu a formação de diversos produtos com massas iguais, sendo elas de 418 u e 420 u. Estes produtos foram purificados por HPLC preparativo e, quando analisados, dois deles tiveram suas estruturas propostas como produtos inéditos, enquanto outro ainda necessita de mais análises para conclusão. A reação utilizando fenilhidrazina não formou produtos de interesse, acredita-se que por conta da baixa reatividade do anel naftoquinona nas condições utilizadas.

Palavras-chave: naftoquinonas; modificação estrutural; nucleófilo.

Abstract

The use of natural substances dates back to the beginning of human history, being of great importance in therapy those days. Natural products that have pharmacological activity are mostly secondary metabolites. Among the classes of natural products of importance in therapy is the class of naphthoquinones, which presents several examples of molecules that have broad antimicrobial, anti-inflammatory, healing and antineoplastic activity. As a consequence of this activity, naphthoquinones are the target of structural modifications in an attempt to create bioactive compounds with potential to become drugs. Thus, this work sought to isolate a naphthoquinone, 3,5,8-TMON, and later carried out structural modifications to evaluate the reactivity of this molecule and its viability as a starting point for the production of drugs. Aiming this, extractive processes were carried out to obtain starting material, as well as nucleophilic addition reactions to carbonyl, in order to verify the reactivity of the molecule in reactions with isoniazid, phenylhydrazine and o-phenylenediamine. Within the results obtained, it can be pointed out that the method of isolation of the product of interest proved to be efficient, which allows access to large amounts of starting material. It was also observed that the reaction of 3,5,8-TMON with isoniazid and phenylhydrazine generated products with the mass of the product of interest. In the first reaction, it was possible to purify the final product only by washing using acetone, resulting in an insoluble product that, when analyzed, made it possible to propose an unprecedented product. In the second reaction, it was observed the formation of several products with equal masses, with 418 u and 420 u. These products were purified by preparative HPLC and, when analyzed, two of them had their structures proposed as unpublished products, while another one still needs further analysis for conclusion. The reaction using o-phenylenediamine did not form products of interest, due to the weak reactivity of the naphthoquinone ring under the conditions used.

Keywords: naphtoquinones; structural modification; nucleophile.

Lista de Figuras

Figura 1. Derivados naturais de naftoquinonas	18
Figura 2. Ciclo Redox das naftoquinonas. (Fp: Flavoenzimas) (FpDT: DT-diaforase).....	19
Figura 3. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido do extrato da fermentação do fungo <i>Cordyceps</i> sp.	28
Figura 4. Espectros UV e de massas do produto da fermentação do tempo 2,61 min	30
Figura 5. Espectros UV e de massas do produto da fermentação do tempo 6,11 min.	30
Figura 6. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido após reação de desidratação do extrato	32
Figura 7. Cromatograma DAD (varredura 240-700 nm) obtido da reação de 3,5,8-TMON com Isoniazida, sob refluxo em AcOH	34
Figura 8. Espectros UV e de massas do pico cromatográfico (ESI+ e ESI-), no tempo de retenção 3,86 min.....	35
Figura 9. Cromatogramas DAD (240-700 nm) obtidos de 30 em 30 minutos da reação 3,5,8 TMON e isoniazida, sob refluxo em ácido acético. T1-T6 de baixo para cima, sendo T1= 30 min	36
Figura 10. Cromatogramas DAD (240-700 nm) obtidos da reação de 3,5,8-TMON com isoniazida, em micro-ondas com Metanol e TFA	37
Figura 11. Espectros UV e massas do produto reacional no tempo de retenção 5,34	38
Figura 12. Cromatograma (detector de massas) do produto reacional após purificação.....	39
Figura 13. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido após 24 horas da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina em temperatura ambiente	41
Figura 14. Espectros UV e massas do produto obtido após 24 horas de reação	42
Figura 15. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido após o aquecimento do meio reacional da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina	43
Figura 16. Espectros UV e massas do produto formado após o aquecimento	44
Figura 17. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido após um longo período de tempo do término da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina na primeira condição.	45
Figura 18. Espectros UV e massas do produto no tempo de retenção de 8,16 min.	46
Figura 19. Espectros UV e massas do produto no tempo de retenção de 7,14 min.	46
Figura 20. Cromatograma DAD (240-700 nm) da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina em AcOH sem aquecimento.	47
Figura 21. Espectros UV e massas do produto no tempo de retenção de 6,44 min.	48
Figura 22. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina em AcOH e refluxo em bancada	49
Figura 23. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina em AcOH e aquecimento em micro-ondas	49
Figura 24. Superior: Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON antes da extração líquido-líquido/ Inferior: Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON depois da extração líquido-líquido.....	51
Figura 25. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON e o-fenilenodiamina	53

Figura 26. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON e o-fenilenodiamina com aquecimento por micro-ondas.....	54
Figura 27. Espectro de fragmentação de 3,5,8-TMON.....	55
Figura 28. Proposta de fragmentação do íon de M/z 273 proveniente da molécula protonada.....	55
Figura 29. Proposta de fragmentação do íon de M/z 249 proveniente da molécula protonada	56
Figura 30. Proposta de fragmentação do íon M/z 289 proveniente da molécula protonada	56
Figura 31. Estrutura do material de partida. 3,5,8-TMON.....	56
Figura 32. Espectro de fragmentação do produto da reação entre 3,5,9-TMON e ISNZ	58
Figura 33. Fragmentos propostos para a reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ	59
Figura 34. Cromatograma UV (371 - 480 nm) obtido do método preparativo para a purificação das reações entre 3,5,8-TMON com fenilhidrazina	60
Figura 35. Cromatograma DAD (240-700 nm) de cada um dos 4 picos – De baixo para cima: pico 1; pico 2; pico 3 e pico 4.....	61
Figura 36. Espectro de fragmentação do Produto 3	62
Figura 37. Estrutura proposta para a molécula P3	63
Figura 38. Espectro de fragmentação do Produto 2	66
Figura 39. Estrutura proposta para o Produto 2.....	67

Lista de Esquemas

Esquema 1	20
Esquema 2	20
Esquema 3	21
Esquema 4	21
Esquema 5	22
Esquema 6: Reação de desidratação e eliminação que leva à transformação de Erythrostominona em 3,5,8-TMON.....	31
Esquema 7: Esquema geral da reação proposta.....	33
Esquema 8. Possíveis reações de 3,5,8-TMON com fenilhidrazina.....	40
Esquema 9	52
Esquema 10. Proposta de fragmentação do íon $m/z = 202$ proveniente da molécula protonada.....	59
Esquema 11. Proposta de fragmentação do íon $m/z = 328$ proveniente da molécula protonada.....	59
Esquema 12. Proposta de fragmentação do íon $m/z = 171$ proveniente da molécula protonada.....	62
Esquema 13. Mecanismo proposto para a formação de P3.....	65
Esquema 14. Proposta de fragmentação do íon $m/z = 183$ proveniente da molécula protonada.....	66

Lista de Figuras em Anexo

Figura A 1. Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. A molécula possui fórmula molecular C17H14O7 correspondendo a massa exata calculada de 330,0740 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 3,9385 ppm comparado com o observado no espectro	70
Figura A 2. Espectro de RMN de 1H para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 400 MHz.....	71
Figura A 3. Espectro de RMN 13C obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 100 MHz.....	72
Figura A 4. Espectro de RMN DEPT obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 100 MHz.....	72
Figura A 5. Mapa de contornos 1H - 1H COSY, obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6 solvente, 400 MHz	73
Figura A 6. Mapa de contornos HMQC obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 400 MHz.	73
Figura A 7. Mapa de contornos HMBC obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 500 MHz.....	74
Figura A 8. Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. O produto da reação entre naftoquinona e ISNZ possui fórmula molecular C23H19N3O7 correspondendo a massa exata calculada de 449,1247 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 5,3438 ppm comparado com o observado no espectro.....	75
Figura A 9. Espectro de RMN 1H obtido para o produto da reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ, em DMSO-d6, 600 MHz	76
Figura A 10. Espectro de RMN TOCSY obtido para o produto da reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ com irradiação nos Hidrogênio 7,42 ppm (acima) e 8,79 ppm (abaixo), em DMSO-d6, 600 MHz	77
Figura A 11. Mapa de contornos HMQC obtido para o produto da reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ em DMSO-d6, 600 MHz.....	77
Figura A 12. Mapa de contornos HMBC obtido para o produto da reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ em DMSO-d6, 600 MHz	78
Figura A 13. Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. O Produto 2 possui fórmula molecular C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₆ correspondendo a massa exata calculada de 418,1165 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 4,0659 ppm comparado com o observado no espectro.....	79
Figura A 14. Espectro de RMN 1H obtido para o Produto 2, em CDCl ₃ , 600 MHz.....	80
Figura A 15. Mapa de contornos HMQC obtido para o Produto 2, em CDCl ₃ , 600 MHz.....	80
Figura A 16. Mapa de contornos HMBC obtido para o Produto 2, em CDCl ₃ , 600 MHz	81
Figura A 17. Espectro de RMN TOCSY obtido para o Porduto 2, com irradiação no Hidrogênio 7,97 ppm, em CDCl ₃ , 600 MHz	81
Figura A 18. Espectro de RMN TOCSY obtido para o Porduto 2, com irradiação no Hidrogênio em 4,91 ppm, em CDCl ₃ , 600 MHz	82
Figura A 19 Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. O Produto possui fórmula molecular C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₆ correspondendo a massa exata calculada de 420,1321 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 5,2364 ppm comparado com o observado no espectro.....	83
Figura A 20. Espectro de RMN 1H obtido para o Produto 3, em CDCl ₃ , 600 MHz.....	84
Figura A 21. Mapa de contornos HMQC obtido para o Produto 3 em CDCl ₃ , 600 MHz	84
Figura A 22. Mapa de contornos HMBC obtido para o Produto 3 em CDCl ₃ , 600 MHz	85

Figura A 23. Espectro de RMN TOCSY obtido para o Produto 3, com irradiação no Hidrogênio em 4,711 ppm, em CDCl ₃ , 600 MHz	85
Figura A 24. Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. O Produto 4 possui fórmula molecular C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₆ correspondendo a massa exata calculada de 418,1165 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 4,305 ppm comparado com o observado no espectro.....	86
Figura A 25. Espectro de RMN 1H obtido para o Produto 4, em CDCl ₃ , 600 MHz.....	88
Figura A 26. Mapa de contornos HMQC obtido para o Produto 4, em CDCl ₃ , 600 MHz.....	88
Figura A 27. Mapa de contornos HMBC obtido para o Produto 4, em CDCl ₃ , 600 MHz	89

Lista de Abreviações

HPLC – *High performance liquid cromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

RMN – Ressonância magnética nuclear

MHz – Mega Hertz

Q-TOF – *Quadrupole time of fly* (quadropolo por tempo de voo)

BD – Meio de cultivo batata-dextrose

UPLC – Ultra performance liquid cromatography (Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência)

NAD(P)H – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

NF-κB – Fator nuclear kappa B

IKK – IkappaB kinase

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (Intensificação sem distorção por transferência de polarização)

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (correlação heteronuclear de ligações multiplas)

MQC - *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation* (correlação heteronuclear de quantum multiplas)

COSY – ^1H - ^1H Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de correlação de hidrogênios)

NOESY – *Nuclear Overhauser effect spectroscopy* (Espectrometria Diferencial com Efeito Nuclear Overhauser)

TOCSY – *Total Correlation Spectroscopy* (Espectrometria de correlação total)

1. Introdução

1.1. Produtos Naturais

Desde os tempos pré-históricos o ser humano usa produtos naturais advindos de plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos como forma de tratamento de enfermidades.^{1,2} Existem, na história do mundo, várias correntes de medicina tradicional, que utilizaram produtos naturais por milhares de anos como meio de tratamento dos pacientes, sendo a mais famosa delas a medicina tradicional da China.³ Com o avanço dos conhecimentos tecnocientíficos, foi possível identificar a farmacologia e os mecanismos de ação de algumas plantas medicinais usadas pela medicina tradicional chinesa, o que fez com que esses tratamentos fossem compreendidos do ponto de vista moderno.^{4,5,6}

Estas moléculas possuem uma grande variedade estrutural e são compostos vitais na área da saúde, uma vez que suas estruturas, muitas vezes, possuem ligação com alvos moleculares e, com isso, geram um efeito terapêutico relevante, como substâncias no tratamento de câncer e antibióticos.⁷

Os produtos naturais são metabólitos secundários, ou seja, são compostos derivados de metabolitos primários - carboidratos, aminoácidos e lipídeos.⁸ Esses metabólitos secundários, ao contrário dos primários, não possuem relação direta aparente com o crescimento, desenvolvimento e reprodução de organismos, no entanto eles possuem um papel fundamental na adaptação ao ambiente, em estratégias de defesa e na sobrevivência da espécie.⁹ Por conta disso, os metabólitos secundários são constantemente considerados na inovação e prospecção de novas drogas, sendo aplicados na área medicinal, cosmética e nutricional.¹⁰ Esses metabolitos são divididos por origem biossintética e classificados em flavonoides, alcaloides, terpenos, cumarinas, fenóis e quinonas, por exemplo.^{11,8}

Os produtos naturais possuem uma grande variedade estrutural, o que pode ser observado com as diversas classes já citadas. Com isso, é possível observar desde estruturas pequenas, como no caso de alguns aminoácidos, até estruturas maiores e mais complexas, como em moléculas que possuem anéis esteroidais. Dentro desta gama de moléculas, existem várias que, para serem utilizadas como fármacos, necessitam de modificações estruturais. Estas moléculas podem possuir grandes grupos apolares, que dificultam a solubilidade no meio aquoso do organismo, reduzindo a absorção do fármaco, ou até mesmo possuírem funções orgânicas que

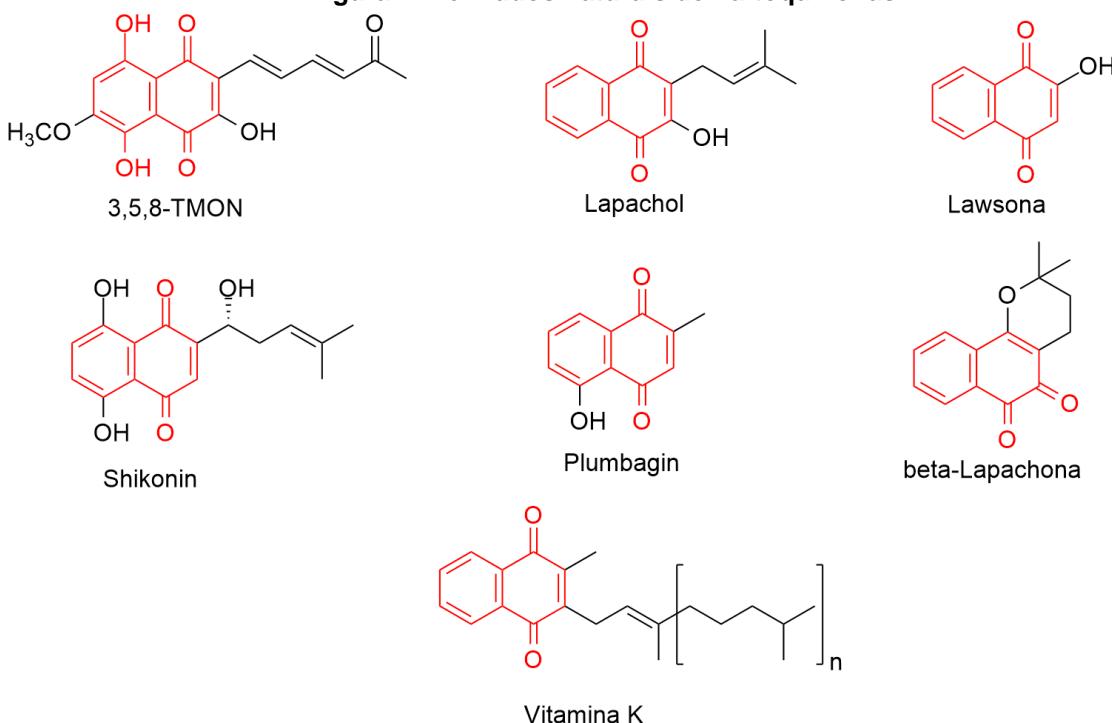
prejudicam a interação da molécula com o alvo. Neste contexto a modificação das estruturas destes produtos é essencial, para que sua atividade seja aumentada, gerando melhores fármacos.⁷

1.2. Importância de naftoquinonas e seus derivados

A estrutura quinoide está espalhada por todas a natureza e as quinonas abrangem perto de 1200 produtos naturais.¹² Essas moléculas possuem diversas funções nos organismos, sendo essenciais em processos metabólicos e de homeostase. Dentre as diferentes quinonas, estão as naftoquinonas, que são compostos que possuem duas carbonilas conjugadas a um sistema policíclico aromático. Dentre as rotas biossintéticas estão a via do acetatomalonato, a dos ácidos mevalônico e corísmico, além das vias do ácido *p*-hidroxibenzóico.¹³

Os derivados naturais das naftoquinonas têm sido constantemente encontrados como metabólitos de plantas, de microrganismos e de organismos marinhos,¹⁴ e a importante atividade biológica, celular e farmacológica dessa classe de moléculas tem sido investigada por vários estudos. Presentes em muitas plantas medicinais, na forma de metabólitos secundários, os derivados de naftoquinonas (**Figura 1**), como shikonin, lapachol e plumbagin, são considerados os compostos com papel principal na atividade antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória e cicatrizante^{15,16}, dessas plantas, além de possuírem atividade antineoplásica¹⁷. Para as plantas, as naftoquinonas têm papel importantíssimo na inibição do crescimento de organismos que possam comprometer o seu desenvolvimento, tendo função chave na sua adaptação ao ambiente no qual se encontram.⁹

Figura 1. Derivados naturais de naftoquinonas.

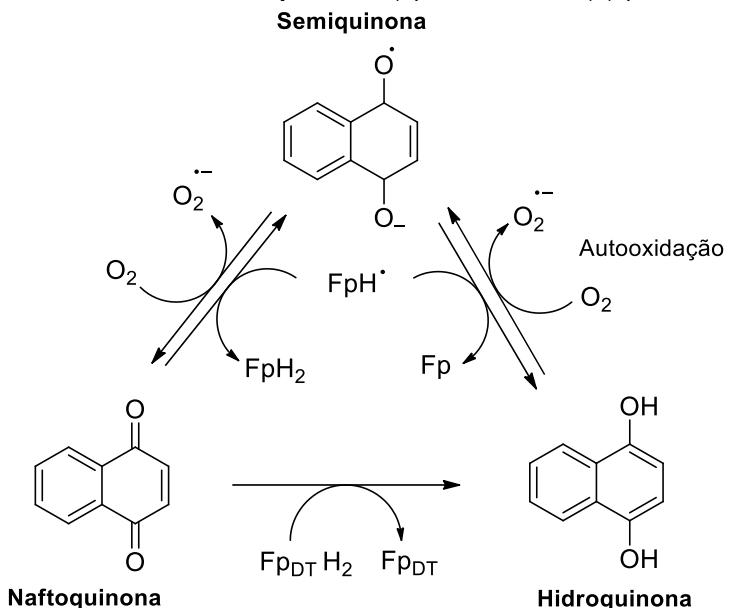


As naftoquinonas também são importantes para os mamíferos, pois são constituintes do complexo das vitaminas K, que é obtido via alimentação ou por produção de microrganismos simbiontes. As moléculas desse complexo de vitaminas são cofatores da enzima γ -glutamil carboxilase que catalisa a transformação de resíduos de glutamato em γ -carboxiglutamato, e exercem papel fundamental na coagulação, visto que quatro fatores pró-coagulação dependem da vitamina K como cofator.¹³ Além disso, as vitaminas K atuam sobre as citocinas¹⁸ e prevenindo a morte neuronal.¹⁹

As naftoquinonas atuam nas células por diversos mecanismos, sendo dois os principais deles: a geração de espécies reativas de oxigênio ou a atuação em vias de sinalização celular.¹⁸ Dentro das células algumas enzimas irão fazer com que as naftoquinonas sejam reduzidas, com a retirada de um ou de dois elétrons. Flavoenzimas presentes no retículo endoplasmático e na mitocôndria irão fazer a redução de um elétron, formando o radical semiquinona,²⁰ já algumas enzimas citosólicas como a NAD(P)H quinona oxidorredutase (também chamada de DT-diaforase) irão fazer a redução de dois elétrons, formando os radicais hidroquinona.⁹ Esses radicais formados entrarão em um ciclo com moléculas de O₂ (**Figura 2**), o que irá acarretar na formação do radical superóxido.²¹ Uma vez formado esse radical, ele irá gerar outras espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxila e radical

peróxido de hidrogênio, os quais tem um alto poder oxidativo e estão relacionados a danos de várias macromoléculas das células.¹⁹

Figura 2. Ciclo Redox das naftoquinonas. (Fp: Flavoenzimas) (FpDT: DT-diaforase)



Somado ao efeito das espécies reativas de oxigênio, as semiquinonas em excesso podem se ligar a várias estruturas celulares como a membrana celular, proteínas e até mesmo ao DNA de maneira irreversível, levando à morte celular.²² Esse efeito pode ser mais seletivo para células tumorais,²³ visto que elas possuem maior sensibilidade ao estresse oxidativo por conta do seu estado proliferativo elevado.²⁴

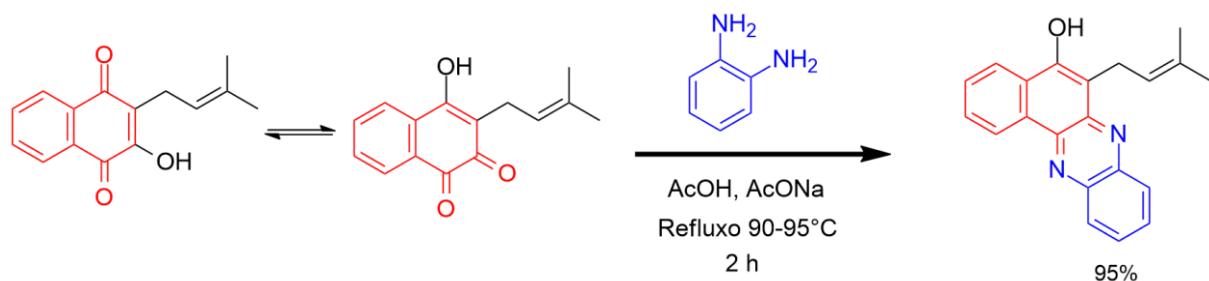
A outra forma de ação das naftoquinonas é atuando sobre a sinalização celular, na via de NF-κB por exemplo. Nesta via, as naftoquinonas inibem a enzima IKK, que é responsável por fosforilar a forma inativa (IκB α) e fazer com que esse complexo sofra degradação proteossomal, liberando NF-κB para se ligar ao DNA.²⁵ Esse mecanismo de ação pode explicar as atividades anti-inflamatórias, anti-angiogênese e anti-tumoral⁹ das naftoquinonas.

Dentro dos compostos dessa classe temos vários que se destacam por sua atividade biológica, como o lapachol, a β -lapachona, a lawsona, o plumbagin, o shikonin entre outros (**Figura 1**). Este último composto, assim como as naftoquinonas de maneira geral, pode atuar de diversas formas, tais quais, auxiliando na diminuição da resposta inflamatória, no processo de cicatrização, na morte de linhagens celulares HL-60 presentes na leucemia, dentre outras propriedades farmacológicas.^{26,27,28,29} A importância desse composto é tanta que devido a esforços, principalmente no Japão,

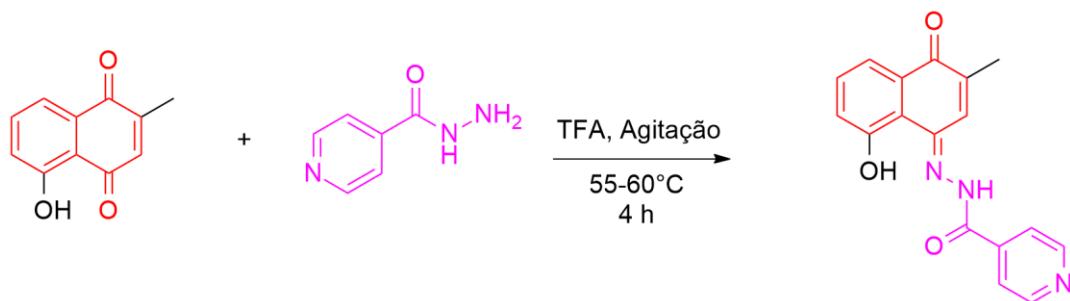
foi desenvolvida a primeira aplicação de cultura celular de tecido vegetal para se obter metabólitos secundários no mundo, pela empresa Mitsui Petrochemical Company.³⁰

Dada a grande importância das naftoquinonas como agentes farmacológicos, essa classe de moléculas têm sido utilizada como ponto de partida para a produção de compostos biologicamente ativos, como é o caso do lapachol.³¹

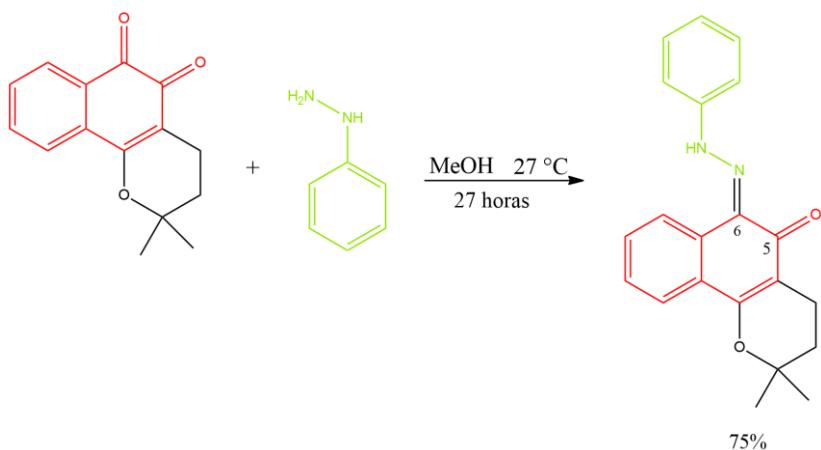
Silva e colaboradores, empregaram a reação do lapachol com o-fenilenodiamina em condições ácidas para a produção de fenazinas (**Esquema 1**). Heterocíclos como as fenazinas³² possuem importância na química medicinal³³.



Dandawate e colaboradores, realizaram a reação do plumbagin com a isoniazida em meio ácido, afim de produzir funcionalização na molécula da naftoquinona (**Esquema 2**). Esta modificação visa adicionar um grupo farmacofórico conhecido, que possui efeitos semelhantes aos das naftoquinonas por atuar sobre a via de NF-Kb³⁴.



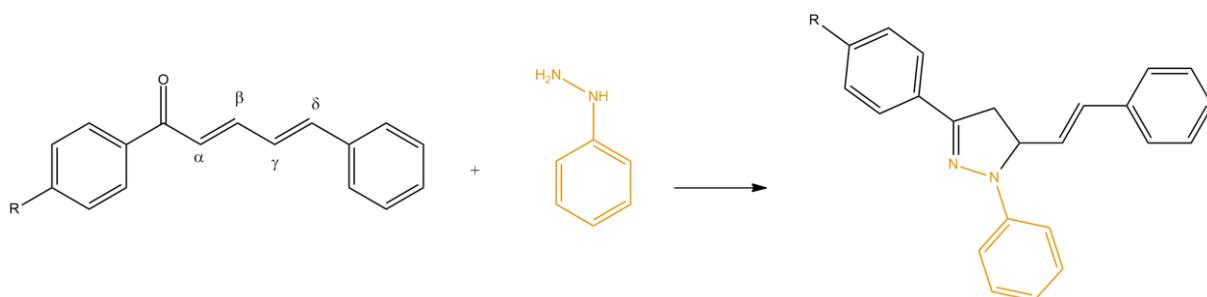
Carvalho e colaboradores, realizaram a reação da β-Lapachona com a fenilhidrazina, em metanol e à temperatura ambiente por 27 horas, afim de produzir uma hidrazone proveniente da naftoquinona (**Esquema 3**). Esta reação é interessante pelo potencial farmacológico do produto formado.³⁵



Esquema 3

Um outro representante da classe das naftoquinonas é o composto 3,5,8-TMON (3,5,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(5-oxohexa-1,3-dienil)-1,4-naphthoquinona), que é um metabólito secundário de cor vermelha intensa isolado do fungo *Cordyceps unilateralis* BCC 1869.³⁶ Esse composto apresenta o grupamento naftoquinona e apresenta semelhança estrutural aos compostos dessa classe (Figura 1). O 3,5,8-TMON apresenta uma estrutura promissora para modificações estruturais com finalidade de gerar substâncias biologicamente ativas.³⁷

Adicionalmente, esta molécula possui, além do centro naftoquinona, uma cadeia lateral com um sistema $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -instaturado conjugado à uma carbonila de cetona (Esquema 4). Este tipo de sistema é comumente utilizado para reações de heterociclagem com fenilhidrazina, formando um anel de dihidropirazol o qual possui atividade biológica muito relevante, como demonstrado por George e colaboradores³⁸

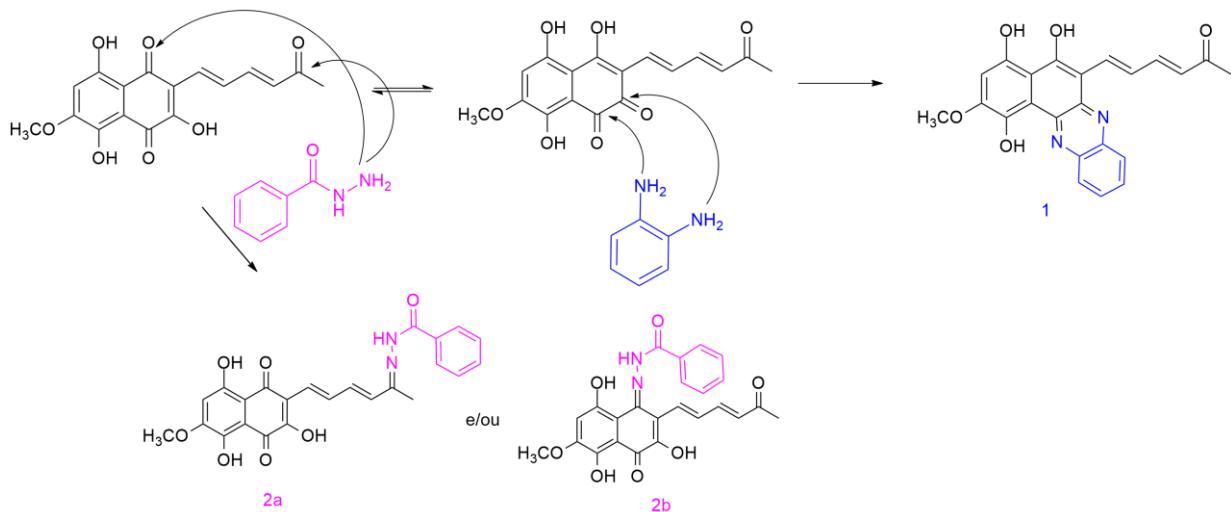


Esquema 4

2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho de conclusão de curso foi explorar a reatividade do composto 3,5,8-TMON frente a reações com nucleófilos que contém átomos de Nitrogênio, afim de criar grupamentos químicos importantes do ponto de vista farmacêutico.

A partir do isolamento do 3,5,8-TMON, este projeto avaliou as possibilidades de modificação estrutural do referido produto natural frente a nucleófilos nitrogenados (como por exemplo aqueles presentes no **(Esquema 5)** bem como a caracterizou os produtos formados.



Esquema 5

2.1. Objetivos específicos

- 2.1.1. Isolar e purificar o composto 3,5,8-TMON do processo fermentativo do fungo *Cordyceps sp.*
- 2.1.2. Estudar modificações estruturais do 3,5,8-TMON via reações de funcionalização e de heterociclagem empregando isoniazida, fenilhidrazina, *o*-fenilenodiamina e outros nucleófilos análogos.
- 2.1.3. Caracterizar os produtos das reações usando técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

3. Materiais

3.1. Equipamentos

- Vitrarias específicas para realização de síntese orgânica e extração líquido-líquido.
- Reator de micro-ondas Anton-parr, modelo monopar 300.
- Rota evaporador R - 144 BUCHI®.
- Centrífuga de bancada (NOVA instruments).
- Agitador magnético Corning.

- Mesa agitadora orbital - Mod. 190 Nova Ética® e MA 140 CFT Marconi®.
- Espectrômetro de massa – Xevo TQ-S Waters® acoplado com sistema Acquity™ UPLC.
- Balança analítica FA2104N - Celtac®.
- Espectrômetro de massas Triplo-TOF 5600 Sciex acoplado com sistema HPLC Nexera
- HPLC – Shimadzu (equipado com controladora CBM-20A, bombas LC6AD, detector SPD-20A, degaseificador DGU-20A5 e injetor manual Rheodyne).
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear - Bruker® Avance III HD – 600 e Bruker® DRX – 400

3.2. Reagentes, Solventes e outros

- Os solventes utilizados no trabalho são de grau analítico ou cromatográfico
- Isoniazida (SIGMA®).
- Fenilhidrazina Cloridrato (VETEC), obtido por meio da Zilquímica.
- o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich).
- Ácido o-fosfórico (Synth).
- MgSO₃ (Sulfato de Magnésio) anidro (Synth).
- Acetato de Sódio (AcO⁻Na⁺) (Synth).
- Ácido Acético (AcOH) (Synth).
- Sulfato de Cobre (Synth).
- Ácido Trifluoracético (TFA) (Sigma-Aldrich).
- Ácido fórmico (AF) (Sigma-Aldrich).
- Metanol (MeOH) HPLC (Synth).
- Acetato de Etila (AcEt) (Synth).
- Acetona (Synth).
- Água deionizada.
- Solventes deuterados: CDCl₃ (Clorofórmio) e DMSO-d₆ (dimetilsulfóxido)
- Meio Batata-Dextrose (BD).

- Coluna cromatográfica de HPLC C18 Shimadzu-ODS (250 x 4.6 mm, 5 μ m) – Shimadzu®.
- Coluna cromatográfica de HPLC Ascentis® Express C18 (10.0 cm x 3.0 mm, 2.7 μ m) – Supelco®.
- Coluna cromatográfica de HPLC Luna C18 (250 x 20.00 mm, 5 μ m) – Phenomenex®.

4. Métodos

4.1. Isolamento e purificação do produto de interesse

O fungo *Cordyceps* sp. foi fermentado em meio líquido batata-dextrose em erlenmeyers de 5 L, com um volume de 1 L em cada um. A fermentação foi conduzida por um período de 15 dias, sob agitação constante 150 rpm e temperatura de 28°C.³⁷ Após esse período, 4 L do meio foi filtrado e o caldo fermentado foi submetido a três extrações líquido-líquido com Acetato de Etila na proporção de 1:3 em pH 2 com o auxílio do ácido o-fosfórico. Após a realização dos procedimentos extractivos em funil de separação, a fase orgânica, de aproximadamente 1,5 L, foi seca com sulfato de magnésio anidro e concentrada a pressão reduzida com o auxílio de um rotaevaporador, obtendo-se 4,0 g de um sólido vermelho que foi identificado como extrato bruto.

O sólido foi adicionado a 500 mL de H₂O e 3 mL de ácido o-fosfórico em um balão de 1000 mL. Em seguida, o balão foi submetido ao refluxo overnight. Após resfriamento, o conteúdo do balão foi transferido para tubos de centrífuga, os quais foram armazenados em geladeira por um período de 24 horas. Em seguida, centrifugou-se o conteúdo e o sobrenadante fora retirado e transferido para um bêquer. Posteriormente, adicionou-se água gelada ao precipitado presente na centrífuga e o sobrenadante fora dividido em dois outros frascos para centrifugação. Repetiu-se a centrifugação e reservou-se o precipitado em um bêquer.

O precipitado foi seco sob ventilação à temperatura ambiente. Uma pequena alíquota foi retirada e solubilizada em Metanol HPLC para análise, obtendo um rendimento de aproximadamente 50% em relação ao extrato bruto.

4.2. Condições cromatográficas

Todas as reações foram monitoradas por LC-DAD-MS/MS utilizando um sistema de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas Acquity Xevo

TQS (Waters®), empregando uma coluna Ascentis® Express C18 (10.0 cm x 3 mm, 2.7 μ m) – Sigma Aldrich, com detector de DAD foi na faixa de 200-700 nm e ambos os modos de análise (positivo e negativo) para a identificação dos produtos de reação.

Para realização de cromatografia de alta eficiência em escala preparativa, utilizou-se um sistema HPLC – Shimadzu (equipado com controladora CBM-20A, bombas LC6AD, detector SPD-20A, degaseificador DGU-20A5 e injetor manual Rheodyne. Primeiramente utilizando-se da coluna cromatográfica de HPLC C18 Shimadzu-ODS (250 x 4.6 mm, 5 μ m) – Shimadzu®, e posteriormente utilizando-se da Coluna cromatográfica de HPLC Luna C18 (250 x 20.00 mm, 5 μ m) – Phenomenex®. O método utilizado consiste em um modo de eluição por gradiente linear, de uma mistura de Metanol e água, ambos com 0,1% de AF, partindo da proporção de 60:40 (MeOH/H₂O) para 98 (MeOH/H₂O) em 30 minutos. Após este tempo, retorna-se à concentração inicial por mais 10 minutos. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min para o modo analítico e de 12 mL/min para o modo preparativo. Os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda de 371 nm - 480 nm.

4.3. Modificações estruturais

4.3.1. Reação com isoniazida

Primeiramente, pesou-se 49,9 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um balão de uma boca de 50 mL. Adicionou-se 20 mL de AcOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 26,19 mg (~0,1911 mmol) de isoniazida e transferiu-a para o balão, em uma proporção de 1:1,2. O balão reacional foi submetido ao refluxo por 3 horas. Após decorrido este tempo, foi realizada extração líquido-líquido com Acetato de Etila, na proporção 1:2 com solução de NaCl saturada. Observou-se formação de emulsão na entrefase, com a presença de precipitado. Separou-se as 3 fases e analisou-se por LC-MS.

Segundamente, pesou-se 50,20 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um tubo de micro-ondas. Adicionou-se 10 mL de AcOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 26,4 mg (~0,1911 mmol) de isoniazida e transferiu-a para o tubo, em uma proporção de 1:1,2. O reator de micro-ondas utilizou a temperatura de 118°C e 1000 rpm. Foram retiradas alíquotas de 30 em 30 minutos, até totalizarem 3 horas de reação. As alíquotas foram analisadas por LC-MS.

Terceiramente, pesou-se 50 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um tubo de micro-ondas. Adicionou-se 15 mL de MeOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 25,9 mg (~0,1911 mmol) de isoniazida e transferiu-a para o tubo, em uma proporção de 1:1,2. Adicionou-se 150 μ L de ácido trifluoracético e adicionou-se o tubo ao micro-ondas, utilizando 70°C e 1000 rpm. Após uma hora, transferiu-se o conteúdo do tubo para um balão e evaporou-se sob pressão reduzida. O sólido do balão foi raspado e então transferido para tubos de centrífuga. Adicionou-se acetona na proporção de 2 mL para cada 1 mg de material sólido. Centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante, repetindo o processo até que o sobrenadante fique límpido. O produto, um sólido vermelho escuro e insolúvel, foi seco à temperatura ambiente e posteriormente solubilizado em MeOH com o auxílio de DMSO para análise em LC-MS e, também, em DMSO-d₆ para análise de RMN.

4.3.2. Reação com fenilhidrazina

Primeiramente, pesou-se 50 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um balão de 50 mL. Adicionou-se 15 mL de MeOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 28,7 mg (~0,197 mmol) de cloridrato de fenilhidrazina e transferiu-a para o balão, em uma proporção de 1:1,3. A reação foi tomada por 24 horas à temperatura ambiente, após este tempo, retirou-se uma alíquota para análise em LC-MS. Aqueceu-se a reação por 3 horas e depois desligou-se o aquecimento. Secou-se o conteúdo do balão sob pressão reduzida e analisou-se o sólido em LC-MS.

Segundamente, pesou-se 51,02 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um balão de 50 mL. Adicionou-se 20 mL de AcOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 28,4 mg (~0,197 mmol) de cloridrato de fenilhidrazina e transferiu-a para o balão, em uma proporção de 1:1,3. A reação foi tomada por 24 horas à temperatura ambiente, após este tempo, retirou-se uma alíquota para análise em LC-MS. Aqueceu-se a reação por 30 minutos e depois desligou-se o aquecimento. A reação foi extraída com AcEt:H₂O na proporção 2:1 e concentrado em rotaevaporador. O extrato foi analisado em LC-MS e purificado por HPLC preparativa.

Após isso, pesou-se 50,5 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um balão de 50 mL. Adicionou-se 20 mL de AcOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 28,6 mg (~0,197 mmol) de cloridrato de fenilhidrazina e transferiu-a para o balão, em uma proporção de 1 : 1,3. Submeteu-se o conjunto ao aquecimento e retirou-se alíquotas de 30 em 30 minutos. A reação foi tomada por 1 hora, após este

tempo, desligou-se o aquecimento. A reação foi extraída com AcEt : H₂O na proporção 2:1 e concentrado em rotaevaporador. O extrato foi analisado em LC-MS e purificado por HPLC preparativa.

Em quarto lugar, pesou-se 50 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um balão de 50 mL. Adicionou-se 20 mL de AcOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 28,45 mg (~0,197 mmol) de cloridrato de fenilhidrazina e transferiu-a para o balão, em uma proporção de 1:1,3. Submeteu-se o conjunto ao micro-ondas, retirando-se alíquotas de 15 em 15 minutos até atingir uma hora e desligou-se o aquecimento. A reação foi extraída com AcEt:H₂O na proporção 2:1 e concentrado em rotaevaporador. O extrato foi analisado em LC-MS e purificado por HPLC preparativa.

Por fim, pesou-se 50,6 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um balão de 50 mL. Adicionou-se 20 mL de MeOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 28,2 mg (~0,197 mmol) de cloridrato de fenilhidrazina e transferiu-a para o balão, em uma proporção de 1:1,3. Submeteu-se o conjunto ao micro-ondas, retirando-se alíquotas de 15 em 15 minutos até atingir uma hora e desligou-se o aquecimento. A reação foi extraída com AcEt:H₂O na proporção 2:1 e concentrado em rotaevaporador. O extrato foi analisado em LC-MS e purificado por HPLC preparativa.

4.3.3. Reação com *o*-fenilenodiamina

Primeiramente, pesou-se 49,9 mg (~0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um balão de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de AcOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 17,7 mg (~0,166 mmol) de *o*-fenilenodiamina e transferiu-a para o balão, em uma proporção de 1:1,1. A reação foi submetida ao refluxo por duas horas e, passado o tempo, realizou-se uma extração líquido-líquido com Acetato de Etila 1:2 com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca sob pressão reduzida e ressuspensa em metanol HPLC para análise em LC-MS.

Segundamente, pesou-se 50 mg (0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e transferiu-se para um balão de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de AcOH e solubilizou-se o material de partida. Pesou-se 18,2 mg (~0,166 mmol) de *o*-fenilenodiamina e transferiu-a para o balão, em uma proporção de 1:1,1. A reação foi submetida ao aquecimento via micro-ondas à 80°C por duas horas e, passado o tempo, realizou-se uma extração líquido-líquido com Acetato de Etila 1:2 com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi

seca sob pressão reduzida e ressuspensa em metanol HPLC para análise em LC-MS.

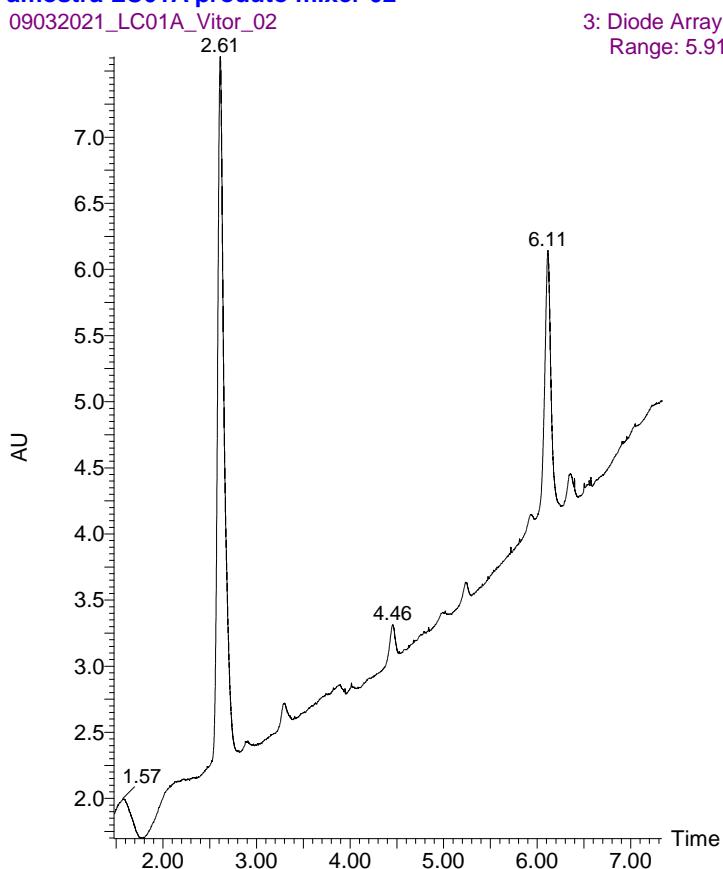
5. Resultados e discussão

5.1. Isolamento e purificação do produto de interesse

Assim como realizado por Mendonça (2016, p. 16-17) o fungo *Cordyceps* sp. foi fermentado em meio de cultura líquido BD por um período de 15 dias. Após o período fermentativo, realizou-se extração líquido-líquido com Acetato de Etila em pH ácido. Após secagem e evaporação do solvente, obteve-se um sólido denominado de extrato bruto³⁵.

Após a fermentação e o processo de extração do meio de cultivo, obteve-se o cromatograma a seguir (**Figura 3**):

Figura 3. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido do extrato da fermentação do fungo *Cordyceps* sp. amostra LC01A produto mixer 02



A figura acima apresenta a formação de dois picos de maior intensidade, nos tempos de retenção 2,60 minutos e 6,14 minutos. A partir dos espectros de massas e de absorção U.V. o pico cromatográfico com tempo de retenção 2,60 min. (**Figura 4**)

foi atribuído como a *Erythrostominone*, com um íon $[M+H]^+$ de m/z 349 e $[M-H]^-$ de m/z 347, o que corresponde a uma massa de 348 u. Já o pico cromatográfico com tempo de retenção 6,14 min (**Figura 5**), foi atribuído ao 3,5,8-TMON, com um $[M+H]^+$ de m/z 331 e $[M-H]^-$ de m/z 329, o que corresponde a uma massa de 330 u. Estas atribuições tiveram como base dados obtidos na literatura.³⁷

**Figura 4. Espectros UV e de massas do produto da fermentação do tempo 2,61 min
amostra LC01A produto mixer 02**

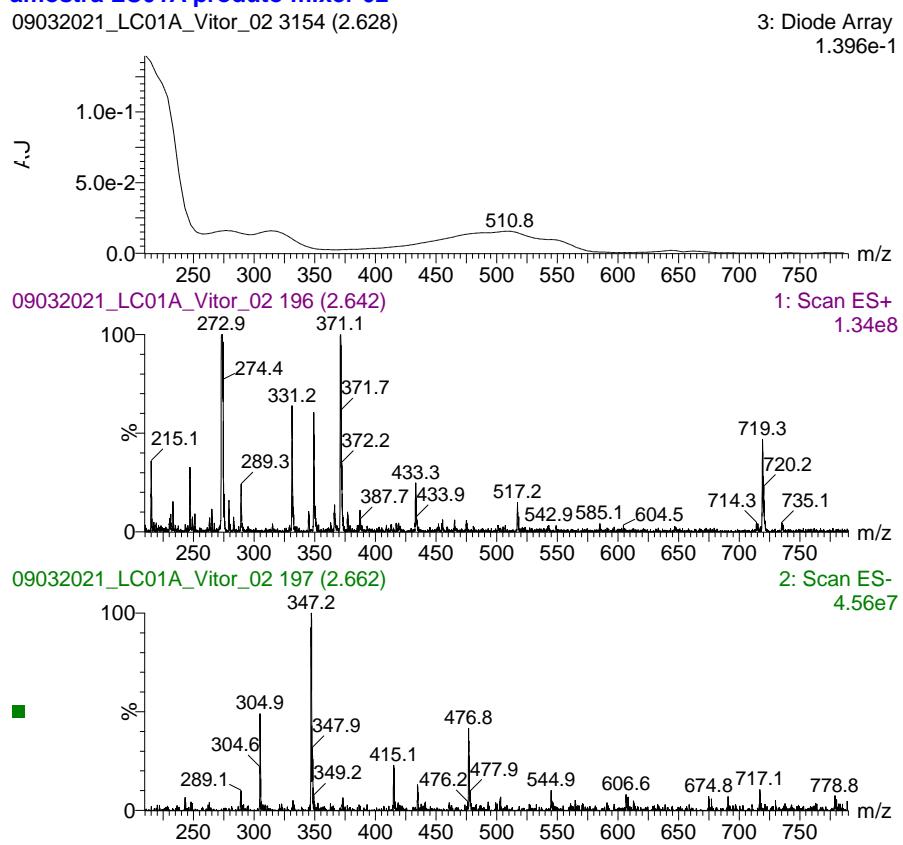
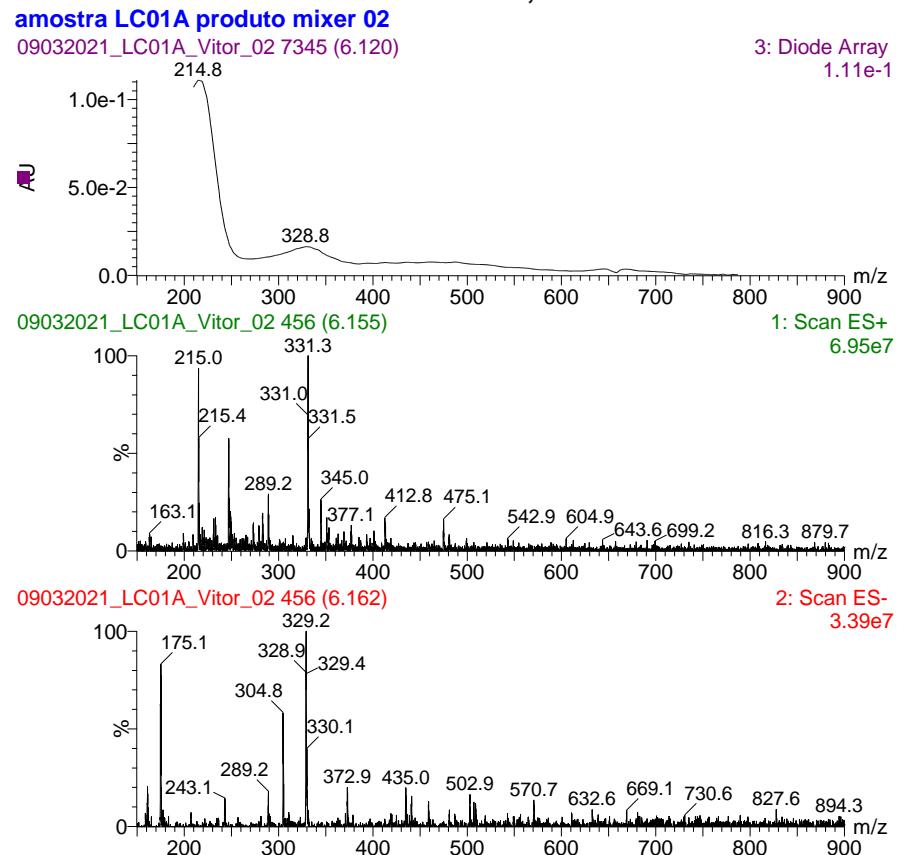
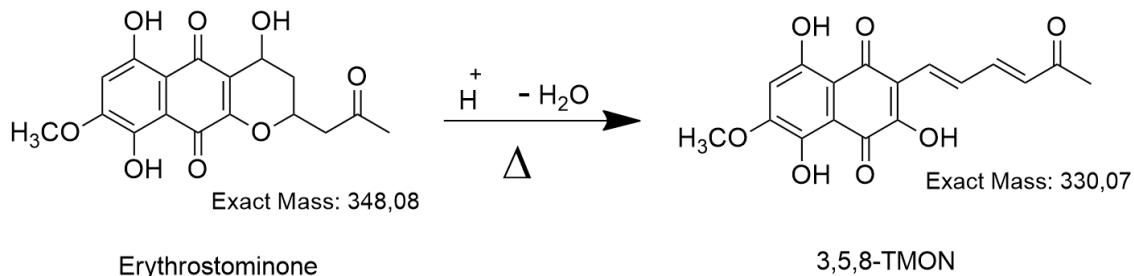


Figura 5. Espectros UV e de massas do produto da fermentação do tempo 6,11 min.



Com o objetivo de isolar o produto de interesse em maior quantidade, o Erythrostominone presente na mistura foi convertido ao 3,5,8-TMON por meio de refluxo na presença de ácido, o qual catalisa uma reação de desidratação e de abertura do anel furânico, via mecanismo de eliminação (**Esquema 6**).

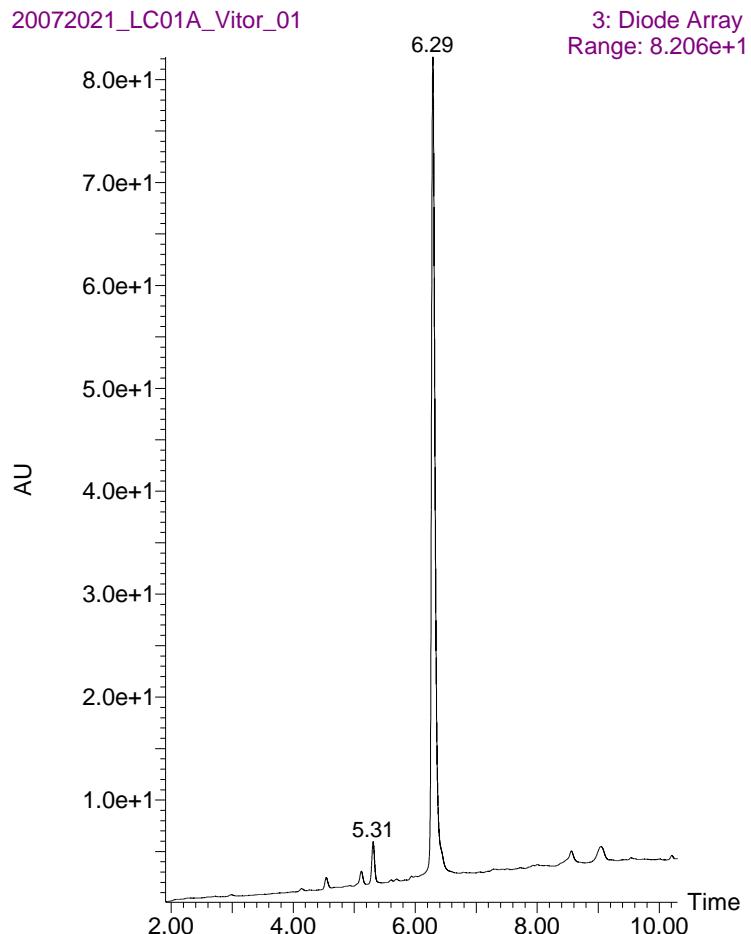


Esquema 6: Reação de desidratação e eliminação que leva à transformação de Erythrostominona em 3,5,8-TMON

O refluxo foi mantido overnight e, após a neutralização do excesso de ácido, tomado cuidado para não aumentar o pH acima de 7, de maneira a aumentar a solubilidade em água do composto, transferiu-se o líquido para tubos de centrifuga e resfriou-os em geladeira. Após resfriar, centrifugou-se e o sobrenadante fora retirado e transferido para um béquer. Posteriormente, adicionou-se água gelada ao precipitado e o sobrenadante fora dividido em dois outros frascos de centrifuga. Repetiu-se a centrifugação e reservou-se o precipitado em um béquer.

O precipitado foi seco sob ventilação à temperatura ambiente e depois raspado. Uma pequena alíquota foi retirada e solubilizada em Metanol HPLC para análise, que apresentou o resultado a seguir (**Figura 6**):

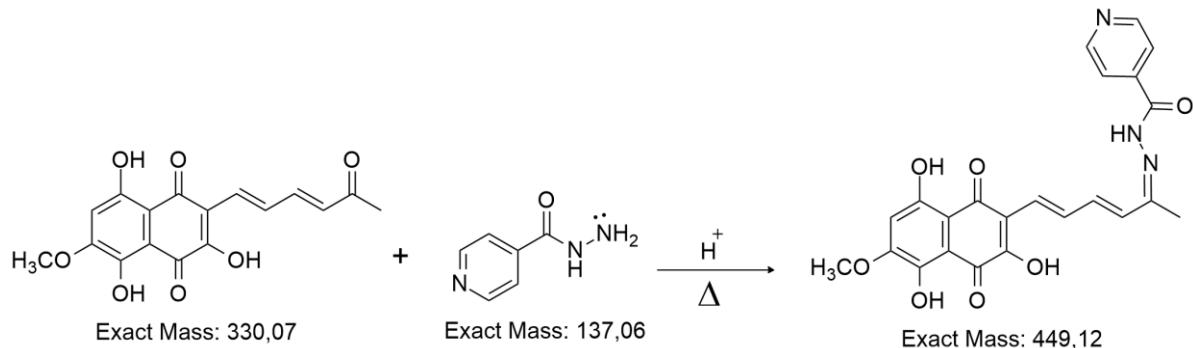
Figura 6. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido após reação de desidratação do extrato amostra LC01A MIXER Hidrolisado
20072021_LC01A_Vitor_01



Neste cromatograma é possível observar a presença de um pico predominante com tempo de retenção de 6,29 minutos. O qual correspondente ao composto 3,5,8-TMON, tendo como base a análise realizada anteriormente. Com isso, observa-se que a obtenção de material de partida pode ser realizada de maneira eficaz, o que permite o acesso facilitado ao substrato das modificações estruturais.

5.2. Modificações estruturais

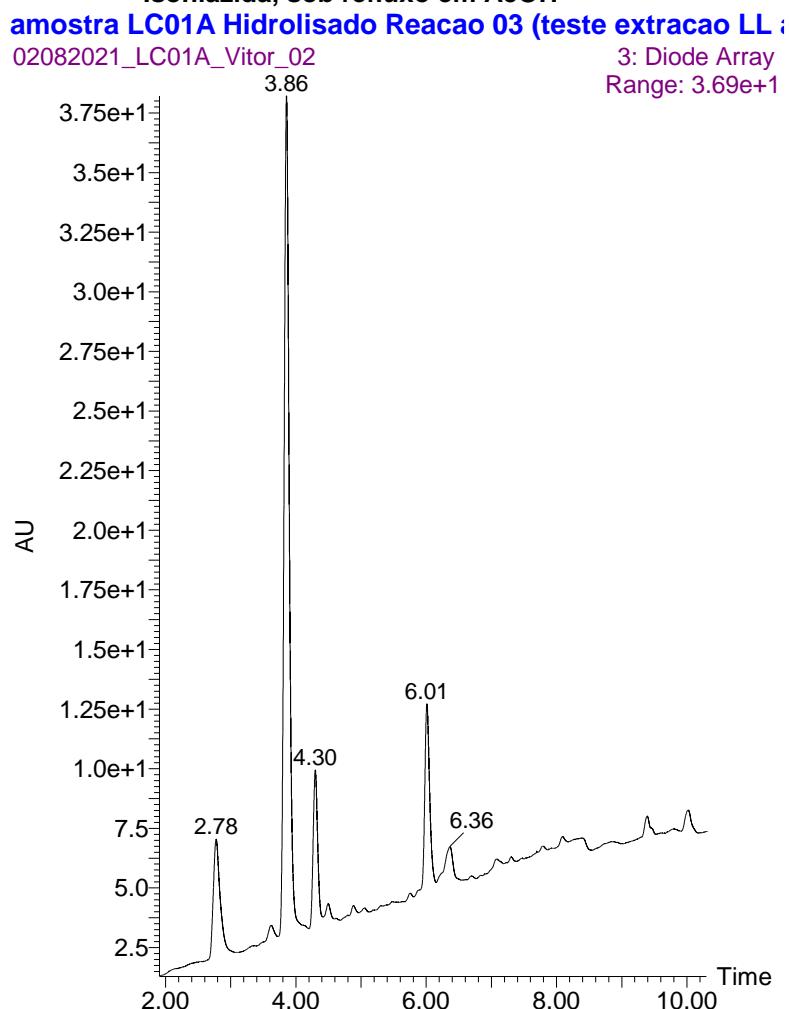
5.2.1. Reação com isoniazida



Esquema 7: Esquema geral da reação proposta

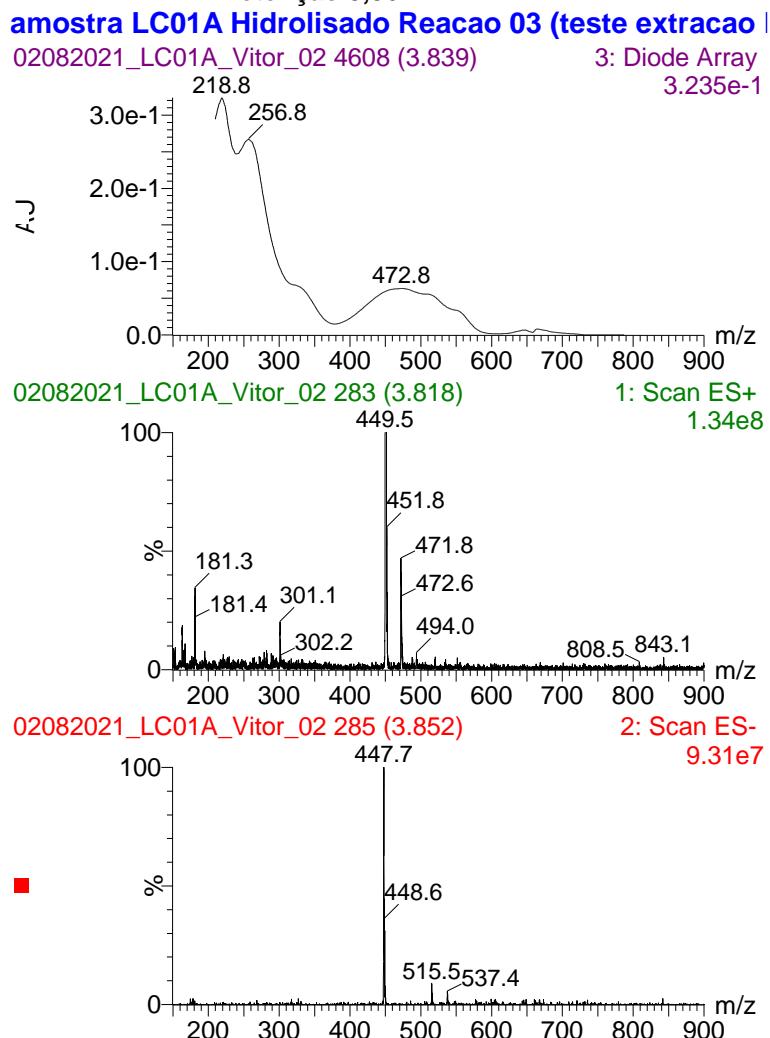
Em um primeiro momento, a reação da naftoquinona 3,5,8-TMON com a isoniazida (**Esquema 7**) foi realizada seguindo a metodologia utilizada por Reis (2019), porém com algumas modificações, como na naftoquinona de partida: 50 mg (0,151 mmol) de 3,5,8-TMON foram empregados na reação com 26,2 mg (0,1911 mmol) de isoniazida, em uma proporção de 1:1,2. Utilizou-se Ácido Acético como solvente reacional e submeteu-se ao refluxo por 3 horas.³⁹ Após o término do tempo de reação, foi realizado procedimento de extração líquido-líquido com acetato de etila. Observou-se a formação de emulsão e a presença de precipitado entre as fases. Separou-se as 3 fases (aquosa, emulsão e orgânica) para posterior análise no sistema LC-MS, como apresentado no cromatograma (**Figura 7**) a seguir:

Figura 7. Cromatograma DAD (varredura 240-700 nm) obtido da reação de 3,5,8-TMON com Isoniazida, sob refluxo em AcOH



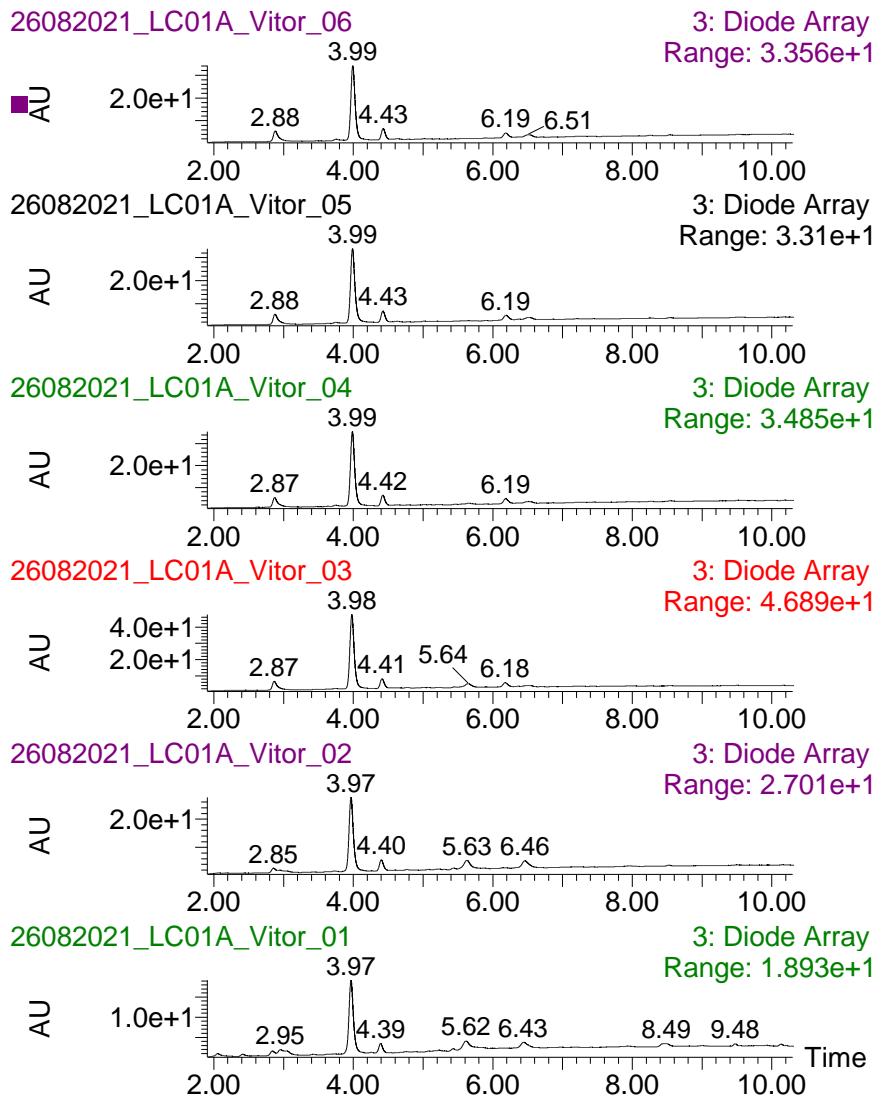
Neste cromatograma é possível observar a formação de um produto de interesse no tempo de retenção 3,86 min, o qual possui a massa equivalente ao produto desejado, com $[M+H]^+$ de m/z 450 e $[M-H]^-$ de m/z 448, o que corresponde a uma massa de 449 u (Figura 8). Ainda é possível observar a presença de material de partida, no tempo de retenção 6,01 min, e de dois outros subprodutos da reação.

Figura 8. Espectros UV e de massas do pico cromatográfico (ESI+ e ESI-), no tempo de retenção 3,86 min



Após dois testes de reações sob as condições anteriores, substituiu-se a forma de aquecimento de refluxo para micro-ondas, com isso realizou-se uma reação nas mesmas proporções e na mesma grandeza da anteriormente citada, porém com aquecimento por micro-ondas. Alíquotas foram retiradas a cada 30 em 30 minutos por um período de 3 horas e extraídas com acetato de etila, afim de monitorar o tempo reacional necessário para o consumo do material de partida e monitorar a formação do produto de interesse. As análises foram realizadas em LC-MS analítico e resultaram nos cromatogramas da **Figura 9**:

Figura 9. Cromatogramas DAD (240-700 nm) obtidos de 30 em 30 minutos da reação 3,5,8-TMON e isoniazida, sob refluxo em ácido acético. T1-T6 de baixo para cima, sendo T1= 30 min amostra LC01A Hidrolisado Reacao com micro ondas T1



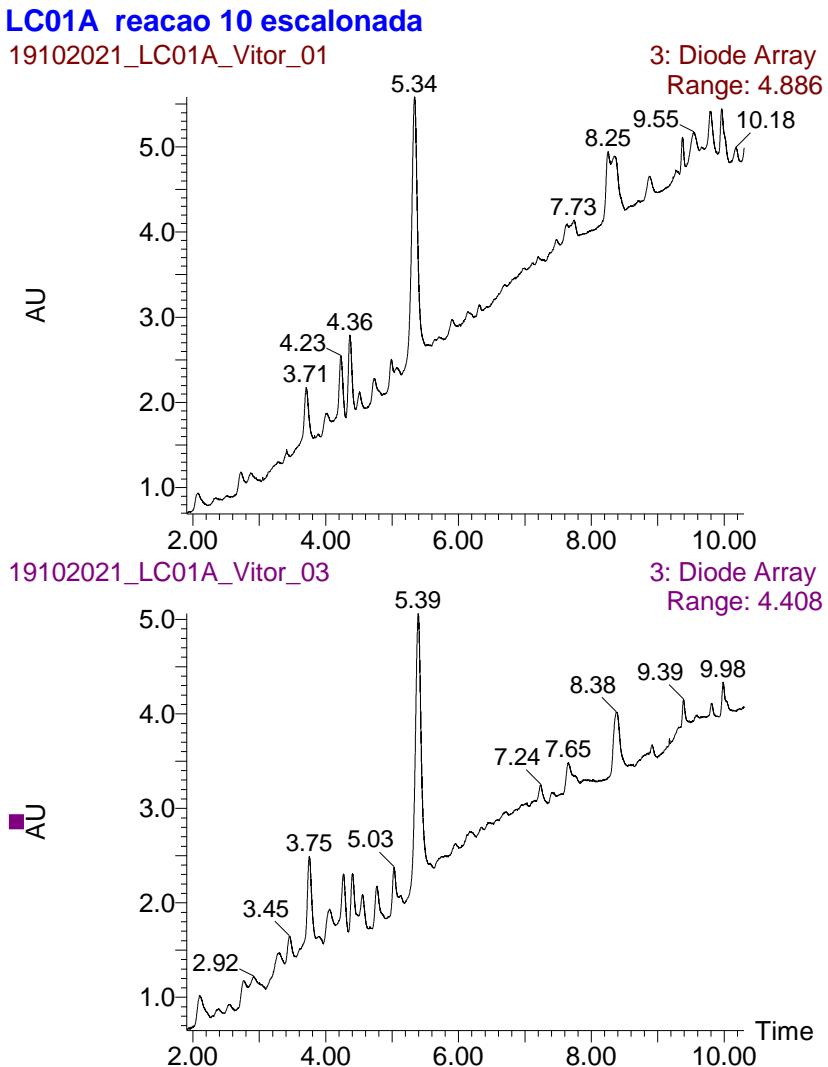
Após a avaliação destes cromatogramas, podemos observar a ausência do material de partida até o tempo de 1 hora, o que determina um novo tempo reacional para a reação empregando micro-ondas.

Após tentativas com a metodologia anteriormente citada, seguiu-se a metodologia utilizada por Dandawate (2012), porém com algumas alterações como a utilização de micro-ondas. A reação foi conduzida com as mesmas proporções e grandezas das primeiras reações (50 mg de 3,5,8-TMON e 26,2 mg de isoniazida) porém nesta metodologia o solvente utilizado fora o metanol, juntamente com ácido trifluoracético como catalisador.³⁴ O meio reacional foi submetido ao aquecimento no micro-ondas por uma hora. Após o tempo reacional, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico e secou-se sob pressão reduzida. A reação foi suspensa com

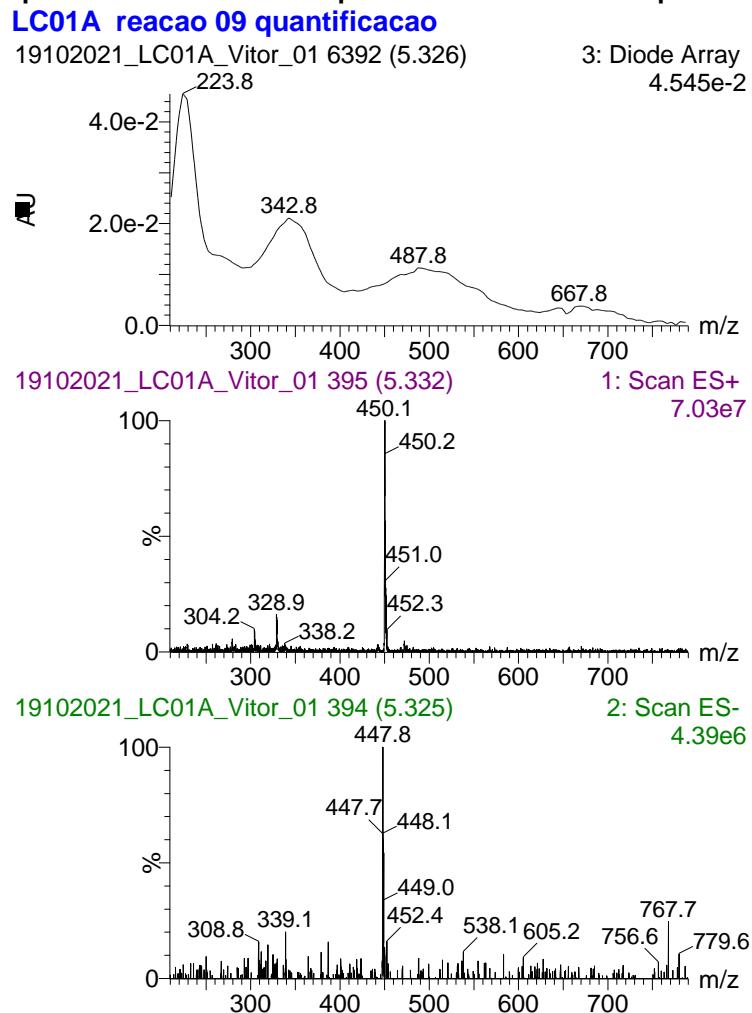
acetona e analisada em LC-MS. Após análise, a reação foi repetida, porém com o dobro de material, desta vez com 100 mg de 3,5,8-TMON e 52,4 mg de isoniazida.

As análises de ambas as reações, a que utilizou 50 mg de material de partida e a que utilizou 100 mg de material de partida resultaram nos seguintes cromatogramas (**Figura 10**):

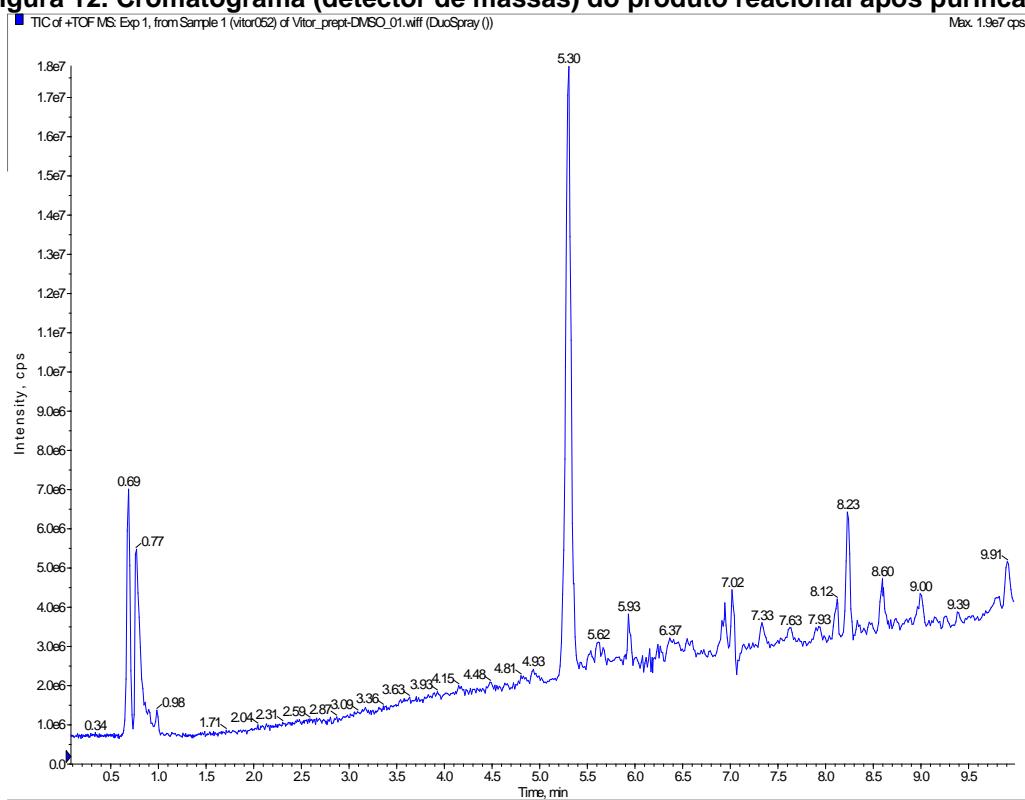
Figura 10. Cromatogramas DAD (240-700 nm) obtidos da reação de 3,5,8-TMON com isoniazida, em micro-ondas com Metanol e TFA



Nota-se que em ambas as proporções os cromatogramas são semelhantes, já que a diluição utilizada para injeção foi a mesma. É possível observar que houve consumo total do material de partida e que há majoritariamente o produto de interesse, o qual foi atribuído a partir dos picos $[M+H]^+$ de m/z 450 e $[M-H]^-$ m/z 448, o que corresponde a uma massa molecular de 449 u (**Figura 11**). É possível observar a alteração no tempo de retenção do produto de 3,86 minutos, na metodologia de Reis (2019), para 5,34 minutos na metodologia de Dandawate (2012).

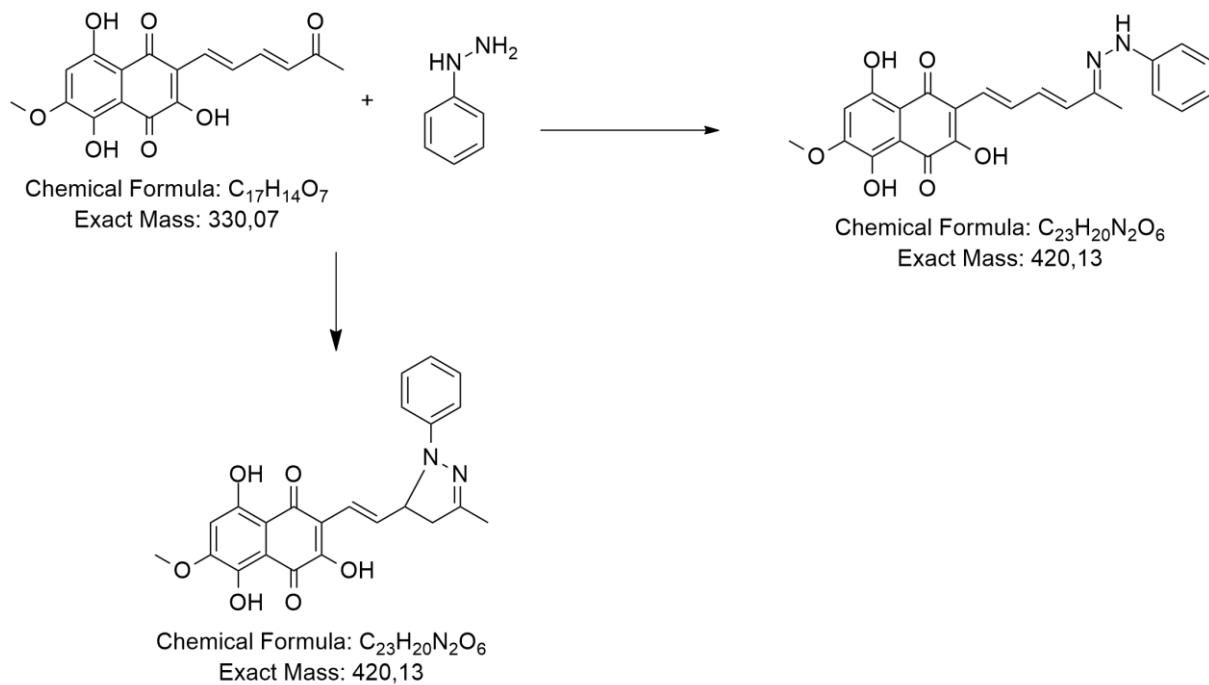
Figura 11. Espectros UV e massas do produto reacional no tempo de retenção 5,34

Apesar do produto de interesse estar em maior quantidade na mistura reacional, fez-se necessária o desenvolvimento de um método de purificação. Devido à sua baixa solubilidade nos solventes testados e à alta solubilidade das impurezas em acetona. O sólido obtido foi submetido a sucessivas lavagens com acetona por, a fim de retirar tais impurezas. Após uma série de lavagens o produto foi purificado como é possível observar no cromatograma obtido pela análise em espectrômetro de massas de alta resolução, mostrado a seguir.

Figura 12. Cromatograma (detector de massas) do produto reacional após purificação

Após a observação das análises realizadas, pode-se inferir que para reações entre o 3,5,8-TMON e a Isoniazida as melhores condições encontradas envolvem a utilização de *MeOH* como solvente e TFA como catalisador, sendo o meio reacional aquecido por micro-ondas.

5.2.2. Reação com fenilhidrazina



Esquema 8. Possíveis reações de 3,5,8-TMON com fenilhidrazina

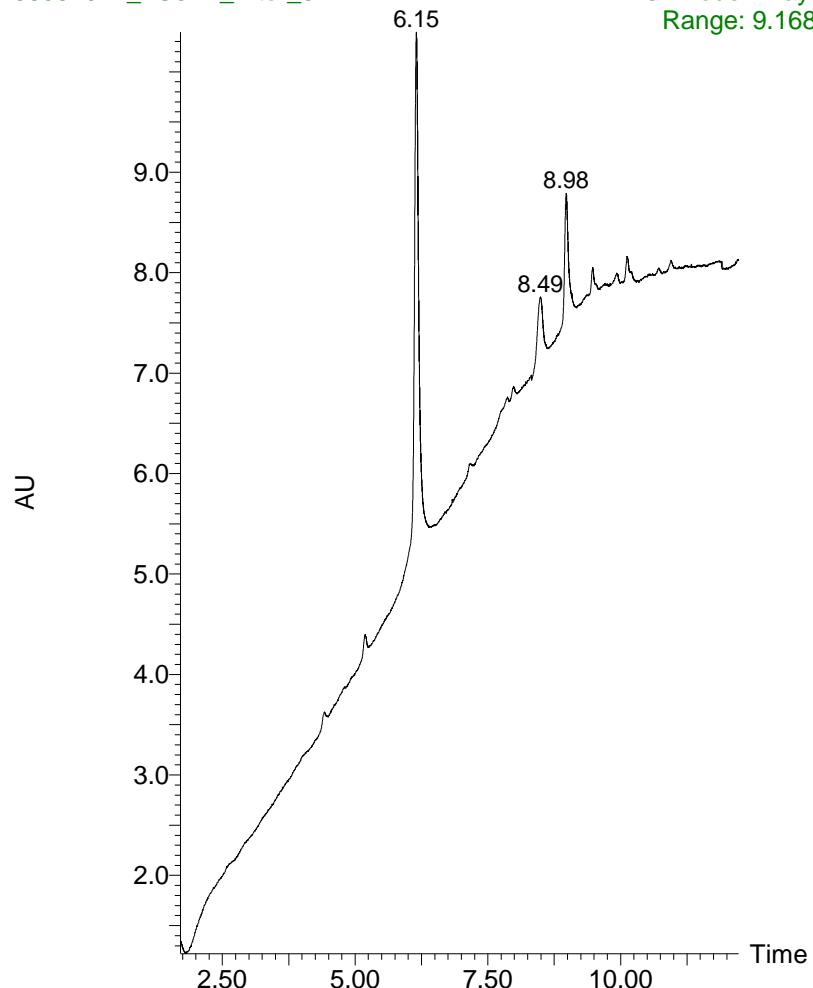
Por possuir uma estrutura que permite a realização de ataques nucleofílicos, além de possuir um anel aromático, a fenilhidrazina se mostrou uma molécula interessante para reações com o 3,5,8-TMON (**Esquema 8**). Para esta reação, seguiu-se a metodologia utilizada por Carvalho (2002), com algumas modificações. Realizou-se a reação com 50 mg (0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e 28,5 mg (0,197 mmol) de fenilhidrazina, solubilizados em metanol. Não foi adicionado catalisador e a reação foi deixada 24 horas à temperatura ambiente e, após esse tempo, foi retirada uma alíquota e analisada em LC-MS (**Figura 13**).

Figura 13. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido após 24 horas da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina em temperatura ambiente

LC01A Reacao 05 T2 (24h)

06082021_LC01A_Vitor_01

**3: Diode Array
Range: 9.168**



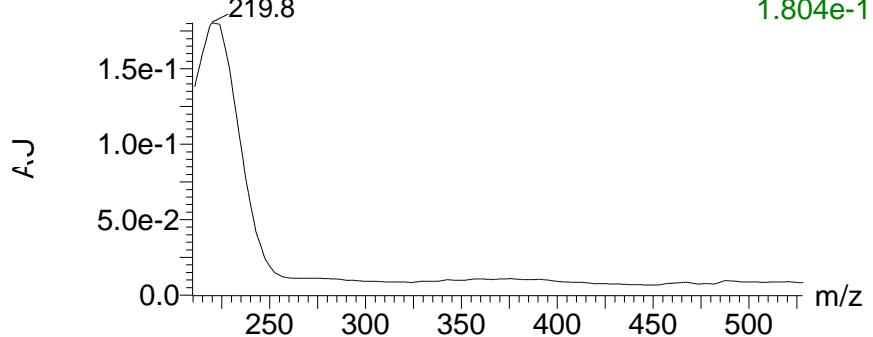
É possível observar a presença de grande quantidade de material de partida, além da formação de um possível produto de interesse no tempo de retenção 8,97 minutos, o qual possui picos $[M+H]^+$ de m/z 421 e $[M-H]^-$ de m/z 419, o que corresponde a uma massa molecular esperada de 420 u (Figura 14).

Figura 14. Espectros UV e massas do produto obtido após 24 horas de reação**LC01A Reacao 05 T2 (24h)**

06082021_LC01A_Vitor_01 10772 (8.977)

3: Diode Array

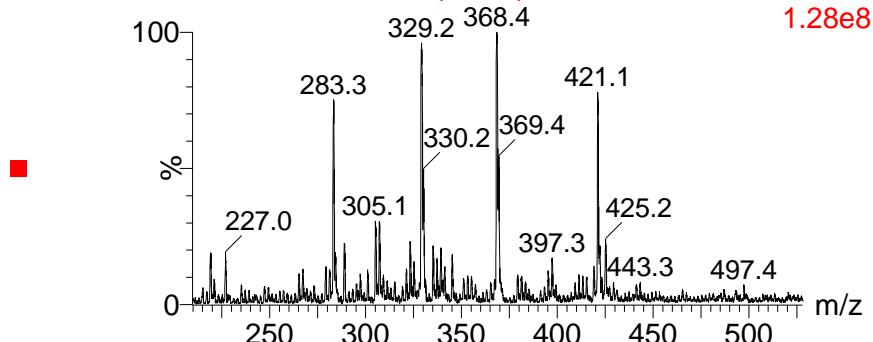
1.804e-1



06082021_LC01A_Vitor_01 669 (9.034)

1: Scan ES+

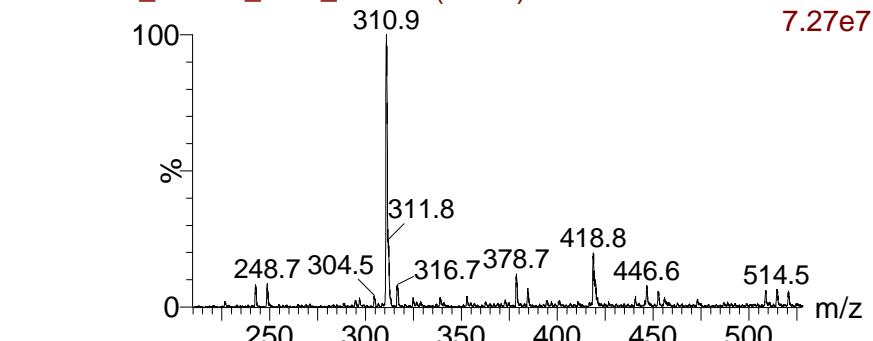
1.28e8



06082021_LC01A_Vitor_01 666 (9.000)

2: Scan ES-

7.27e7



Após a análise, por conta da presença de material de partida, o meio reacional foi aquecido em banho de óleo, para acelerar a reação, e após uma hora foi retirada uma alíquota e analisada por LC-MS.

O cromatograma após o aquecimento, é possível observar que houve o consumo do material de partida, bem como a formação de um novo produto de massa igual ao produto de interesse, no tempo de retenção 7,80 minutos (**Figuras 15 e 16**).

Figura 15. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido após o aquecimento do meio reacional da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina

LC01A Reacão 05 T3 (29h) aquecimento 50C

06082021_LC01A_Vitor_02

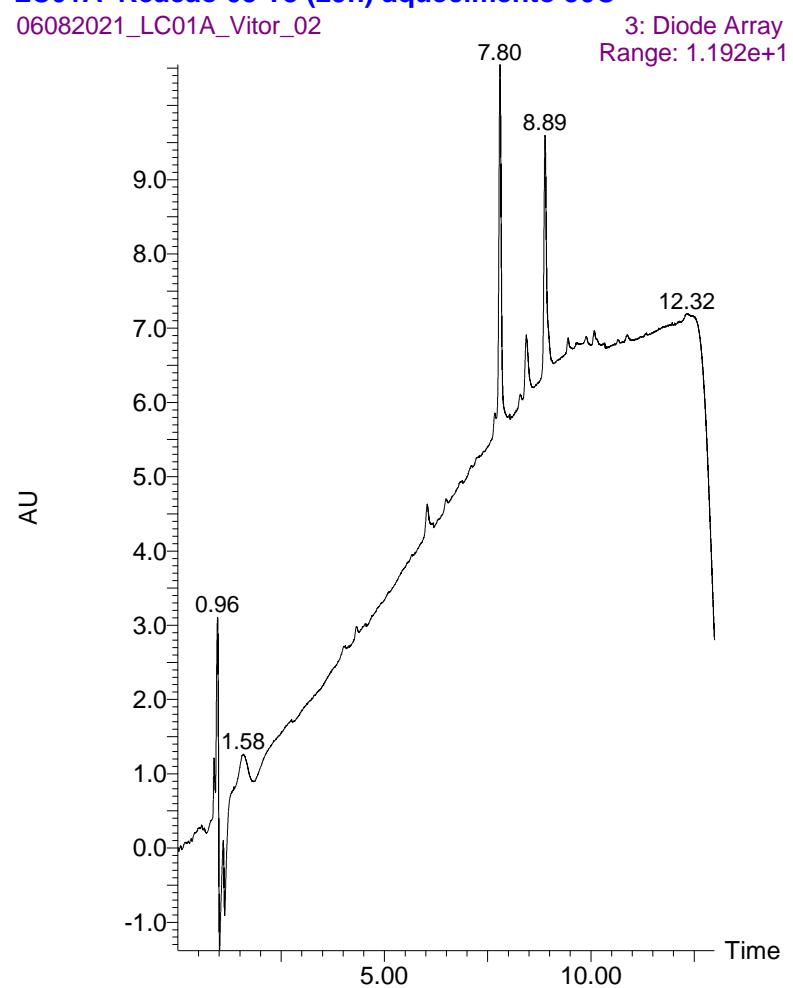


Figura 16. Espectros UV e massas do produto formado após o aquecimento**LC01A Reacao 05 T3 (29h) aquecimento 50C**

06082021_LC01A_Vitor_02 9387 (7.822)

3: Diode Array

1.52e-1

219.8

1.5e-1

1.0e-1

5.0e-2

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

0.0

Figura 17. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido após um longo período de tempo do término da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina na primeira condição.

LC01A amostra R05 Depois da secagem

10032022_LC01A_Vitor_04

3: Diode Array

8.16 Range: 2.27e+1

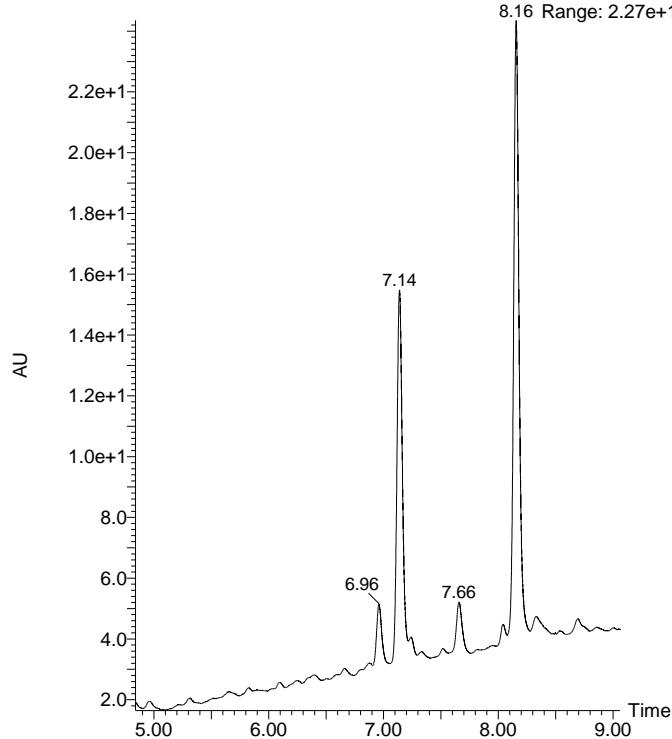
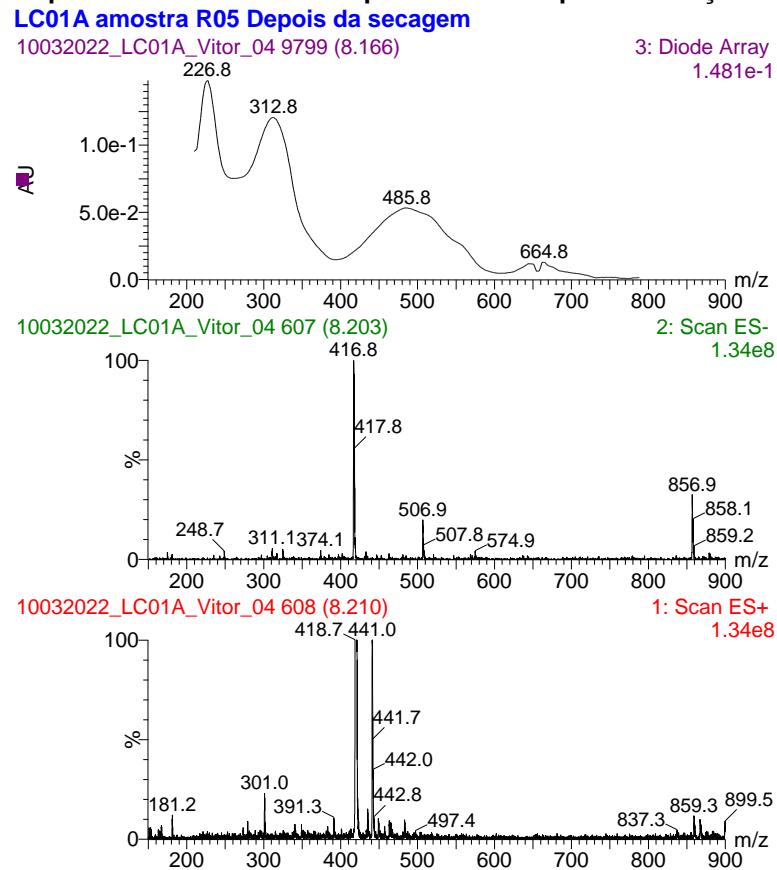
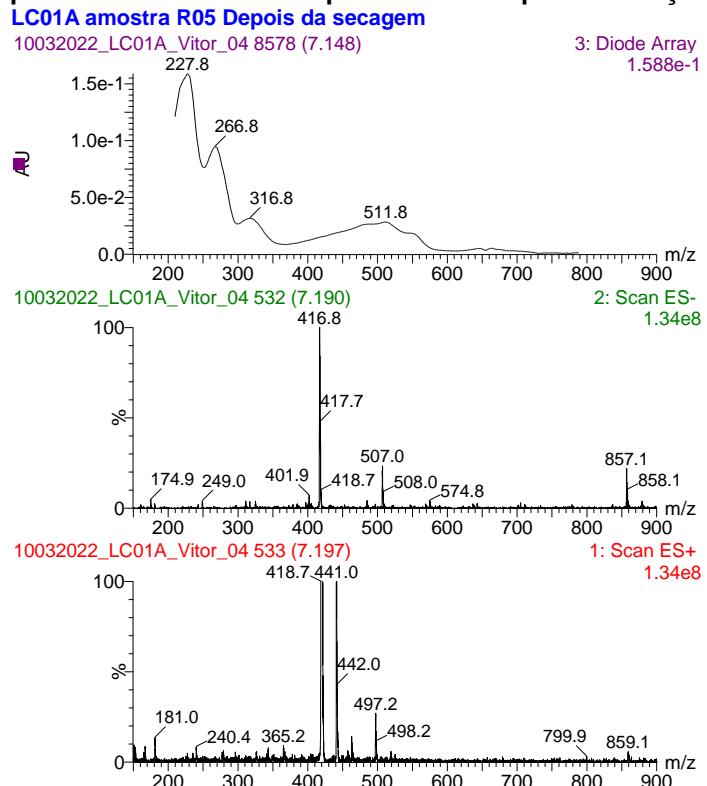


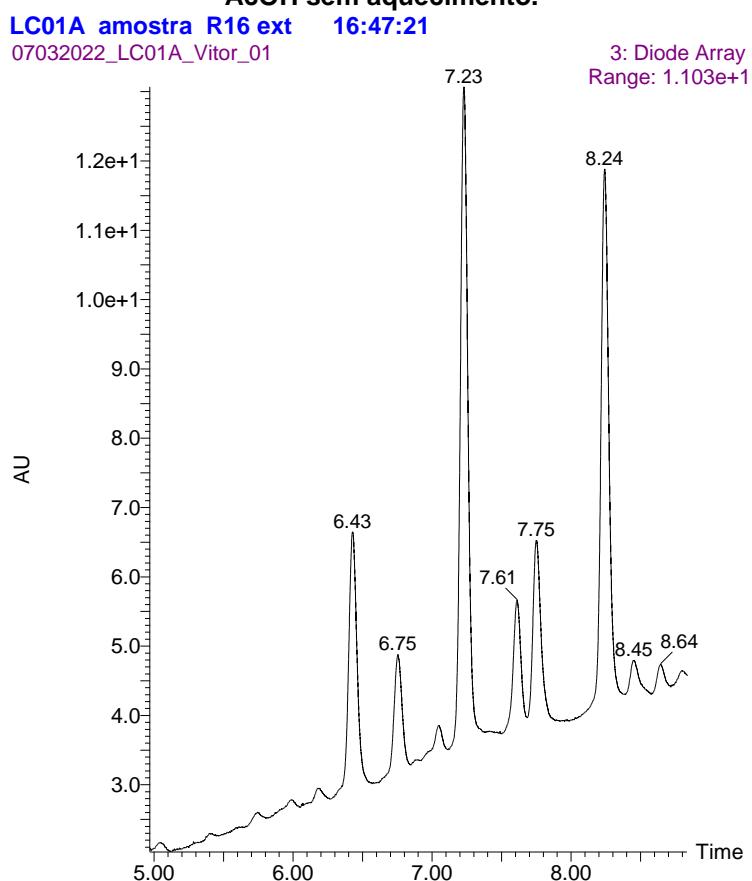
Figura 18. Espectros UV e massas do produto no tempo de retenção de 8,16 min.**Figura 19. Espectros UV e massas do produto no tempo de retenção de 7,14 min.**

Nota-se a formação de dois produtos, um com tempo de retenção 7,14 min e outro 8,16 min. Em ambos os tempos de retenção os produtos apresentam os mesmos

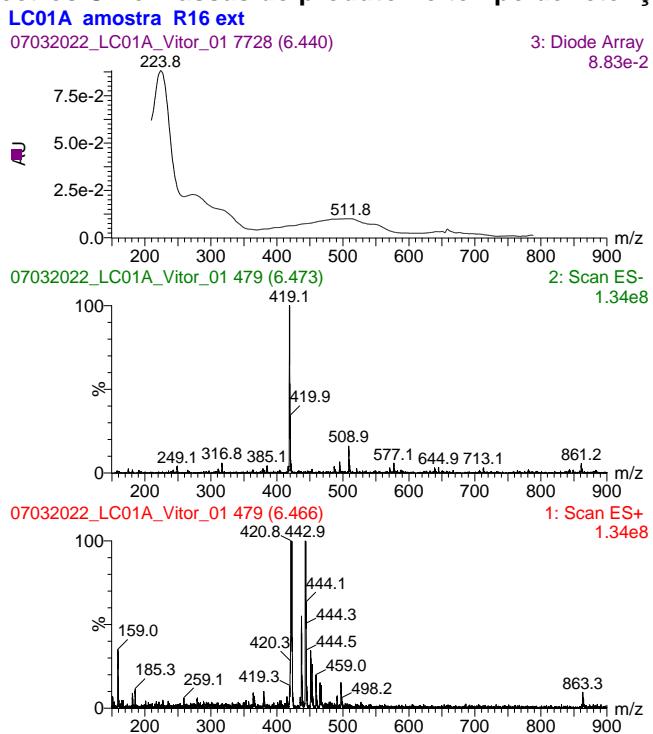
picos de relação massa/carga: $[M+H]^+$ de m/z 419 e $[M-H]^-$ de m/z 417. Com isso, os produtos formados podem ser considerados com massa de 418 u, ou seja, duas unidades de massa a menos do que os produtos anteriormente formados.

A partir disto, realizaram-se outros testes para gerar os produtos observados, sendo o primeiro deles realizando a troca do meio reacional, que continha metanol, para um meio com ácido acético, afim de testar a formação dos produtos considerando meio ácido. Observou-se, então, a formação de uma mistura de produtos, na qual observa-se a presença de três daqueles citados anteriormente como se ve na **figura 20**.

Figura 20. Cromatograma DAD (240-700 nm) da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina em AcOH sem aquecimento.



Os produtos observados nos tempos de retenção 7,23 min e 8,24 min são os mesmos produtos, de massa 418 u, já citados bem como o produto no tempo de retenção 7,75 min, o qual possui massa de 420 u. O produto presente no tempo de retenção 6,43 min possui picos de relação massa/carga: $[M+H]^+$ de m/z 421 e $[M-H]^-$ de m/z = 419, como pode ser observado na **Figura 21**. Outros picos presentes no espectro representam subprodutos reacionais com massas distantes das esperadas para os produtos de interesse.

Figura 21. Espectros UV e massas do produto no tempo de retenção de 6,44 min.

Após os resultados obtidos, decidiu-se por verificar o comportamento da reação sob aquecimento, utilizando-se de meio ácido juntamente do aquecimento com banho de óleo e, posteriormente, com micro-ondas. As diferentes fontes de aquecimento podem fornecer informações interessantes sobre o comportamento das moléculas formadas, existindo ainda um possível efeito não térmico da radiação de micro-ondas – efeitos, sem relação com a forma de aquecimento, gerados pela radiação eletromagnética no meio reacional, que podem mudar os produtos formados, bem como suas proporções.⁴⁰ O preparo da reação seguiu as mesmas proporções, sendo 50 mg (0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e 28,5 mg (0,197 mmol) de fenilhidrazina, solubilizados em ácido acético. Ambas as reações foram aquecidas, cada uma por um método, por um período de uma hora. Observa-se na **Figura 22** os produtos formados durante a reação com aquecimento em banho de óleo, enquanto o cromatograma obtido através da reação com aquecimento por micro-ondas está na **Figura 23**.

Figura 22. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina em AcOH e refluxo em bancada

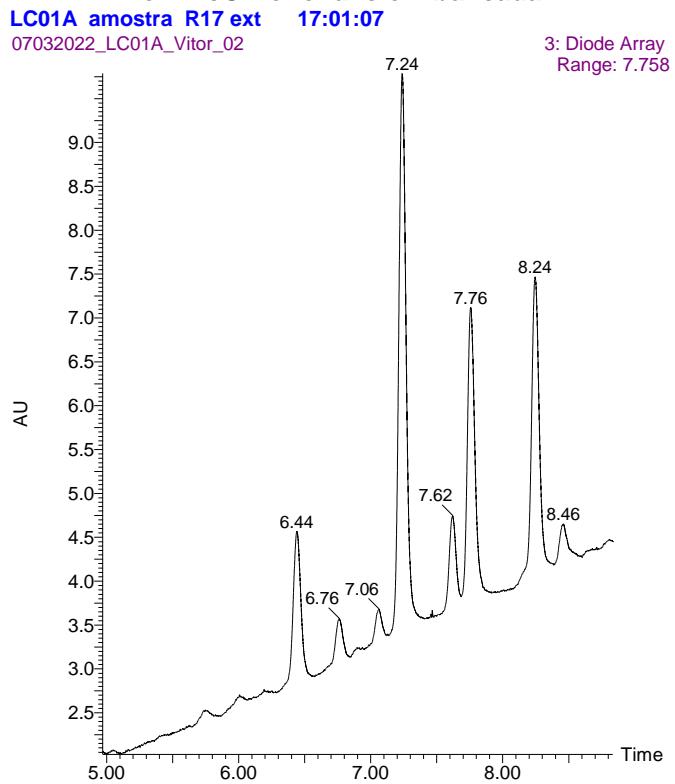
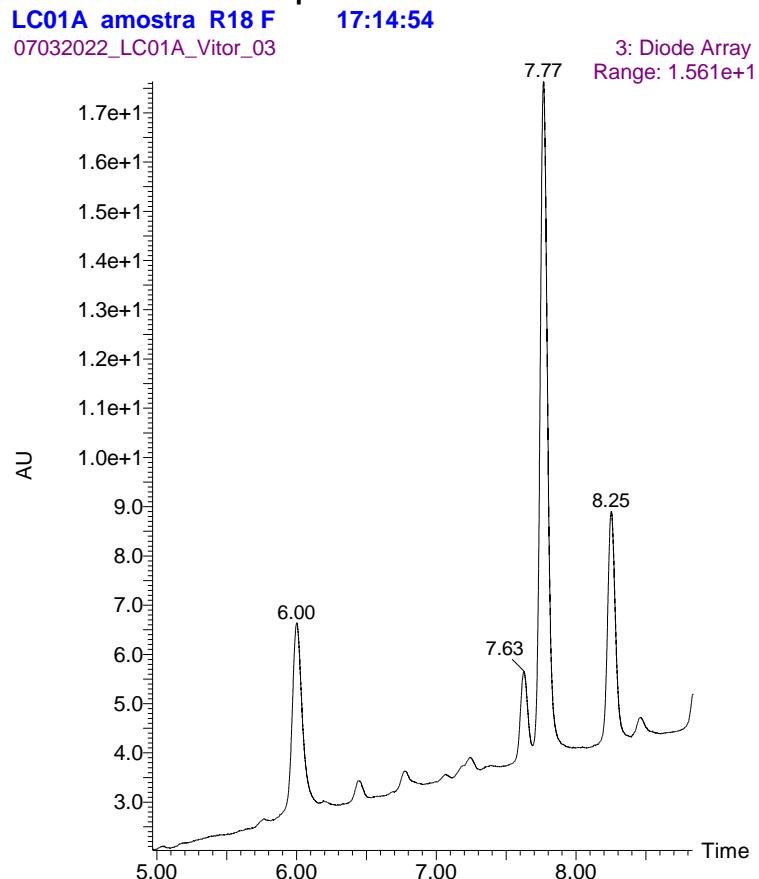


Figura 23. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina em AcOH e aquecimento em micro-ondas



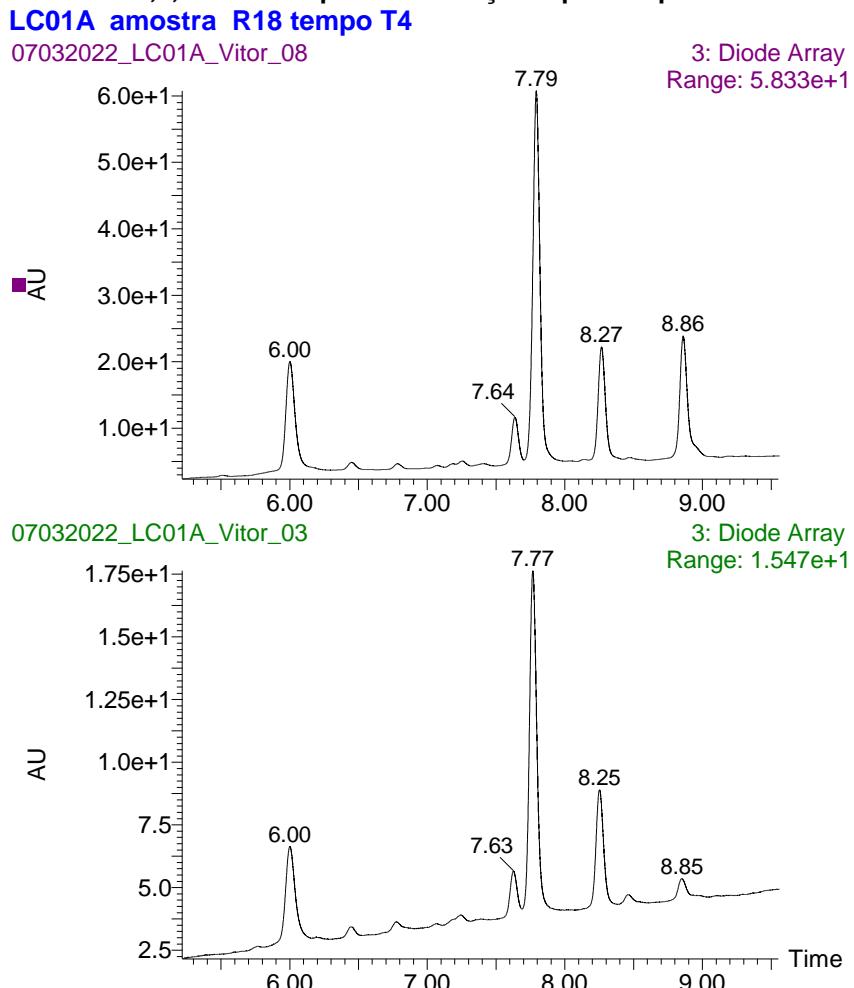
Comparando os cromatogramas das reações dos métodos de aquecimento diferentes, observa-se que as proporções dos produtos formados são diferentes, sendo que no aquecimento de bancada a mistura de produtos formada é semelhante à reação sem aquecimento, ao passo que o cromatograma da reação aquecida por micro-ondas fornece apenas dois dos produtos principais observados nas condições anteriores, com maior proporção do produto de massa 420 u, em tempo de retenção 7,77 min. Além disso, é possível observar que na reação com aquecimento em micro-ondas há a presença de material de partida, ao passo que na reação com refluxo a reação foi finalizada mais rápido. Essa diferença na composição dos produtos pode ser um indício de um efeito não térmico relacionado ao micro-ondas, já que o produto majoritário formado na reação por tal método de aquecimento é diferente do produto formado na reação em refluxo. No entanto, com citado na literatura, este pode ser um caso de erro na leitura da temperatura de reação no reator, sendo então razão de um efeito térmico.⁴⁰

Por fim, realizou-se a reação com o solvente original, metanol, e aquecimento por micro-ondas, afim de observar uma possível formação dos produtos inicialmente formados. A reação apresentou a formação de um produto de massa 420 u, bem como pequenas quantidades de outros subprodutos reacionais, como no tempo de retenção 8,25 min, no entanto, considerando a quantidade de material de partida presente, esta condição não fora considerada para a purificação via corrida de HPLC preparativa.

É possível observar, a partir das análises dos cromatogramas que as diferentes condições de reação alteram as proporções de produtos formados, podendo, assim, haver relação da formação destes produtos com a forma de aquecimento do meio reacional, bem como a sua constituição estrutural.

Outro ponto de atenção é que, nos casos das reações conduzidas na presença de ácido, após a extração ocorre uma mudança nas proporções dos produtos de massa 420 e 418, como no exemplo da **Figura 24**, podendo indicar a conversão durante o processo de extração, dos produtos de massa 420 nos produtos de massa 418.

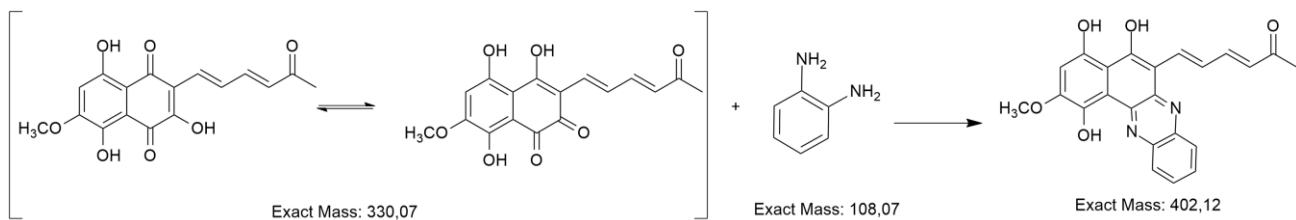
Figura 24. Superior: Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON antes da extração líquido-líquido/ Inferior: Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON depois da extração líquido-líquido.



Observando o cromatograma acima, o qual corresponde à reação de 3,5,8-TMON com a fenilhidrazina em AcOH e aquecimento via micro-ondas, nota-se que ao término da reação há a presença de três produtos principais nos tempos de retenção 7,77 min, 8,27 min e 8,86 min, além do material de partida em 6,00 minutos. Após o procedimento de extração, nota-se que o produto no tempo 8,86 min reduziu o seu tamanho quando comparado aos outros, ao passo que há um leve aumento no produto em 8,25 min. Este fenômeno ocorre para todos os três métodos que empregam ácido acético, o que pode evidenciar a transformação dos produtos de massa 420 u, em produtos de massa 418 u.

Analizando estes resultados, pode-se inferir que a molécula de 3,5,8-TMON apresenta uma reatividade interessante frente à fenilhidrazina, sendo possível observar a formação de diversos produtos sendo, sendo possível a presença de isômeros na mistura final.

5.2.3. Reação com *o*-fenilenodiamina



Esquema 9

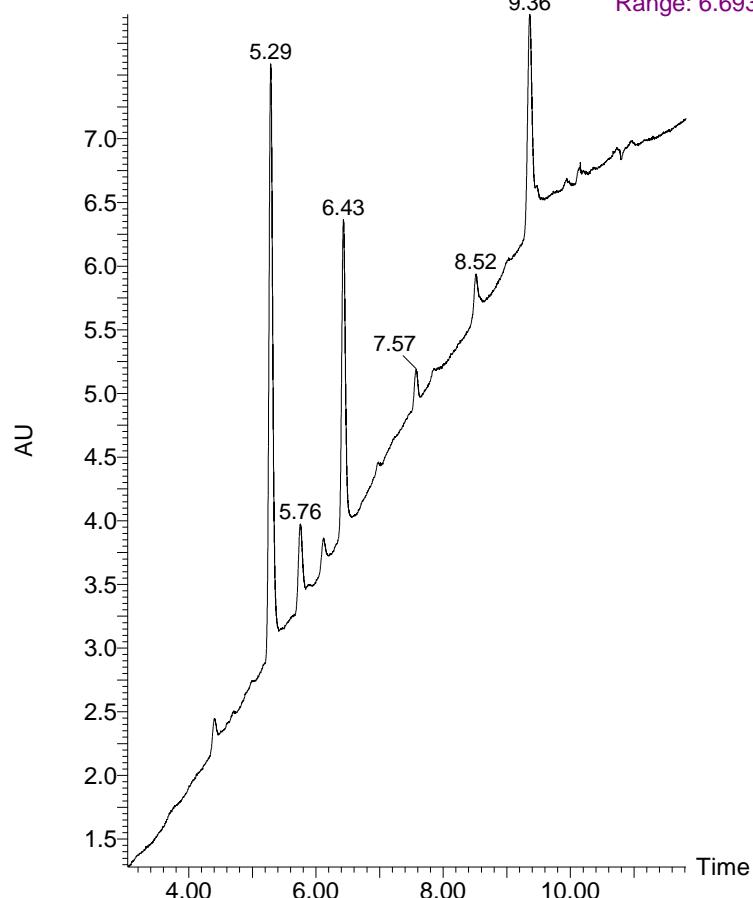
Para a reação do material de partida com a *o*-fenilenodiamina (**Esquema 9**) fora utilizada a metodologia descrita por Silva (2011), com pequenas mudanças, como na ausência de Acetato de sódio e na alteração da naftoquinona modificada. As condições utilizadas envolviam 50 mg (0,151 mmol) de 3,5,8-TMON e 17,96 mg (0,166 mmol) de *o*-fenilenodiamina. A reação foi realizada empregando ácido acético como solvente reacional sob refluxo.³¹ Após aproximadamente duas horas de reação desligou-se o refluxo e realizou-se extração líquido-líquido com acetato de etila. Ocorreu boa separação de fases. A fase orgânica foi seca sob pressão reduzida e ressuspensão em metanol HPLC para análise em LC-MS, o que resultou no seguinte cromatograma (**Figura 25**):

Figura 25. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON e o-fenilenodiamina

LC01A Reacao 06 T4 16:47:49

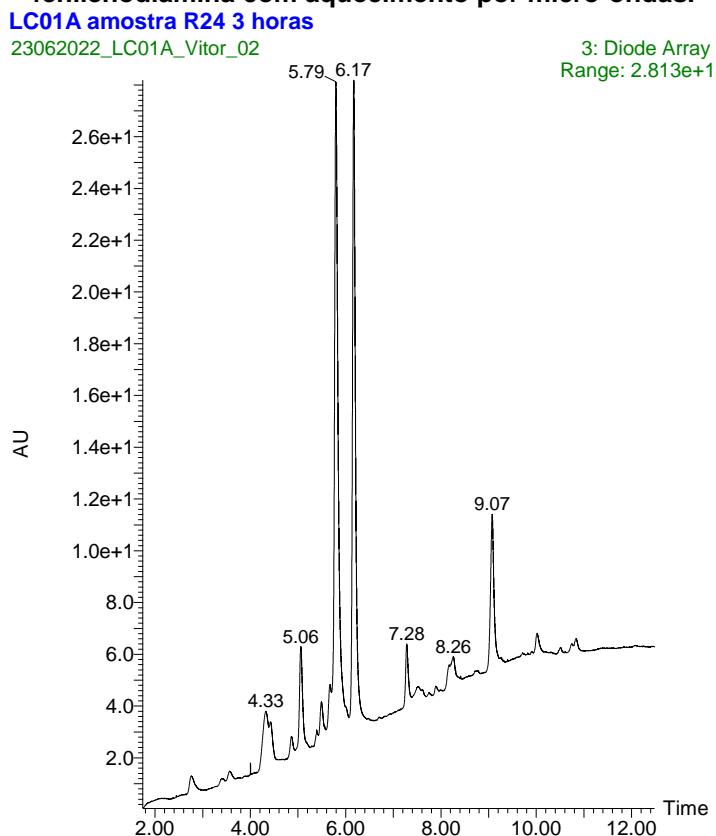
05082021_LC01A_Vitor_05

3: Diode Array
Range: 6.693



No cromatograma não é possível observar a presença do material de partida. No entanto, não foi observado nenhum íon com a massa molecular correspondente à massa molecular do produto de interesse, levando-se a acreditar que não ocorreu formação do produto esperado nestas condições. Foram testadas variações na proporção dos reagentes e, inclusive, submeteu-se a reação ao aquecimento via micro-ondas, porém os resultados obtidos foram os mesmos, como pode-se observar no exemplo a seguir (Figura 26) a qual representa a reação realizada com aquecimento via micro-ondas.

Figura 26. Cromatograma DAD (240-700 nm) obtido da reação entre 3,5,8-TMON e o-fenilenodiamina com aquecimento por micro-ondas.



Com isso, podemos dizer que o 3,5,8-TMON não apresentou a formação do produto esperado em sua reação frente à o-fenilenodiamina para a formação de um composto com anel heterocíclico fundido com o anel naftoquinona.

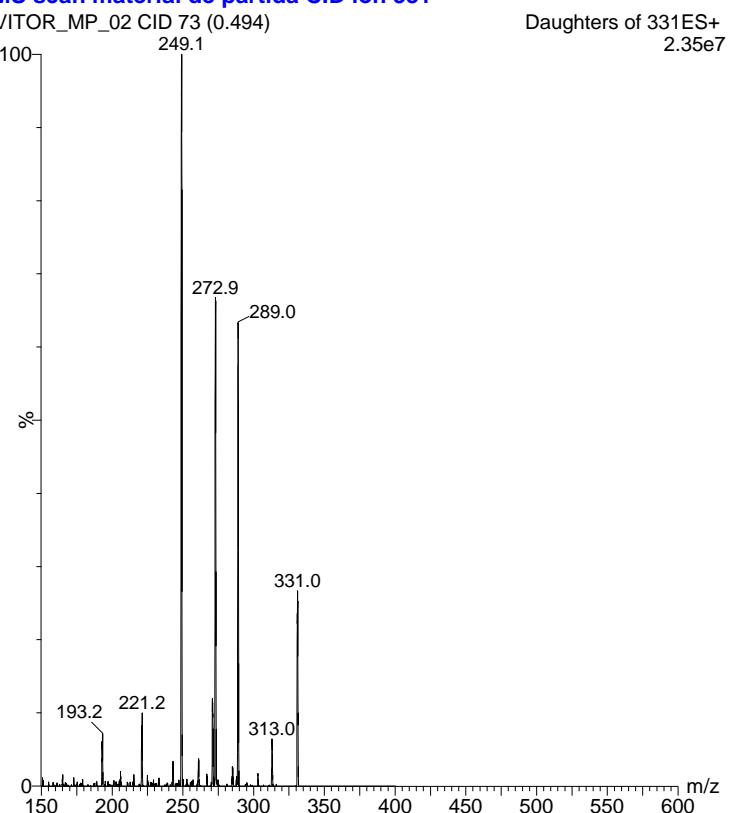
5.3. Caracterização estrutural

5.3.1. Material de partida 3,5,8-TMON

Após os procedimentos de obtenção do material de partida, submeteu-se o produto final foi a análises para confirmar a sua estrutura e, também, para que fosse possível uma comparação das análises após as modificações estruturais.

Primeiramente, utilizando-se de um espectrômetro de massas de alta resolução (**Figura A 1**) foi obtido um sinal de m/z 331, correspondente à formula molecular do composto era $C_{17}H_{14}O_7$, com uma massa de 330,0740 u, com erro de 3,9385 ppm. Prosseguiu-se com um estudo de fragmentação afim de avaliar os padrões de fragmentos gerados, utilizando ionização por eletrospray e fragmentação induzida por colisão. Com isso, foi gerado o seguinte espectro de fragmentação:

Figura 27. Espectro de fragmentação de 3,5,8-TMON
MS scan material de partida CID ion 331



É possível observar que os principais fragmentos obtidos são: $[M+H]^+$ de m/z 289, $[M+H]^+$ de m/z 273 e $[M+H]^+$ de m/z 249. Os íons que representam tais picos, juntamente com os seus mecanismos de formação são:

Figura 28. Proposta de fragmentação do íon de M/z 273 proveniente da molécula protonada.

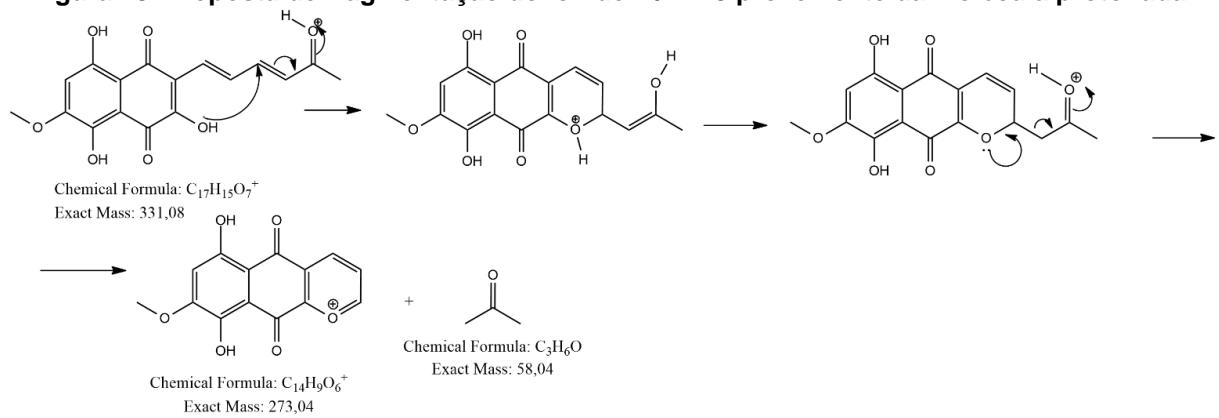
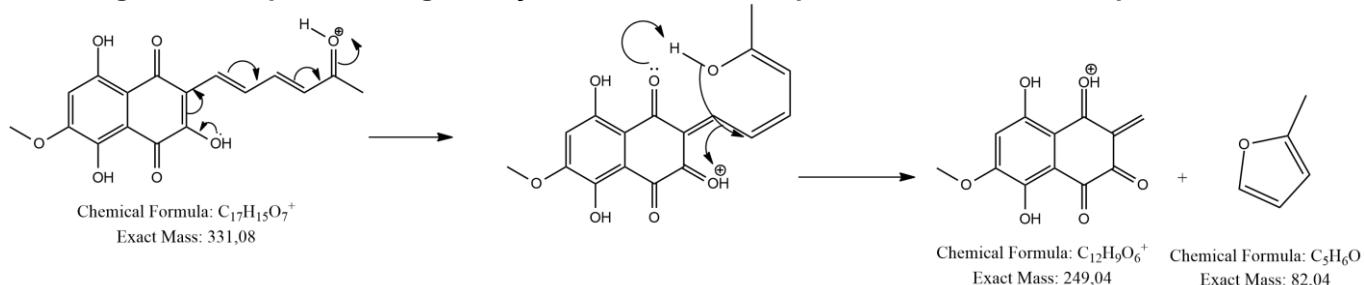
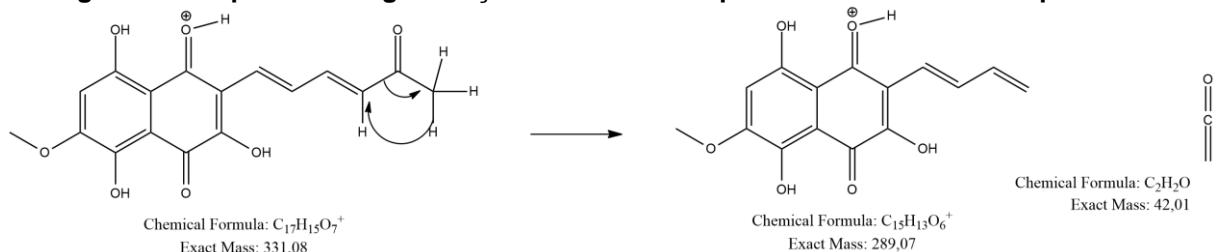
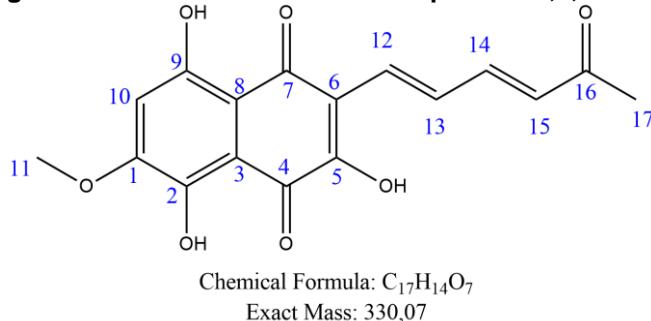


Figura 29. Proposta de fragmentação do íon de M/z 249 proveniente da molécula protonada**Figura 30. Proposta de fragmentação do íon M/z 289 proveniente da molécula protonada**

Com isso, percebe-se que a fragmentação do material de partida ocorre principalmente na cadeia lateral insaturada, mantendo-se a estrutura do anel naftoquinona intacto para estas fragmentações.

Complementando essas análises, foram realizadas análises de RMN utilizando DMSO-d₆ como solvente. Os dados foram adquiridos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 400 MHz. Foram realizados os seguintes experimentos: ¹H, ¹³C, DEPTQ, COSY, HMQC e HMBC. Todos os espectros encontram-se em Anexo. A partir dos experimentos, é possível atribuir a seguinte estrutura, a qual está em concordância com a literatura³⁶:

Figura 31. Estrutura do material de partida. 3,5,8-TMON

As correlações entre os átomos de hidrogênio encontram-se na **Tabela 1**, onde é possível observar as atribuições de cada pico presente no espectro de Hidrogênio (**Figura A 2**).

Tabela 1. Correlações entre ^{13}C e ^1H na molécula de 3,5,8-TMON

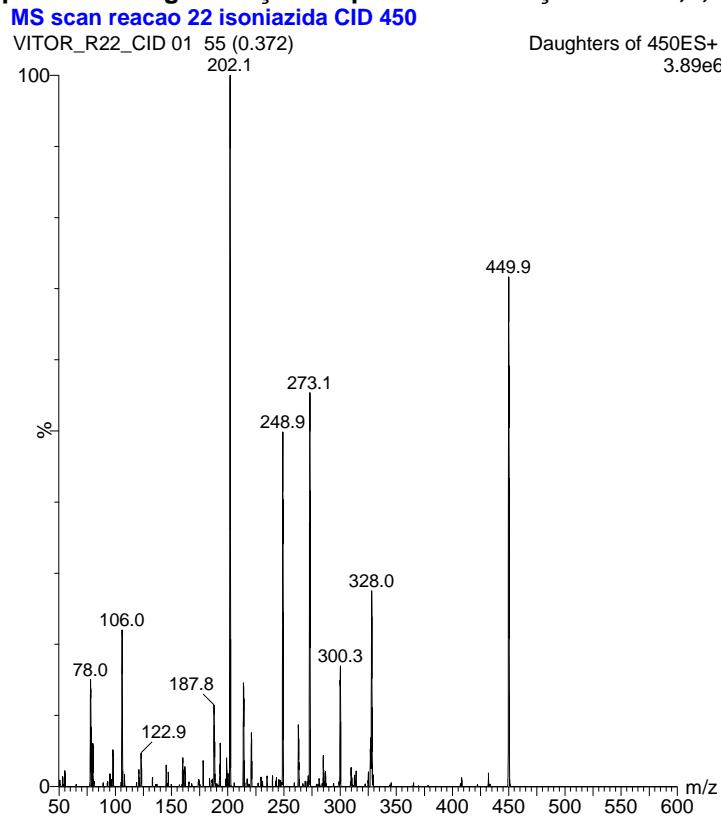
Posição	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	I
C11	3,88 (s)	-	3
C10	6,79 (s)	-	1
C12	7,28 (d)	15,4	1
C13	7,65 (dd)	15,4; 11,2	1
C14	7,38 (dd)	15,4; 11,3	1
C15	6,07 (d)	15,4	1
C17	2,25 (s)	-	3
C2-OH	14,41 (s)	-	1
C12-OH	12,50 (s)	-	1

É possível observar dupletos e duplo-dupletos com altas constantes de acoplamento, indicando a conformação trans nos sistemas de suplas ligações conjugadas da molécula. É possível também observar o efeito da carbonila, desblindando consideravelmente os hidrogênios que estão nas suas proximidades. O hidrogênio enólico não pode ser observado no espectro, provavelmente por sua capacidade de trocar de posição com o solvente.

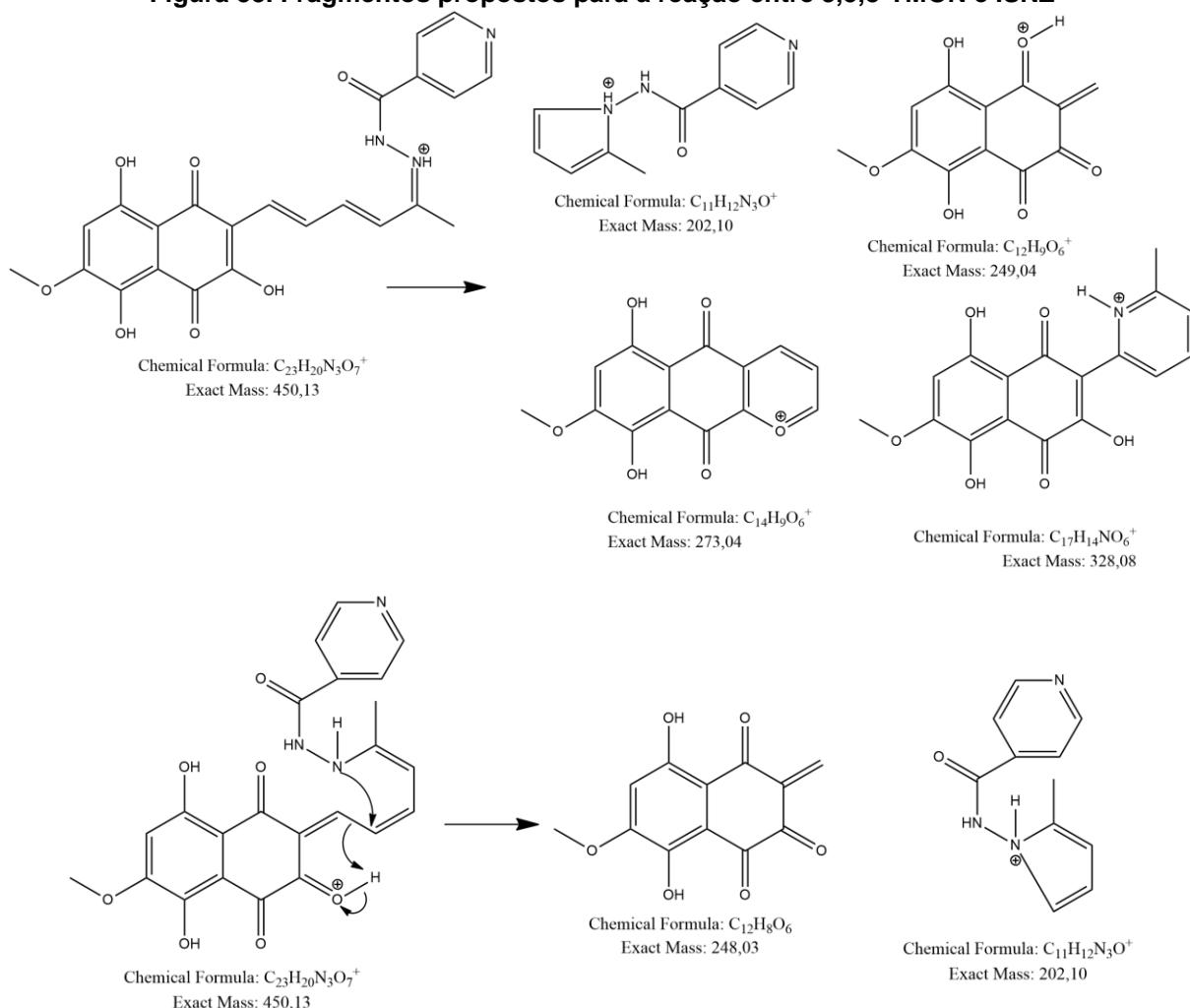
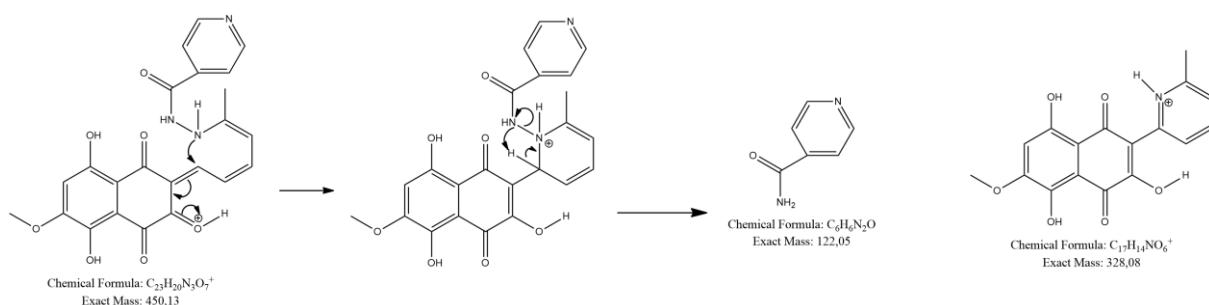
5.3.2. Reação com Isoniazida

O produto da reação com a isoniazida apresentou baixíssima solubilidade em solventes orgânicos convencionais, sendo possível trabalhar apenas com o auxílio de DMSO. Com isso, analisou-se a molécula em um espectrômetro de massas de alta resolução (**Figura A 8**) o qual produziu o íon de m/z 450, correspondente à formula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$ e massa de 449,1223 u, com erro de 5,3438 ppm.

Realizou-se um estudo de fragmentação, com o objetivo de compreender melhor a estrutura formada e avaliar em qual das carbonilas teria sofrido um ataque nucleofílico. Além de outras possíveis alterações estruturais que pudessem vir a aparecer. Observando o espectro de fragmentação da molécula, é possível notar 4 fragmentos principais, com m/z iguais a 328, 273, 249 e 202.

Figura 32. Espectro de fragmentação do produto da reação entre 3,5,9-TMON e ISNZ

Os fragmentos propostos estão apresentados **Figura 33**. Nota-se a repetição dos padrões de fragmentação do material de partida, para a maioria dos fragmentos, com o núcleo naftoquinona intacta. Há também a presença de um fragmento que provém de um mecanismo semelhante de fragmentação, porém o cátion formado esta na parte da cadeia lateral. Os fragmentos novos tiveram seus mecanismos de fragmentação propostos nos **esquemas 10 e 11**, mostrados a seguir:

Figura 33. Fragmentos propostos para a reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ**Esquema 10. Proposta de fragmentação do íon $m/z = 202$ proveniente da molécula protonada****Esquema 11. Proposta de fragmentação do íon $m/z = 328$ proveniente da molécula protonada**

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando DMSO-d₆ e foram adquiridos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear com campo de 600 MHz. Foram realizados os seguintes experimentos: ¹H, HMBC, HMQC, NOESY e TOCSY.

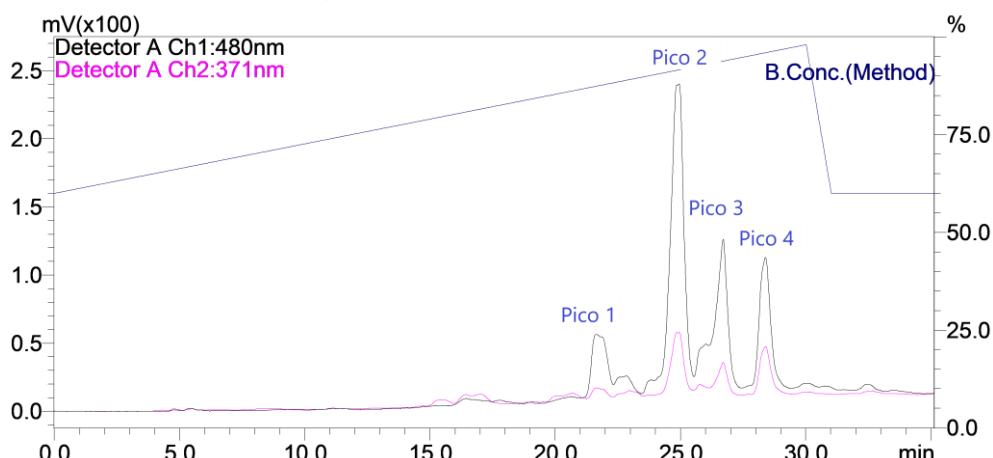
Por conta da baixa solubilidade da molécula formada, apenas DMSO foi capaz de dissolvê-la. Por ser um solvente que possui um alto teor de água, acredita-se, pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (**em anexo**), que a molécula

formada tenha sofrido processo de hidrólise com o solvente utilizado, fazendo com que na análise de RMN aparecessem diversos picos duplicados, bem como um acoplamento a longa distância dos hidrogênios da metila ($\delta = 2,26$ ppm) com um carbono com deslocamento de 200 ppm, referente a uma carbonila. Este resultado é inconsistente com os dados obtidos pelo espectro de fragmentação, o qual indica a formação de um produto com a massa esperada e com fragmentações que indicam que a reação ocorreu na cadeia lateral.

5.3.3. Reação com a fenilhidrazina

Os produtos produzidos pelas reações de 3,5,8-TMON posuem em comum o fato de ficarem adsorvidos na sílica, o que impede a realização de cromatografia de camada delgada ou até mesmo a realização de coluna sílica, dificultando a purificação destes produtos. Com isso, desenvolveu-se um método cromatográfico em HPLC, com a finalidade de obter produtos com pureza suficiente para uma caracterização adequada por RMN. Com isso, utilizando primeiramente uma coluna C18 analítica, desenvolveu-se um método onde houve uma boa separação dos picos, permitindo a obtenção de produtos mais puros, utilizando-se a mistura com maior variedade de compostos. Após diversas modificações na fase móvel, chegou-se ao método utilizado: um gradiente que parte de 60% de MeOH 0,1% AF e vai até 98% em 30 minutos. Na escala analítica utilizou-se fluxo de 1 mL/min enquanto na escala preparativa utilizou-se 12 mL/min. Com esse método obteve-se o cromatograma da **figura 34**, o qual contém 4 picos.

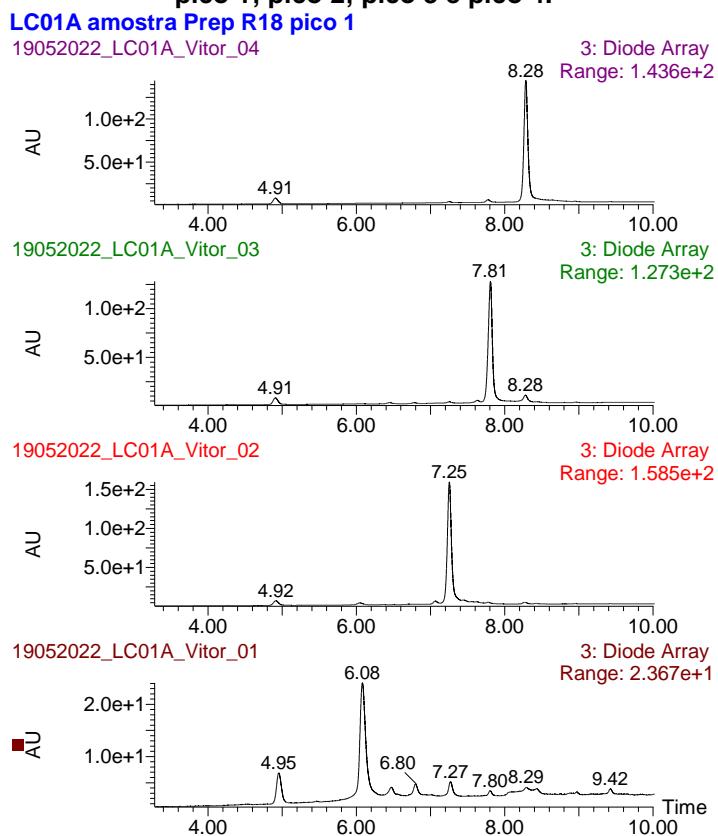
Figura 34. Cromatograma UV (371 - 480 nm) obtido do método preparativo para a purificação das reações entre 3,5,8-TMON com fenilhidrazina



Analisando os picos no LC-MS (**Figura 35**) observa-se que os picos 2, 3 e 4 foram obtidos de com alto grau de pureza, ao passo que o pico 1 possui uma mistura

de material de partida com outros subprodutos reacionais. Para facilitar a identificação das moléculas os picos 2, 3 e 4 correspondem aos produtos 2, 3 e 4, respectivamente.

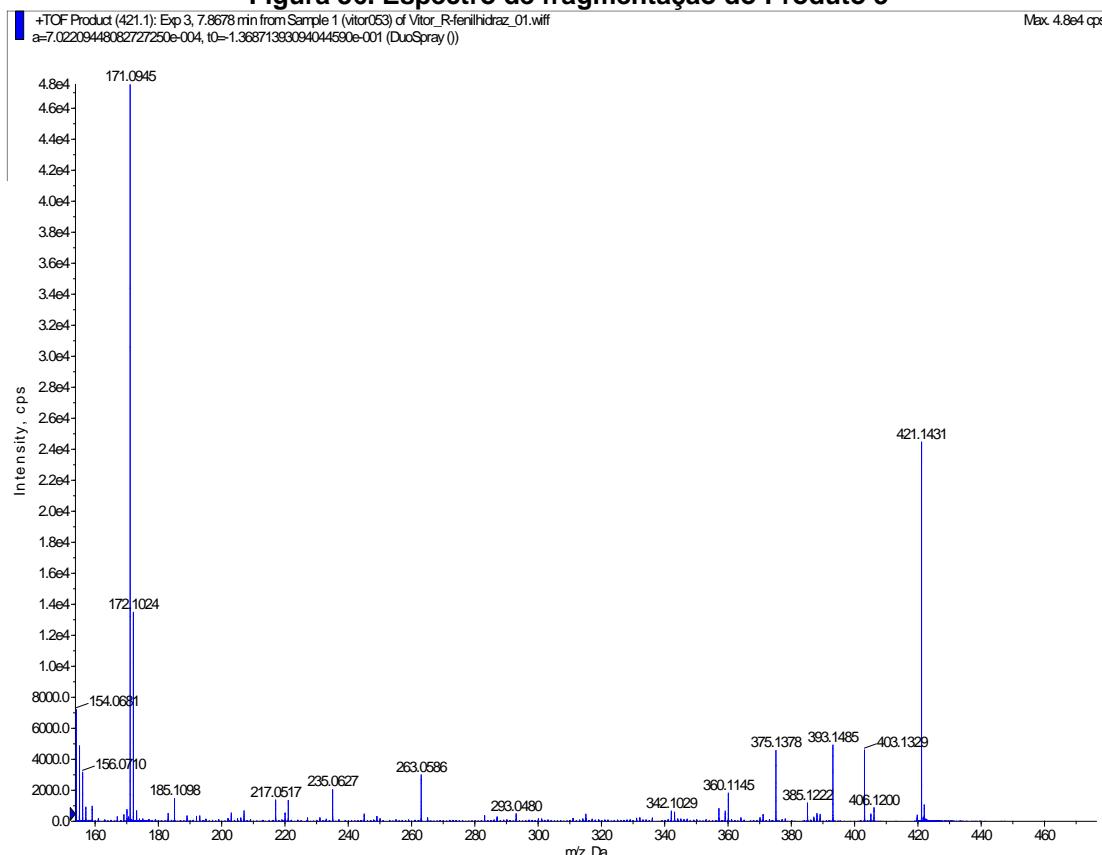
Figura 35. Cromatograma DAD (240-700 nm) de cada um dos 4 picos – De baixo para cima: pico 1; pico 2; pico 3 e pico 4.



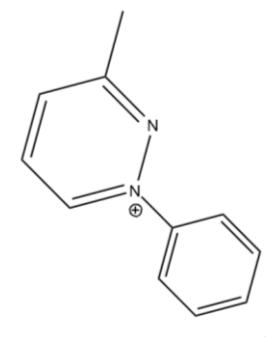
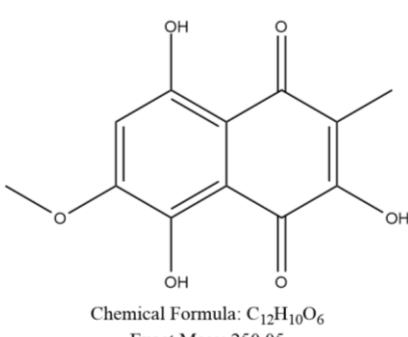
✓ Produto 3

O Produto 3 foi purificado e após isso, analisado em um espectrômetro de massas de alta resolução (**Figura A 19**) obtendo-se o íon de m/z 421, correspondente à formula molecular $C_{23}H_{20}N_2O_6$ e massa de 420,1321 u, com erro de 5,2364 ppm.

Realizou-se um estudo de fragmentação, com o objetivo de compreender melhor a estrutura formada e avaliar em qual das carbonilas teria sofrido um ataque nucleofílico. Além de outras possíveis alterações estruturais que pudessem vir a aparecer. Observando o espectro de fragmentação da molécula, é possível notar a presença de um fragmento principal, com m/z igual a 171.

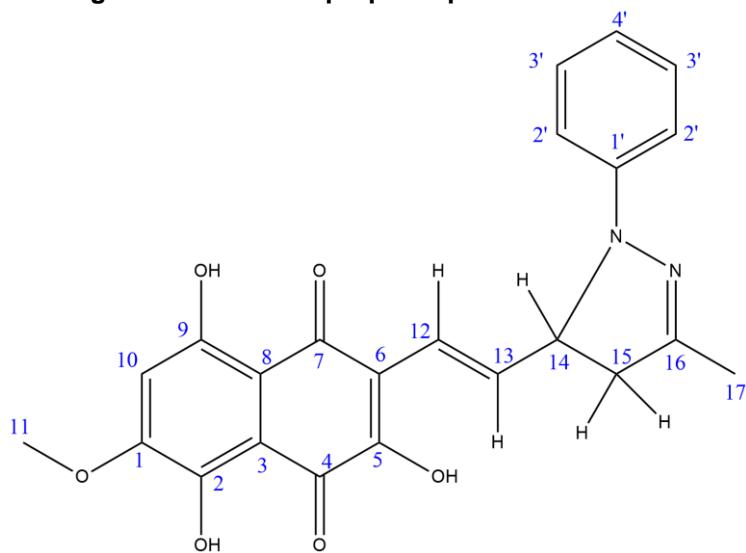
Figura 36. Espectro de fragmentação do Produto 3

A estrutura para tal fragmento foi proposta no esquema a seguir:

**Esquema 12. Proposta de fragmentação do íon $m/z = 171$ proveniente da molécula protonada**

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando $CDCl_3$ e foram adquiridos em um espetrômetro de ressonância magnética nuclear com campo de 600 MHz. Foram realizados os seguintes experimentos: 1H , DEPTQ, COSY, HMBC, HMQC, NOESY e TOCSY. Todos os espectros encontram-se no Anexo. A partir dos experimentos, é possível atribuir a seguinte estrutura:

Figura 37. Estrutura proposta para a molécula P3



As correlações entre os átomos de hidrogênio encontram-se na **Tabela 2**, onde é possível observar as atribuições de cada pico presente no espectro de Hidrogênio (**Figura A 20**)

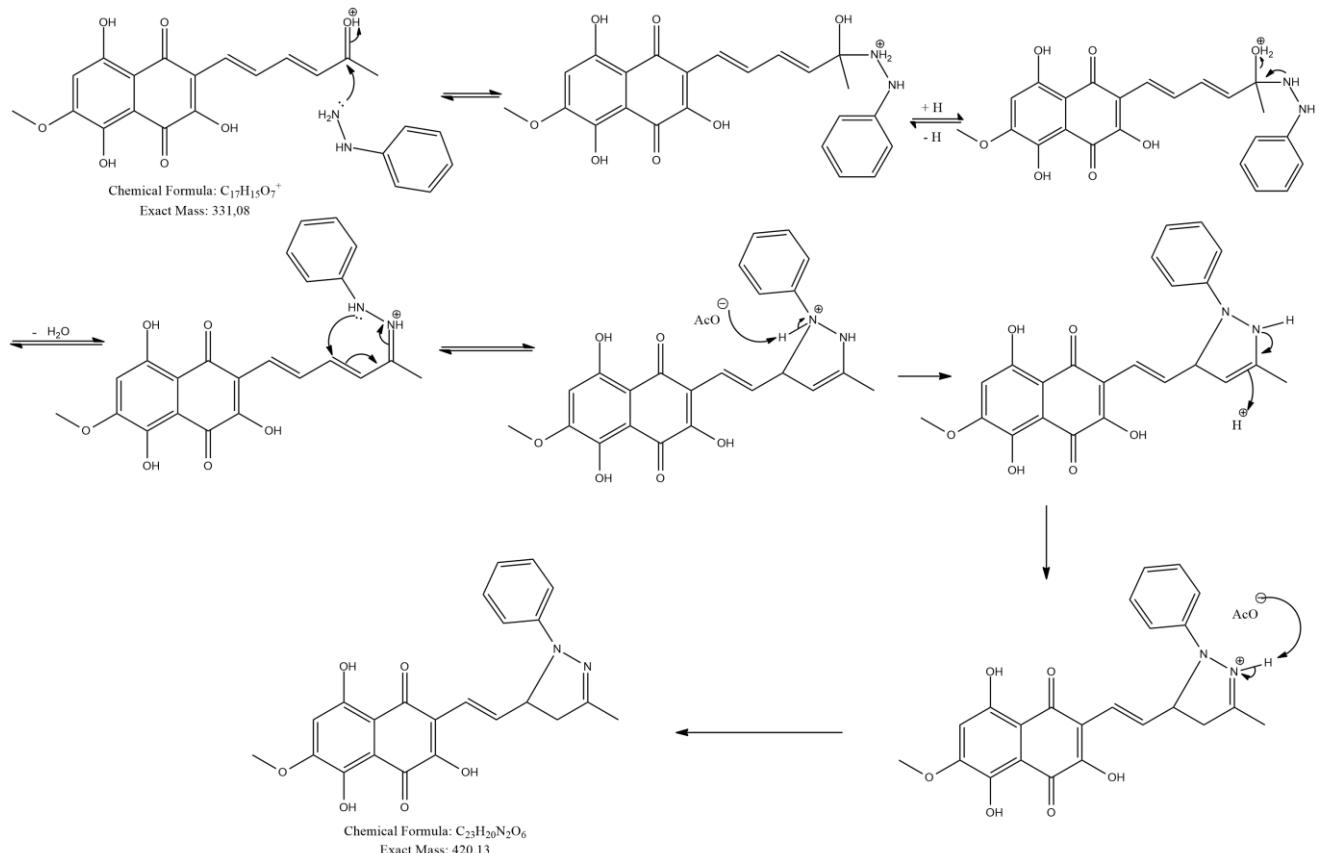
Tabela 2: Correlações entre ^{13}C e ^1H na molécula P3

Posição	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	I	δ	^{13}C (ppm)	HMBC
C11	3,99 (s)	-	3	56,61	C1	
C10	6,63 (s)	-	1	108,81	C9	
C12	6,92 (d)	16,4	1	119,39	C7;C5;C14	
C13	7,19 (dd)	16,3; 7,6	1	142,37	C12; C14	
C14	4,71 (dt)	11,5; 7,9	1	64,78	C12;C15	
C15a	2,77 (dd)	17,4; 8,2	1	45,19	C3;C14;C16	
C15b	3,26 (dd)	17,4; 11,4	1	45,19	C13;C16	
C17	2,10 (s)	-	3	16,01	C16;C15	
C2'	7,23 (t)	7,8	2	128,86	C1'; C2'	
C3'	7,13 (d)	8,1	2	113,77	C4';C3'	
C4'	6,82 (t)	7,3	1	119,39	C3'	
C2-OH	13,38 (s)	-	1	-	C1	
C12-OH	12,05 (s)	-	1	-	C10	

A partir dos espectros é possível observar a aparição de um grupamento $-\text{CH}_2-$ que não estava presente no material de partida (2,77 e 3,26 ppm). Ainda é possível

constatar a formação de uma nova ligação carbono-heteroátomo por conta do deslocamento do hidrogênio observado em C14 (4,71 ppm). Este hidrogênio por sua vez apresenta um duplo-triplet, por conta de acoplar com os hidrogênios C15a (2,77 ppm) e C13 (7,19 ppm) com constante similar ($J \sim 8$). O alto valor do acoplamento ($J = 16,4$) de C12 (6,92 ppm) e C13 (7,19 ppm) indica a presença de uma dupla-ligação de configuração *trans*. Os acoplamentos de longa distância entre hidrogênios e carbonos foram essenciais para a caracterização desta molécula, já que demonstrou que o grupamento CH_2 (C15) formado estava em posição α em relação à ligação C=N (150 ppm). O hidrogênio da hidroxila enólica não foi observado.

A análise dos espectros de ressonância e de fragmentação de massas, permite propor uma estrutura muito interessante do ponto de vista farmacêutico, com dois grupamentos conhecidos por sua atividade biológica. O produto formado é semelhante ao produto reacional obtido por George (2013) onde um sistema carbonílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado sofre reação com fenilhidrazina, em condições básicas, formando um anel dihidropirazol.³⁸ O sistema inicial sofre uma ciclização por conta do alto poder nucleofílico dos átomos de nitrogênio da fenilhidrazina bem como a deficiência de elétrons nos carbonos da carbonila e na posição β como proposto no **esquema 13**. Acredita-se, ainda, que este produto é o precursor do Produto 2.

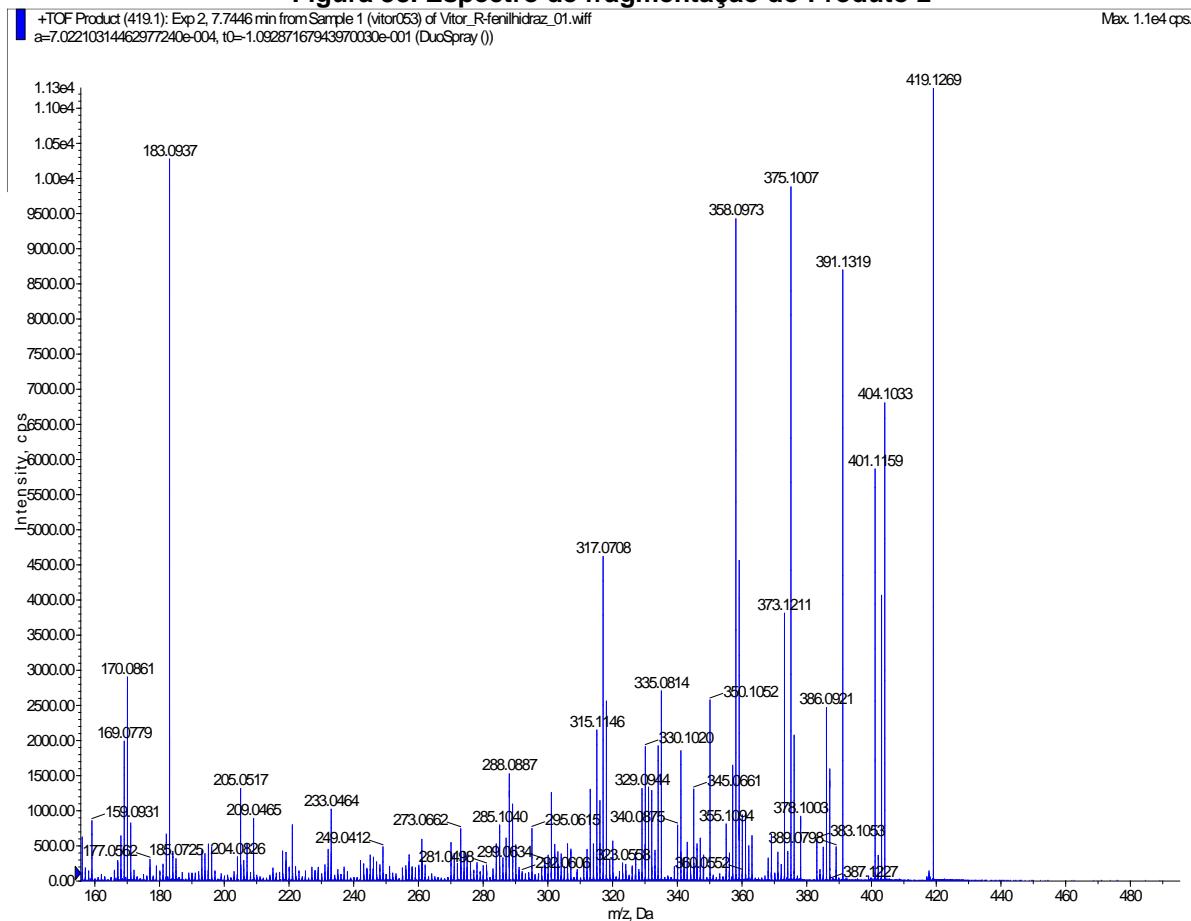


Esquema 13. Mecanismo proposto para a formação de P3

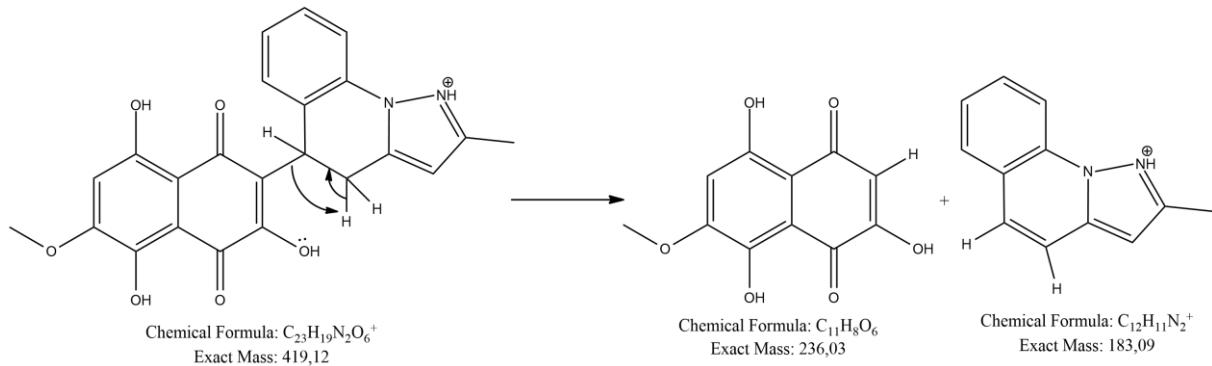
✓ **Produto 2**

O Produto 2 foi purificado e após isso, analisado em um espectrômetro de massas de alta resolução (**Figura A 13**) obtendo-se o íon de *m/z* 419, correspondente à formula molecular C₂₃H₁₈N₂O₆ e massa de 418,1165 u, com erro de 4,0659 ppm.

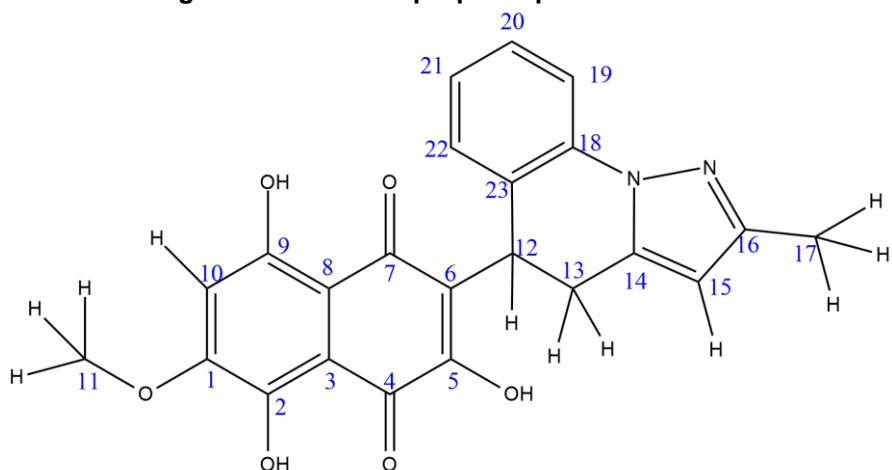
Realizou-se um estudo de fragmentação, com o objetivo de compreender melhor a estrutura formada e avaliar em qual das carbonilas teria sofrido um ataque nucleofílico. Além de outras possíveis alterações estruturais que pudessem vir a aparecer. Observando o espectro de fragmentação da molécula, é possível notar a presença de fragmentos advindos de pequenas perdas como perda de CO (-28 u), porém há uma grande perda, formando um fragmento principal, com *m/z* igual a 183.

Figura 38. Espectro de fragmentação do Produto 2

A estrutura para tal fragmento, bem como o seu mecanismo de formação, foram propostos no esquema a seguir:

**Esquema 14. Proposta de fragmentação do íon $m/z = 183$ proveniente da molécula protonada**

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando $CDCl_3$ e foram adquiridos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear com campo de 600 MHz. Foram realizados os seguintes experimentos: 1H , DEPTQ, COSY, HMBC, HMQC, NOESY e TOCSY. Todos os espectros encontram-se no Anexo. A partir dos experimentos, é possível atribuir a seguinte estrutura:

Figura 39. Estrutura proposta para o Produto 2

As correlações entre os átomos de hidrogênio encontram-se na **Tabela 4**, onde é possível observar as atribuições de cada pico presente no espectro de Hidrogênio (**Figura A 14**).

Tabela 3. Correlações entre ^{13}C e ^1H na molécula P2

Posição	δ (ppm)	^1H	J (Hz)	I	δ (ppm)	^{13}C	HMBC
C10	6,55 (s)	-		1	108,79	C1; C9	
C11	3,92 (s)	-		3	56,59	C1	
C12	4,82 (dd)	12,1; 6,4		1	31,28	C13; C7; C6	
C13a	3,02 (dd)	15,5; 6,4		1	25,20	C12; C14; C6	
C13b	3,45 (dd)	15,5; 12,2		1	25,14	C12; C14; C6	
C15	5,88 (s)	-		1	103,9	C16; C14	
C17	2,29 (s)	-		3	13,69	C16	
C19	7,85 (d)	8,0		1	115,71	C21; C18	
C20	7,24 (t)	7,7		1	127,89	C22; C18	
C21	6,96 (t)	7,5		1	124,49	C22; C19	
C22	6,88 (d)	7,6		1	126,50	C20; C18; C12	
C9-OH	11,96 (s)	-		1	-	C10	
C2-OH	13,22 (s)	-		1	-	-	

A partir dos espectros de ressonância magnética nuclear, é possível observar, em um primeiro momento, a presença de um grupamento $-\text{CH}_2-$ com hidrogênios com

acoplamento geminal (3,02 e 3,45 ppm), o que não existia na estrutura do material de partida, bem como na do reagente utilizado. Continuando a análise, percebe-se que há, acoplando com estes hidrogênios, um outro átomo ^1H (4,82 ppm) que está ligado a um carbono com baixo deslocamento químico, o que pode ser indício de um carbono terciário. O singleto em 5,88 ppm possui um acoplamento a longa distância com um carbono de deslocamento com 150 ppm, assim como a Metila presente em 2,29 ppm, o que indica que estes hidrogênios estão em posição α a um grupamento $\text{C}=\text{N}$. Somado a isso, este singleto ainda acopla com um carbono quaternário (138 ppm), indicando que houve uma ciclização na posição 14. A análise de TOCSY1d do hidrogênio em 6,88 ppm confirmou que os sinais do anel aromático se desdobraram em quatro sinais com integral 1 (6,88; 6,96; 7,24 e 7,85 ppm), o que evidencia uma reação envolvendo o anel aromático. A ligação do anel com o Carbono 12 foi indicada pelo acoplamento a longa distância do Hidrogênio 22 (6,88 ppm) com o Carbono 12 (31,28 ppm). O hidrogênio da hidroxila enólica não foi observado.

A análise do espectro de RMN juntamente com as fragmentações do espectrômetro de massas nos permite propor tal estrutura para o Produto 2, sendo uma estrutura nova com uma composição de anéis interessante. Este novo produto apresenta uma enorme semelhança com o Produto 3, sendo possível observar, no segundo, a presença de um anel heteroaromático pirazol, provavelmente advindo do anel dihidropirazol. Dessa forma, é possível que ocorra uma conversão do Produto 3 no Produto 2, como já fora discutido no tópico 5.2.2. .

✓ **Produto 4**

O Produto 4 foi purificado e após isso, analisado em um espectrômetro de massas de alta resolução (**Figura A 24**) obtendo-se o íon de m/z 419, correspondente à formula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ e massa de 418,1165 u, com erro de 4,305 ppm.

Realizou-se um estudo de fragmentação, com o objetivo de compreender melhor a estrutura formada e avaliar em qual das carbonilas teria sofrido um ataque nucleofílico. Além de outras possíveis alterações estruturais que pudessem vir a aparecer. Observando o espectro de fragmentação da molécula, é possível notar um padrão de fragmentação semelhante àquele observado para o Produto 2, que apresenta a mesma massa molecular. Sendo alguns advindos de pequenas perdas como perda de CH_3 (-15 u) e outros grandes perdas, formando o mesmo íon 183

discutido para o Produto 2. Esta última perda é referente à perda do grupamento naftoquinona, deixando apenas a cadeia lateral do produto formado (**Esquema 14**), o que indica a reação na cadeia lateral, sendo a estrutura final do íon variável para cada um dos isômeros.

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando CDCl_3 e foram adquiridos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear com campo de 600 MHz. Foram realizados os seguintes experimentos: ^1H , HMBC, HMQC, NOESY e TOCSY. Todos os espectros encontram-se no Anexo. Esta molécula apresentou pior solubilidade dentre aquelas obtidas no processo de purificação da reação entre 3,5,8-TMON e a fenilhidrazina. Considerando que a quantidade, que era limitada, disponível para análise no espectrômetro de ressonância magnética nuclear, não foi completamente dissolvida, obtiveram-se espectros com alto grau de ruído proveniente de impurezas e alguns desdobramentos.

Com isso, não foi possível propor uma estrutura por completo, já que novas análises devem ser realizadas, afim de esclarecer dúvidas deixadas pelas análises dos espectros obtidos até o momento. No entanto, vide fragmentos obtidos no espectro de íons produto, é possível propor que a reação ocorreu na cadeia lateral, assim como ocorreu por padrão nas outras moléculas deste trabalho.

6. Conclusão e considerações finais

A partir dos resultados obtidos através deste Trabalho de Conclusão de Curso chega-se a uma série de conclusões interessantes. A primeira, considerando o material de partida, confirma que o procedimento adotado para produção e extração da naftoquinona produzida pelo fungo *Cordyceps* sp., é eficaz e ao mesmo tempo simples, uma vez que permite a obtenção de um produto puro e em quantidades suficientes para a utilização em semi-síntese, sendo um procedimento que dispensa uso de solventes e de métodos cromatográficos.

No âmbito das reações modificações estruturais, é possível afirmar que, na maioria dos casos, a acidificação do meio reacional para reações de substituição à carbonila foi benéfica do ponto de vista de reatividade, aumentando a formação de produtos, mesmo que sem seletividade entre eles. É possível ainda observar a influência do meio reacional com a formação dos produtos finais como observado nas reações entre 3,5,8-TMON e fenilhidrazina. Os métodos de aquecimento, assim como o meio reacional, estão diretamente relacionados com a formação de produtos mais

diversificados, sendo que há diferença no uso de aquecimento em bancada e em reator de micro-ondas.

Com a caracterização das moléculas, é possível concluir que a reatividade da naftoquinona estudada é mais presente na sua cadeia lateral. Fato confirmado pelos espectros de fragmentação, onde é possível observar que os fragmentos são, majoritariamente, partes da cadeia lateral que deixam a molécula. Talvez seja por conta disso que a reação com a *o*-fenilenodiamina não formou o produto esperado, já que o núcleo naftoquinona, que seria o alvo de tal reagente, parece permanecer intacto com as condições de reação testadas.

Por fim, a caracterização das moléculas nos permite propor estruturas inéditas, as quais podem possuir um grande potencial como fármaco pela presença de grupamentos com atividade biológica conhecida como o anel naftoquinona, o anel dihidropirazol e o grupamento hidrazona.

7. Anexo

Figura A 1. Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. A molécula possui fórmula molecular C₁₇H₁₄O₇ correspondendo a massa exata calculada de 330,0740 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 3,9385 ppm comparado com o observado no espectro

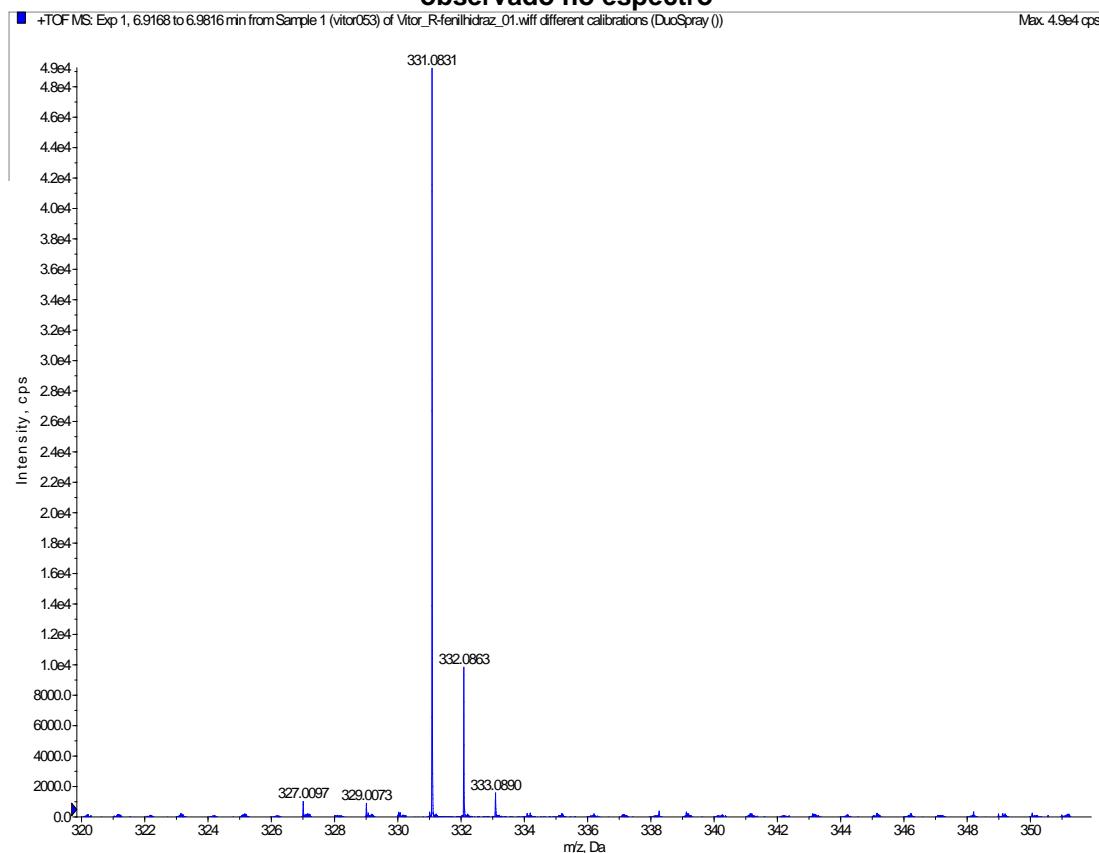


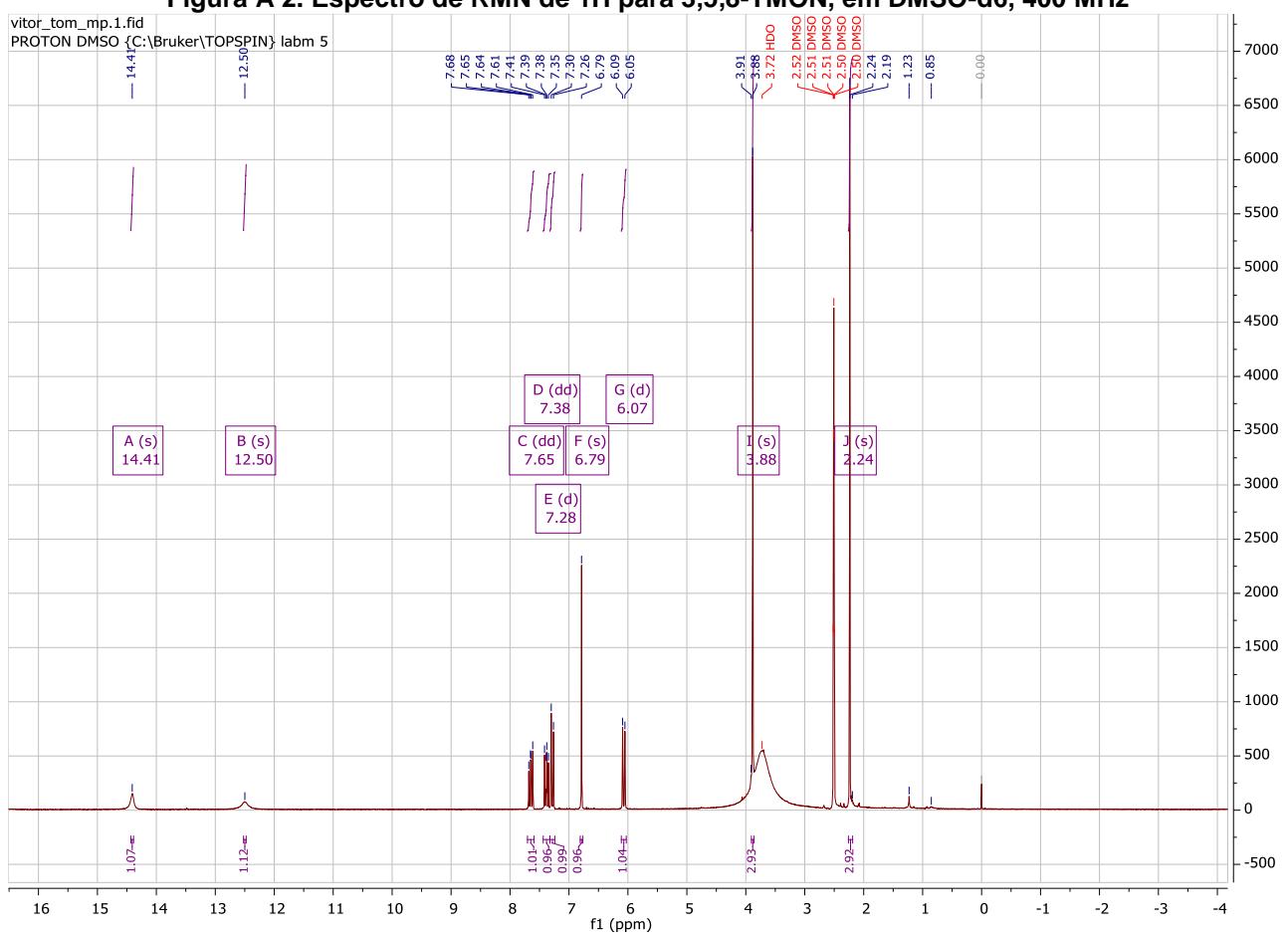
Figura A 2. Espectro de RMN de ^1H para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 400 MHz

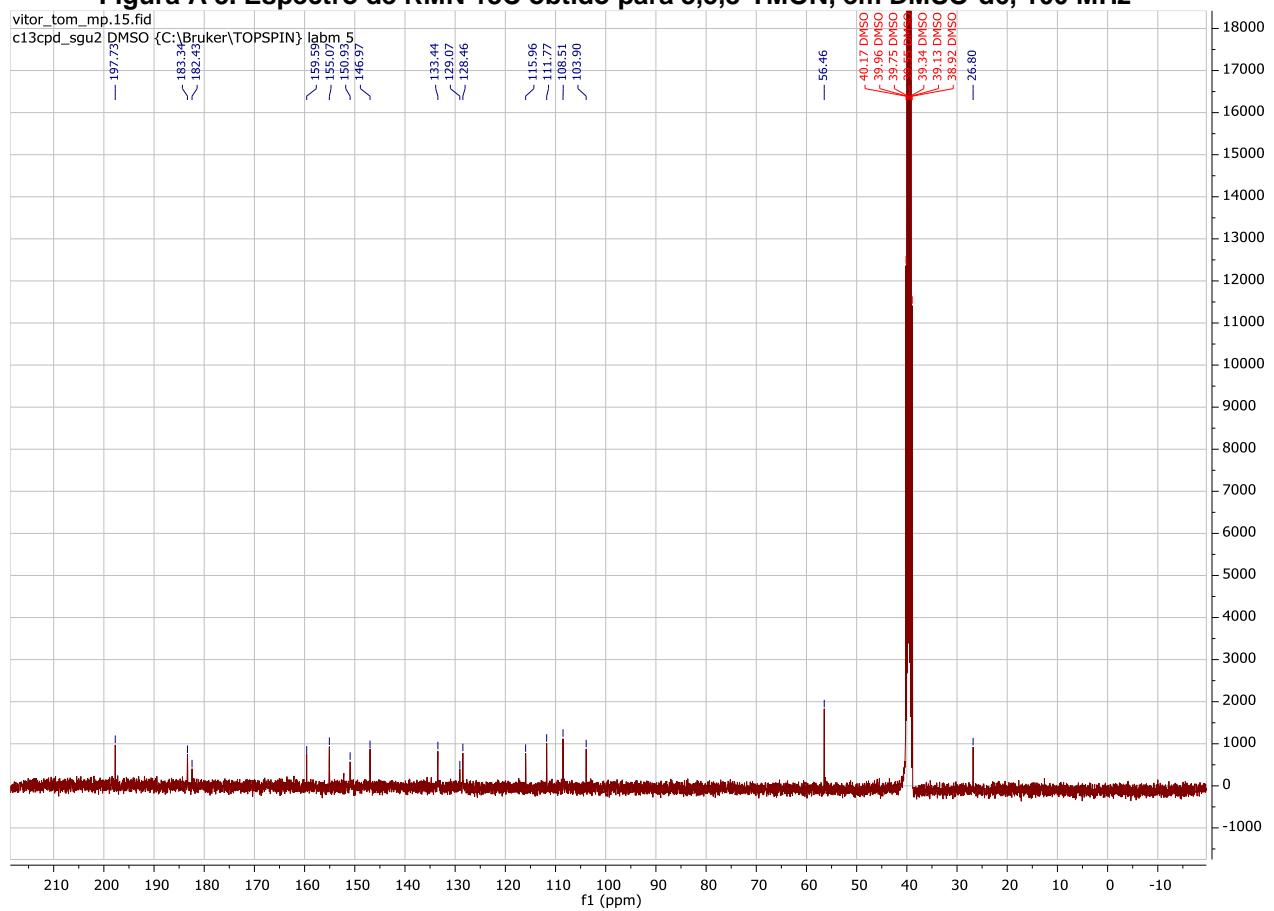
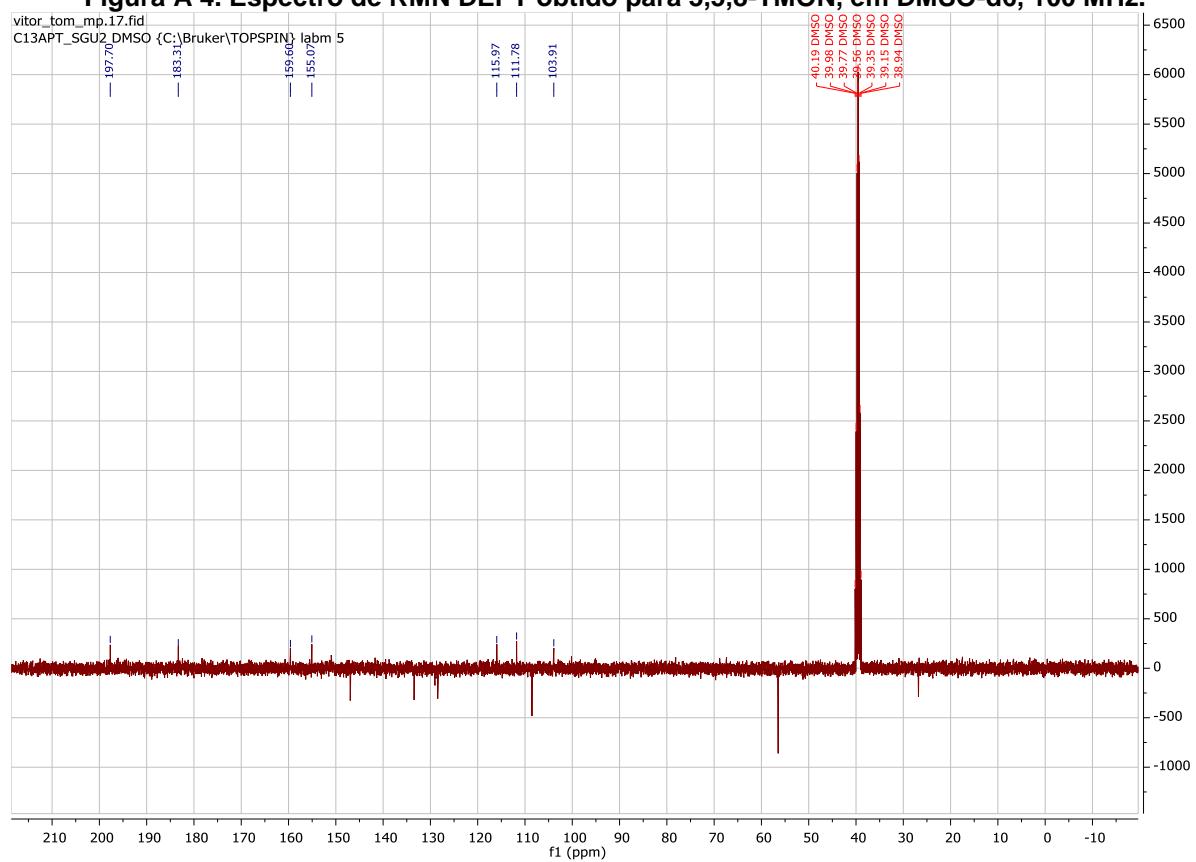
Figura A 3. Espectro de RMN ^{13}C obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 100 MHz**Figura A 4. Espectro de RMN DEPT obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 100 MHz.**

Figura A 5. Mapa de contornos ^1H - ^1H COSY, obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6 solvente, 400 MHz

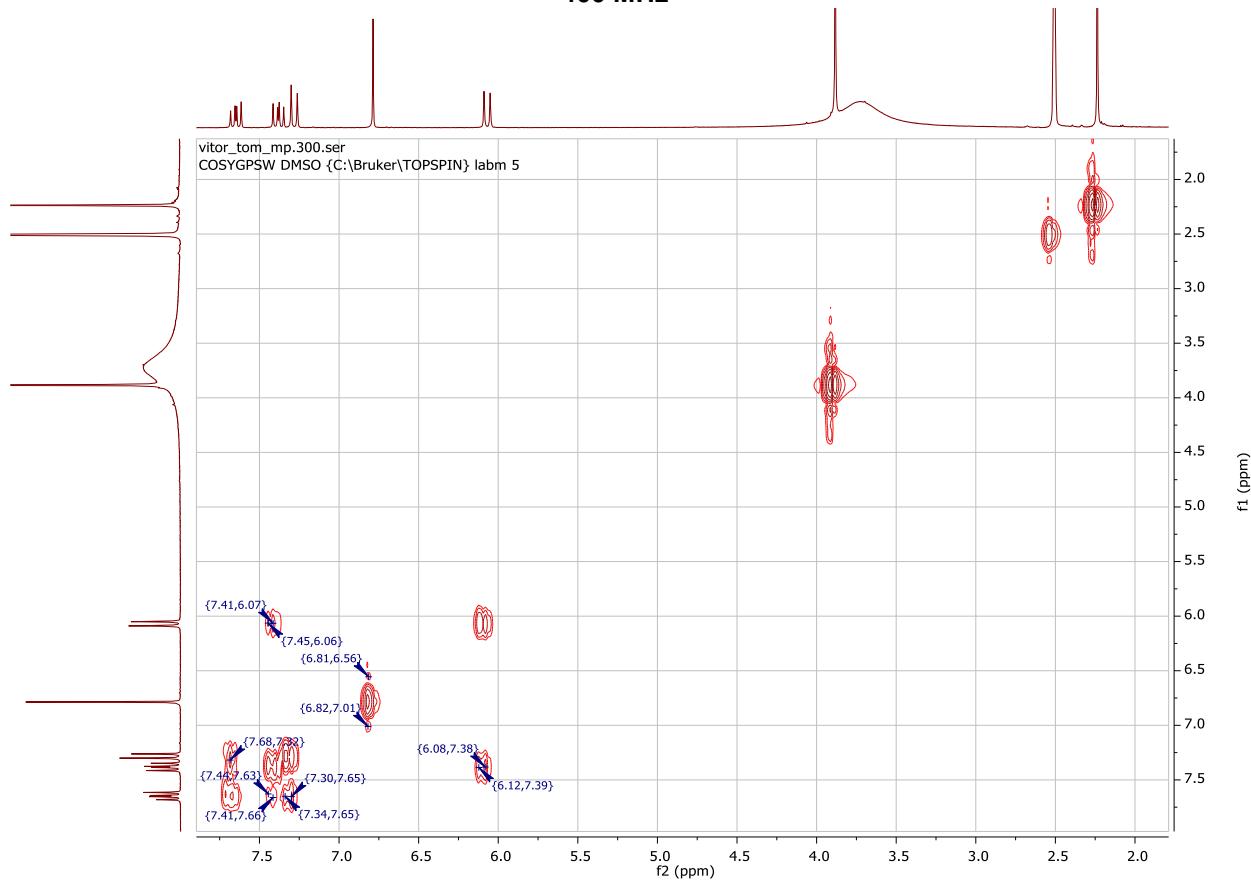


Figura A 6. Mapa de contornos HMQC obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 400 MHz.

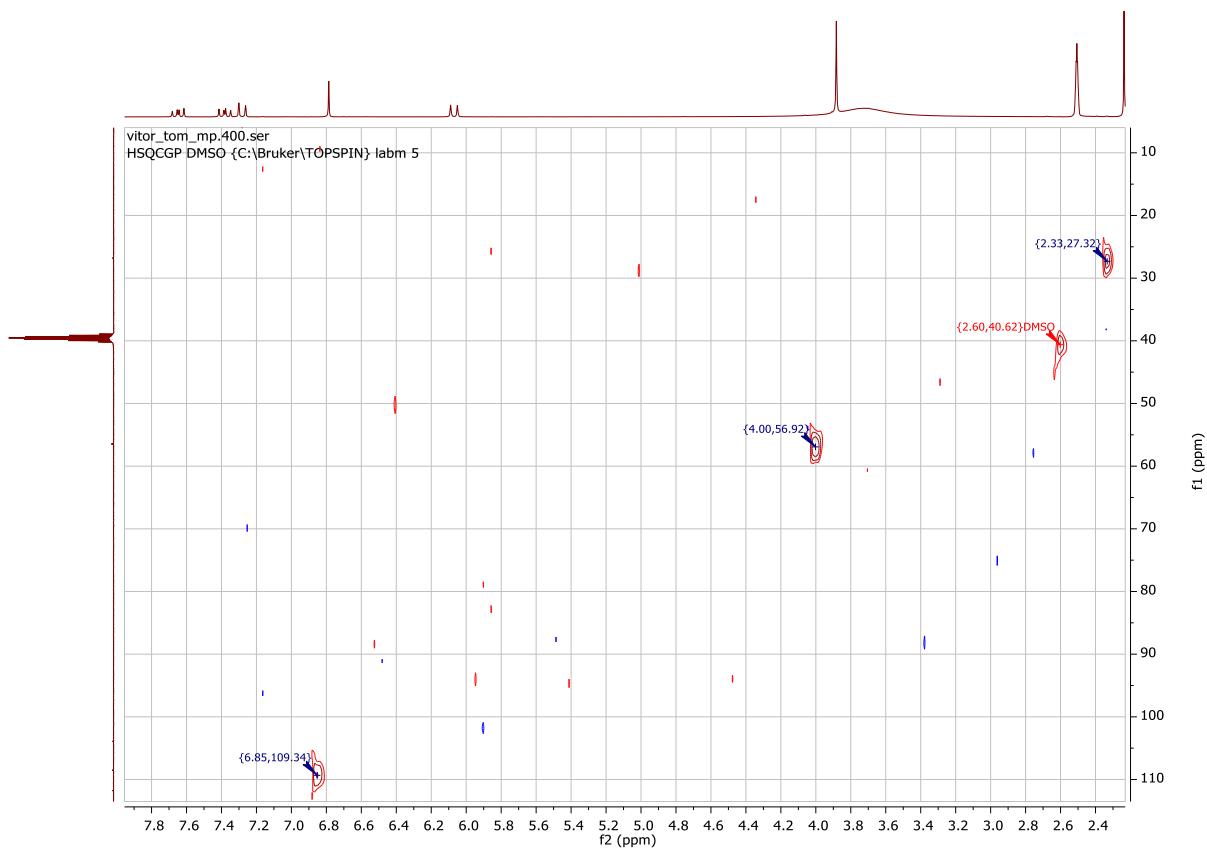


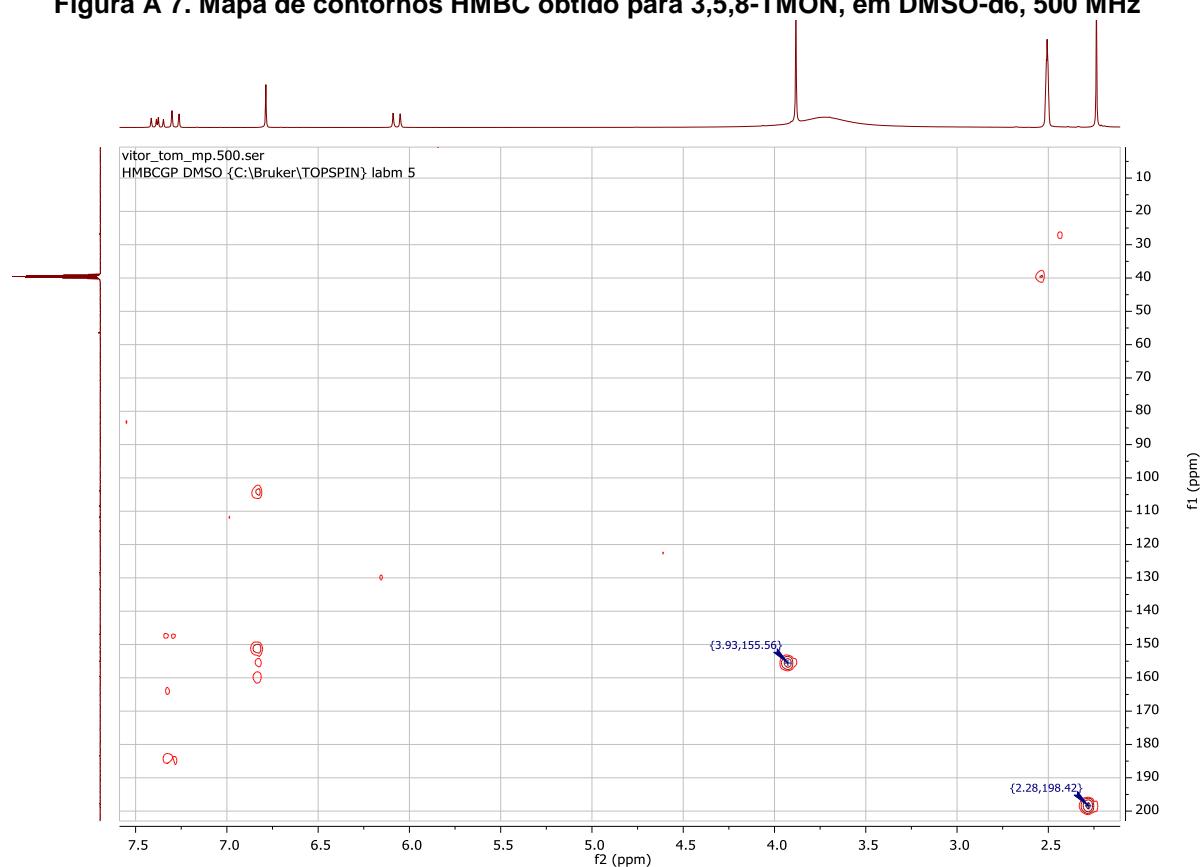
Figura A 7. Mapa de contornos HMBC obtido para 3,5,8-TMON, em DMSO-d6, 500 MHz

Figura A 8. Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. O produto da reação entre naftoquinona e ISNZ possui fórmula molecular C₂₃H₁₉N₃O₇ correspondendo a massa exata calculada de 449,1247 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 5,3438 ppm comparado com o observado no espectro.

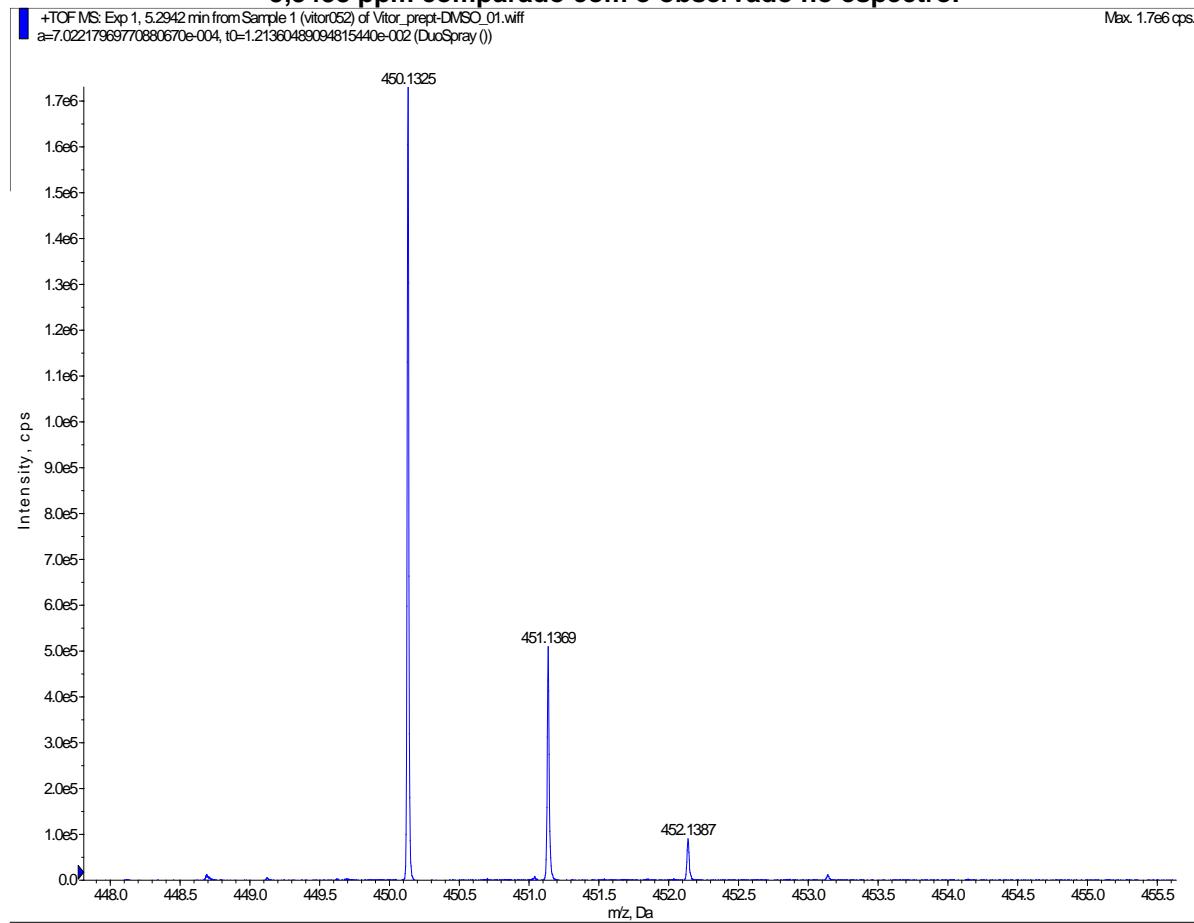


Figura A 9. Espectro de RMN 1H obtido para o produto da reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ, em DMSO-d6, 600 MHz

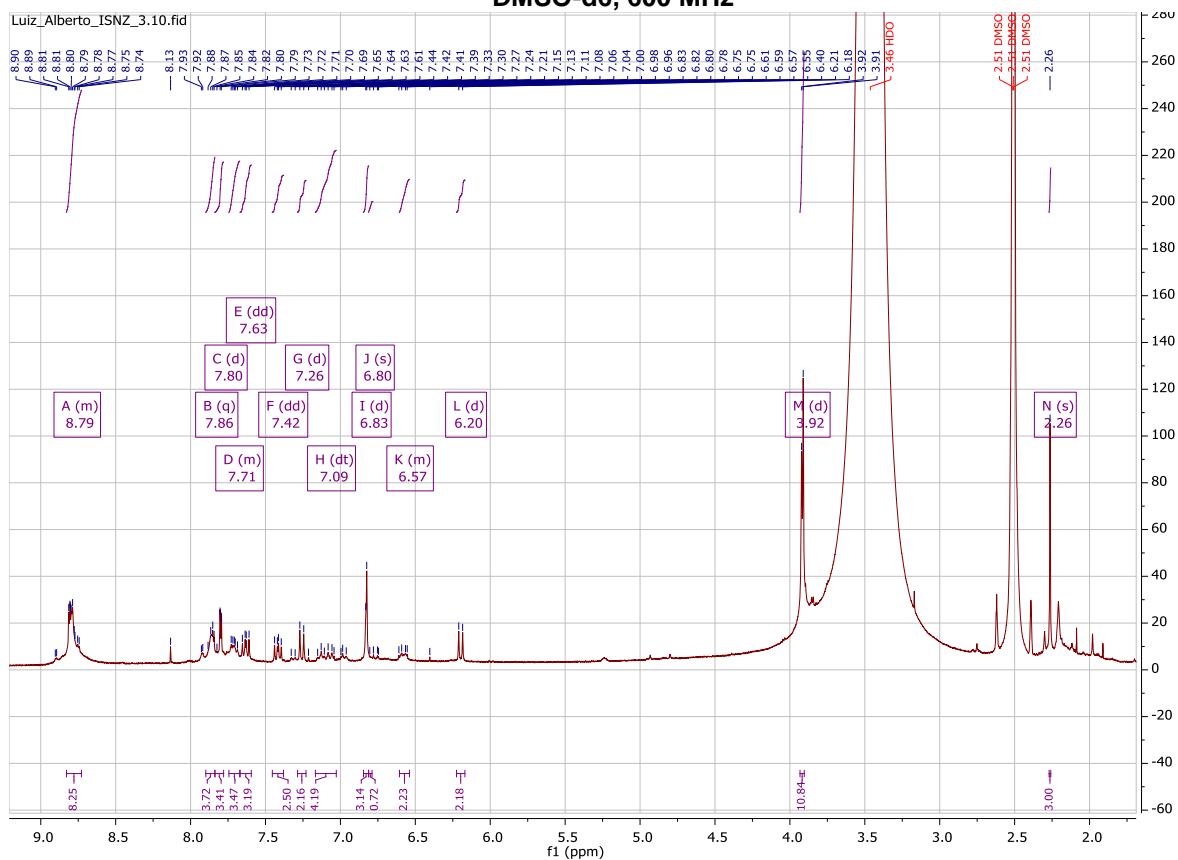


Figura A 10. Espectro de RMN TOCSY obtido para o produto da reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ com irradiação nos Hidrogênio 7,42 ppm (acima) e 8,79 ppm (abaixo), em DMSO-d6, 600 MHz

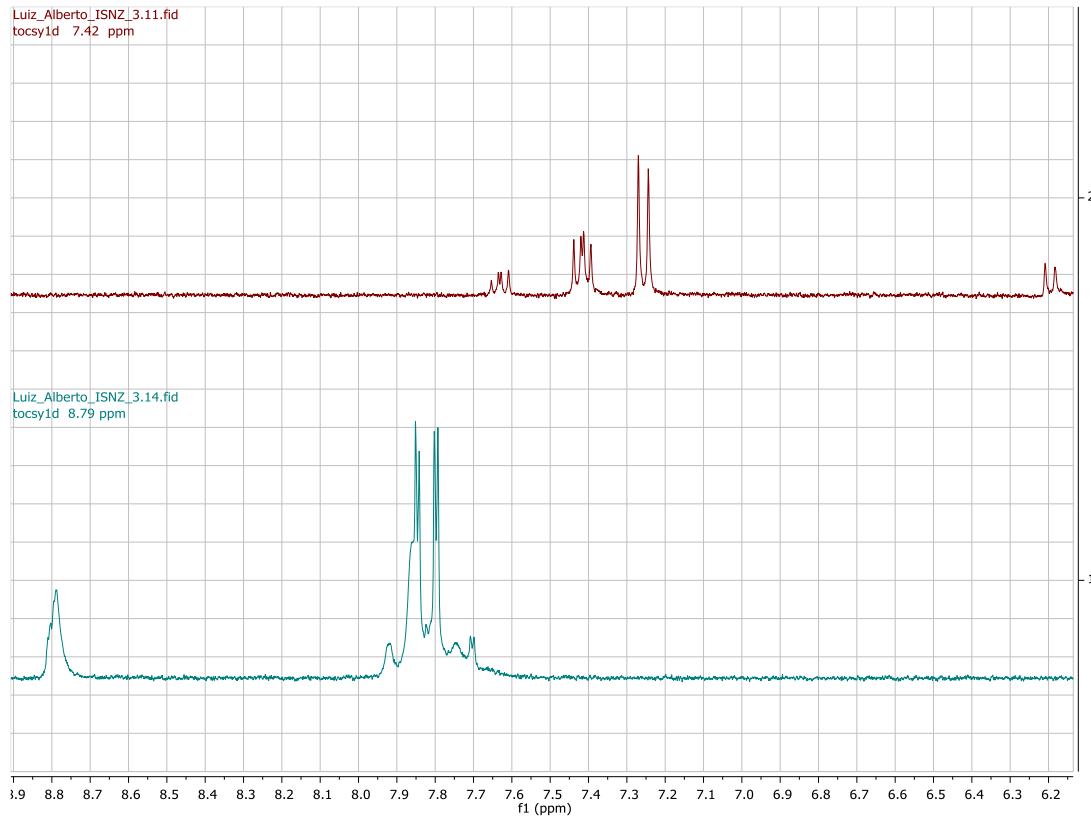


Figura A 11. Mapa de contornos HMQC obtido para o produto da reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ em DMSO-d6, 600 MHz.

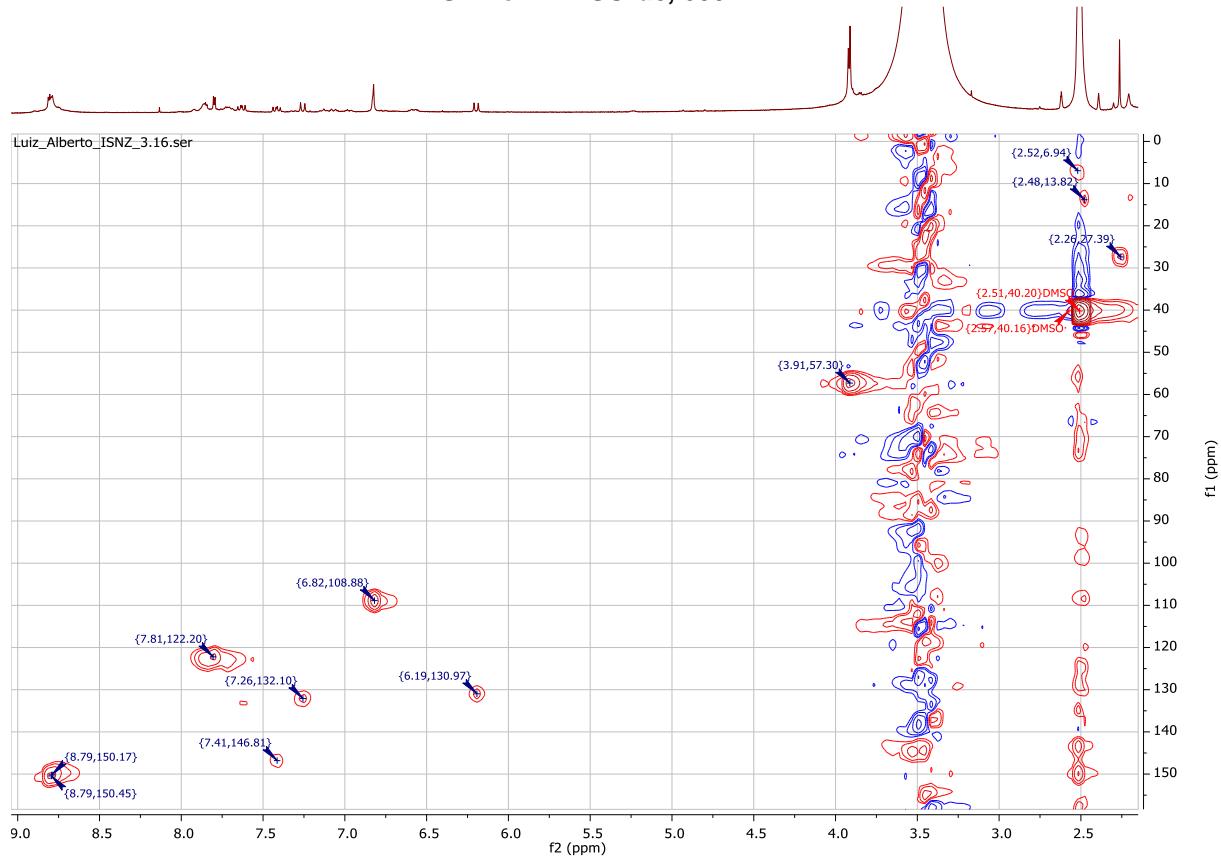


Figura A 12. Mapa de contornos HMBC obtido para o produto da reação entre 3,5,8-TMON e ISNZ em DMSO-d6, 600 MHz

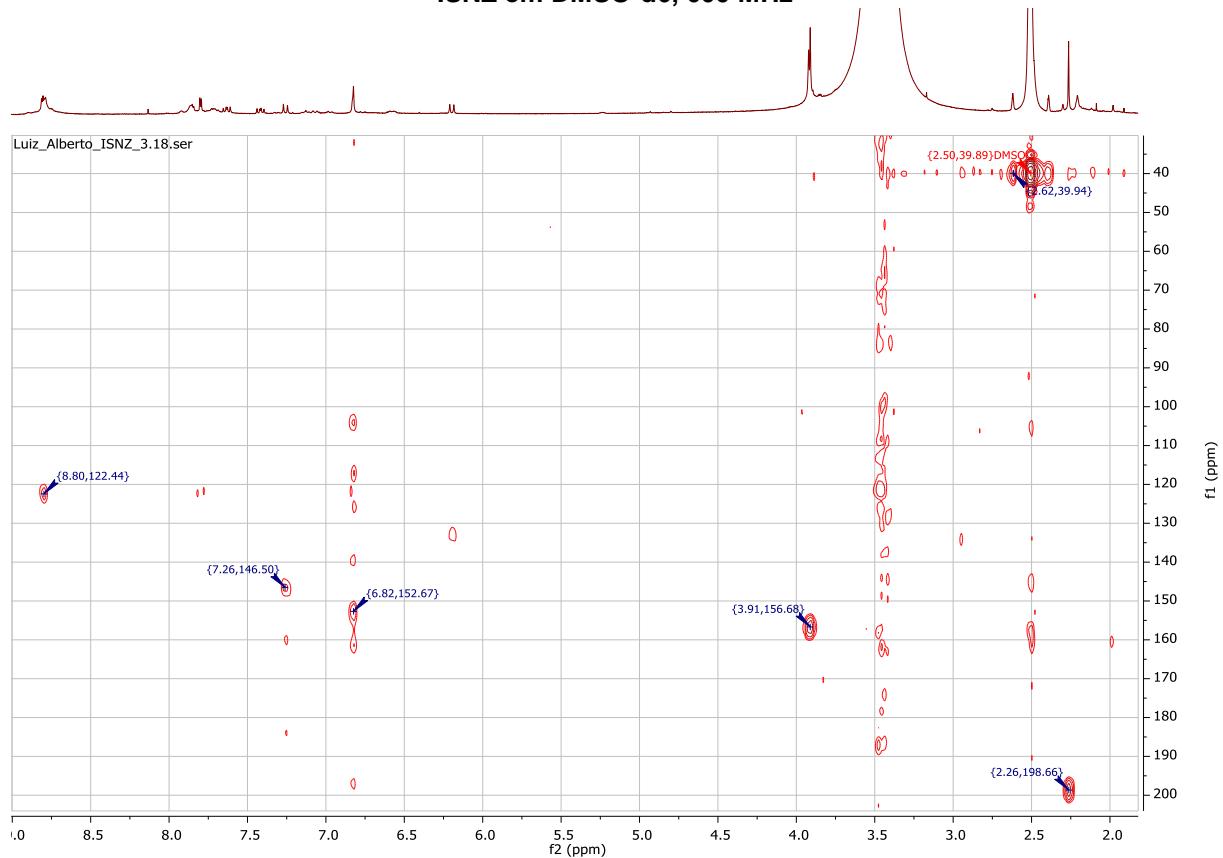


Figura A 13. Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. O Produto 2 possui fórmula molecular $C_{23}H_{18}N_2O_6$ correspondendo a massa exata calculada de 418,1165 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 4,0659 ppm comparado com o observado no espectro.

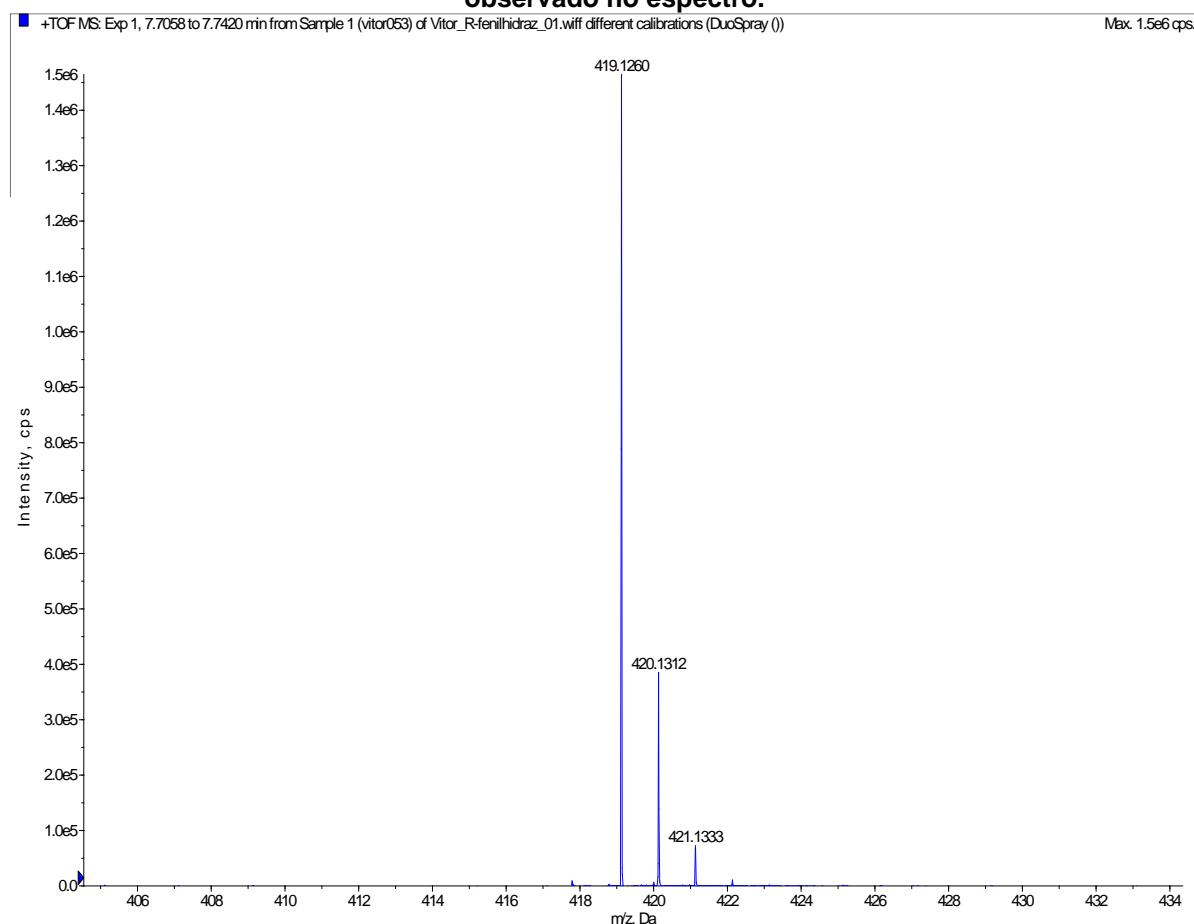


Figura A 14. Espectro de RMN ^1H obtido para o Produto 2, em CDCl_3 , 600 MHz

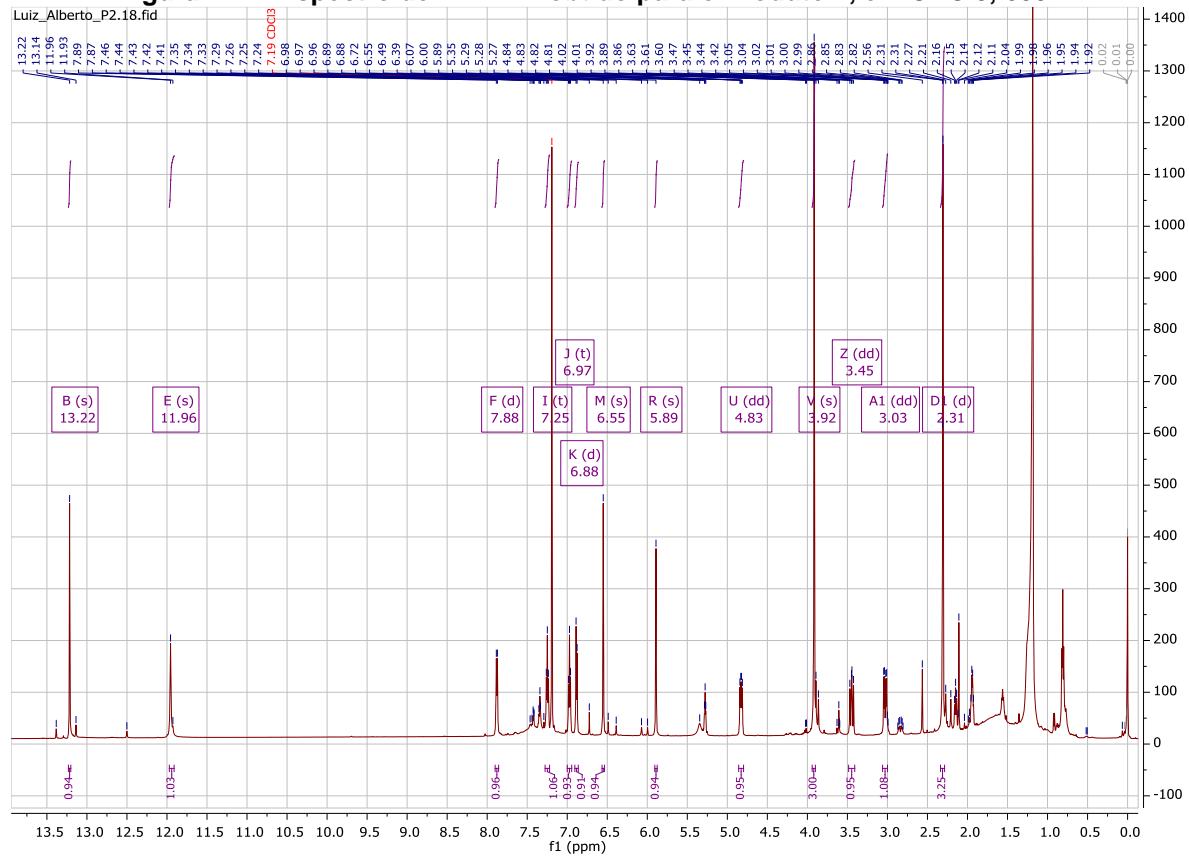


Figura A 15. Mapa de contornos HMQC obtido para o Produto 2, em CDCl₃, 600 MHz.



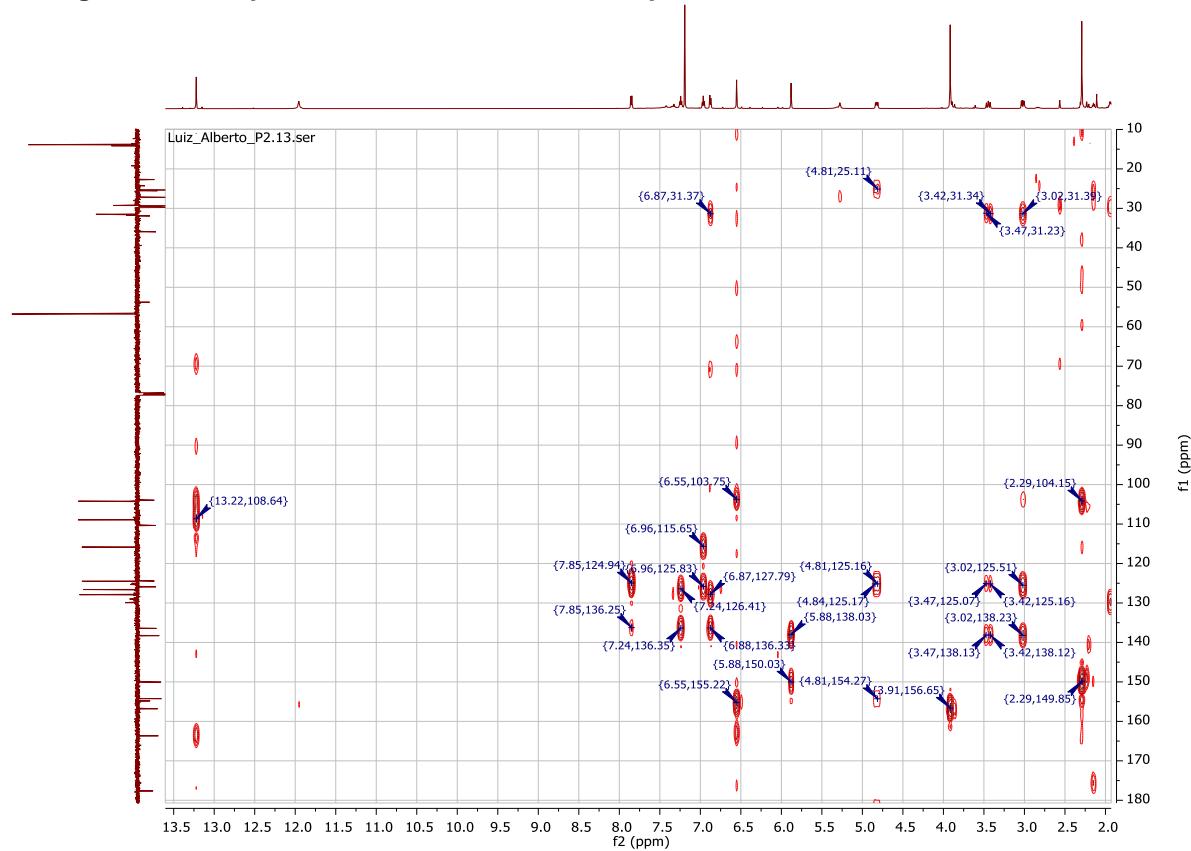
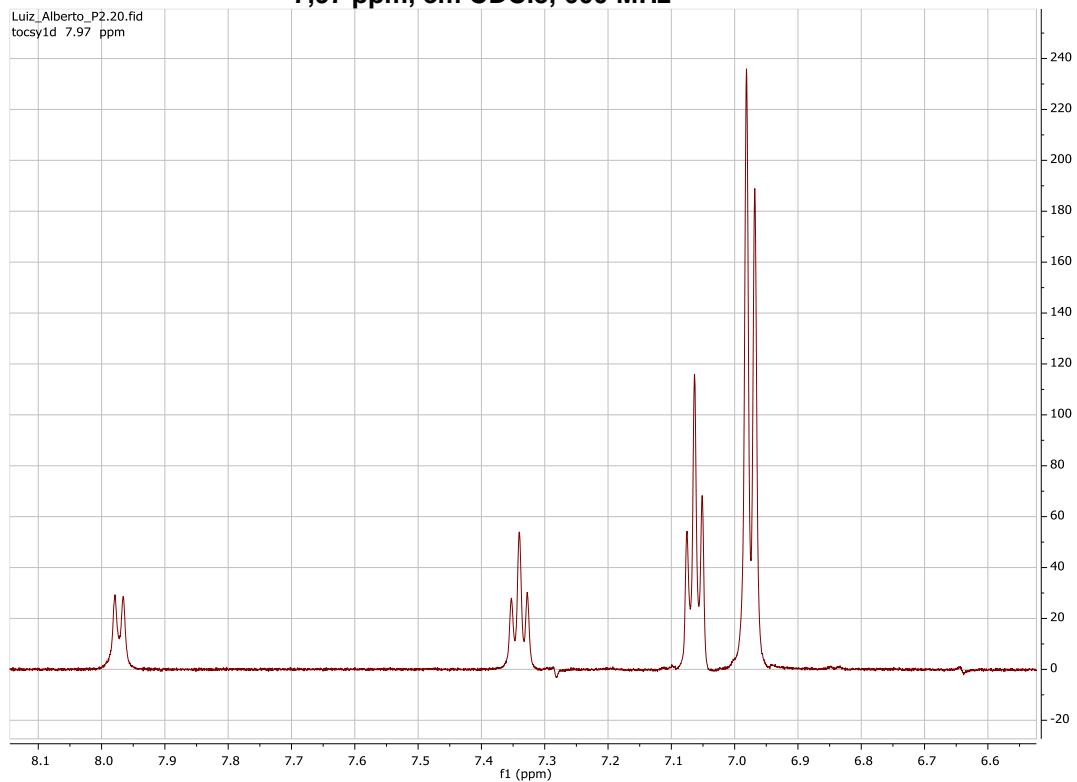
Figura A 16. Mapa de contornos HMBC obtido para o Produto 2, em CDCl_3 , 600 MHz**Figura A 17. Espectro de RMN TOCSY obtido para o Porduto 2, com irradiação no Hidrogênio 7,97 ppm, em CDCl_3 , 600 MHz**

Figura A 18. Espectro de RMN TOCSY obtido para o Porduto 2, com irradiação no Hidrogênio em 4,91 ppm, em CDCl₃, 600 MHz

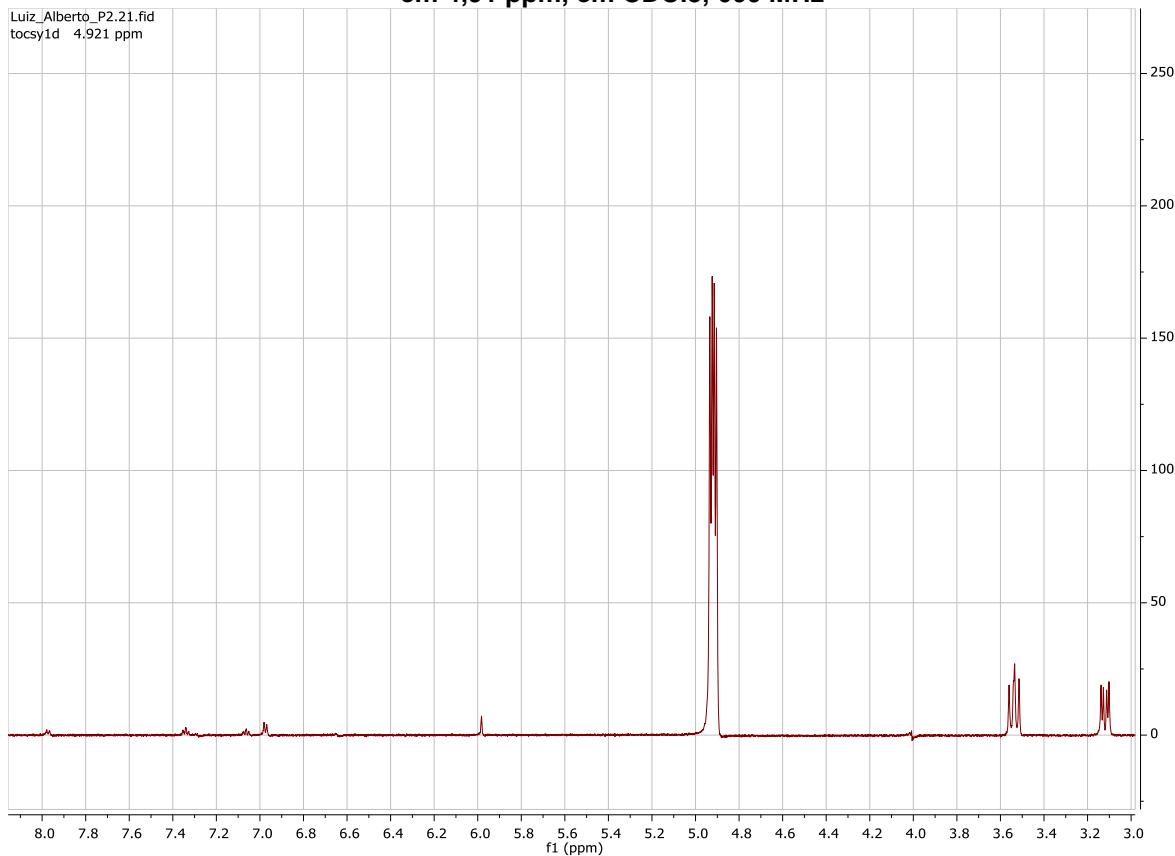


Figura A 19 Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. O Produto possui fórmula molecular $C_{23}H_{20}N_2O_6$ correspondendo a massa exata calculada de 420,1321 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 5,2364 ppm comparado com o observado no espectro.

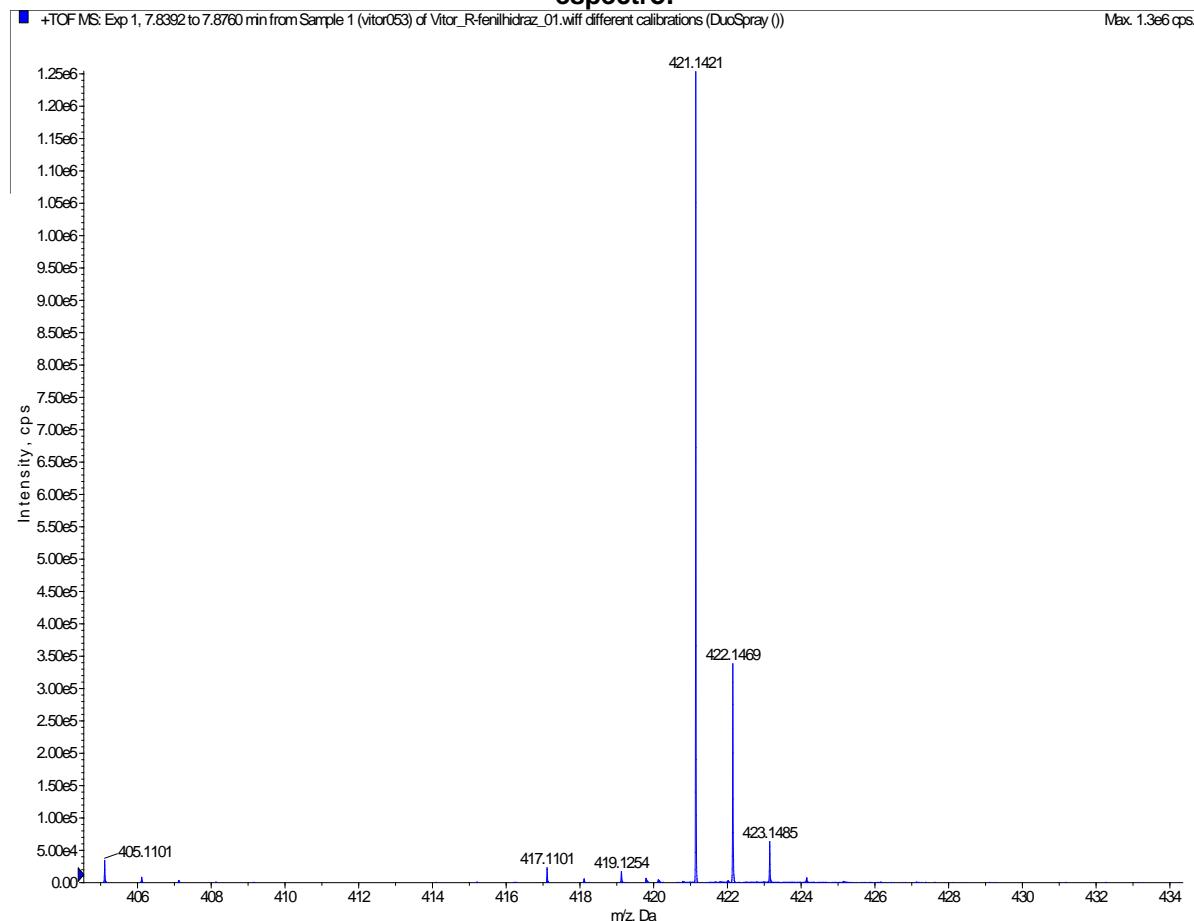


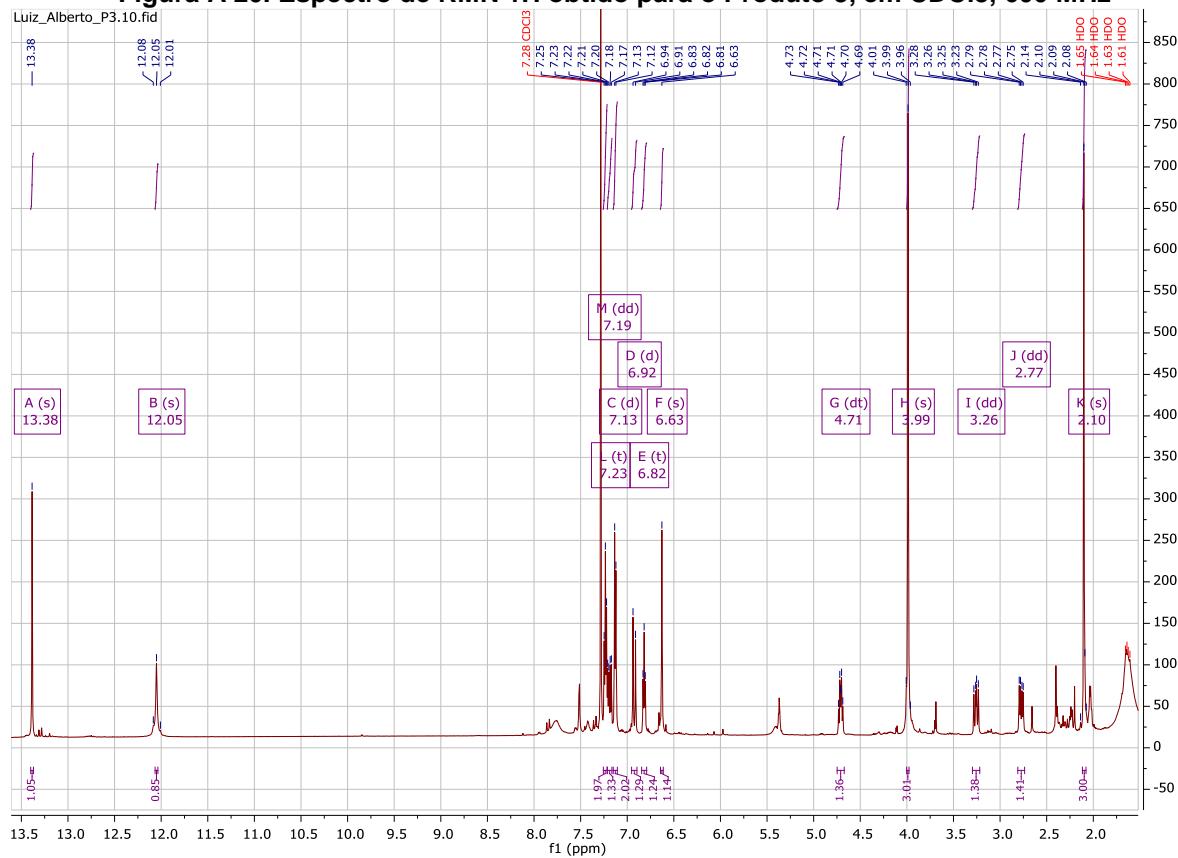
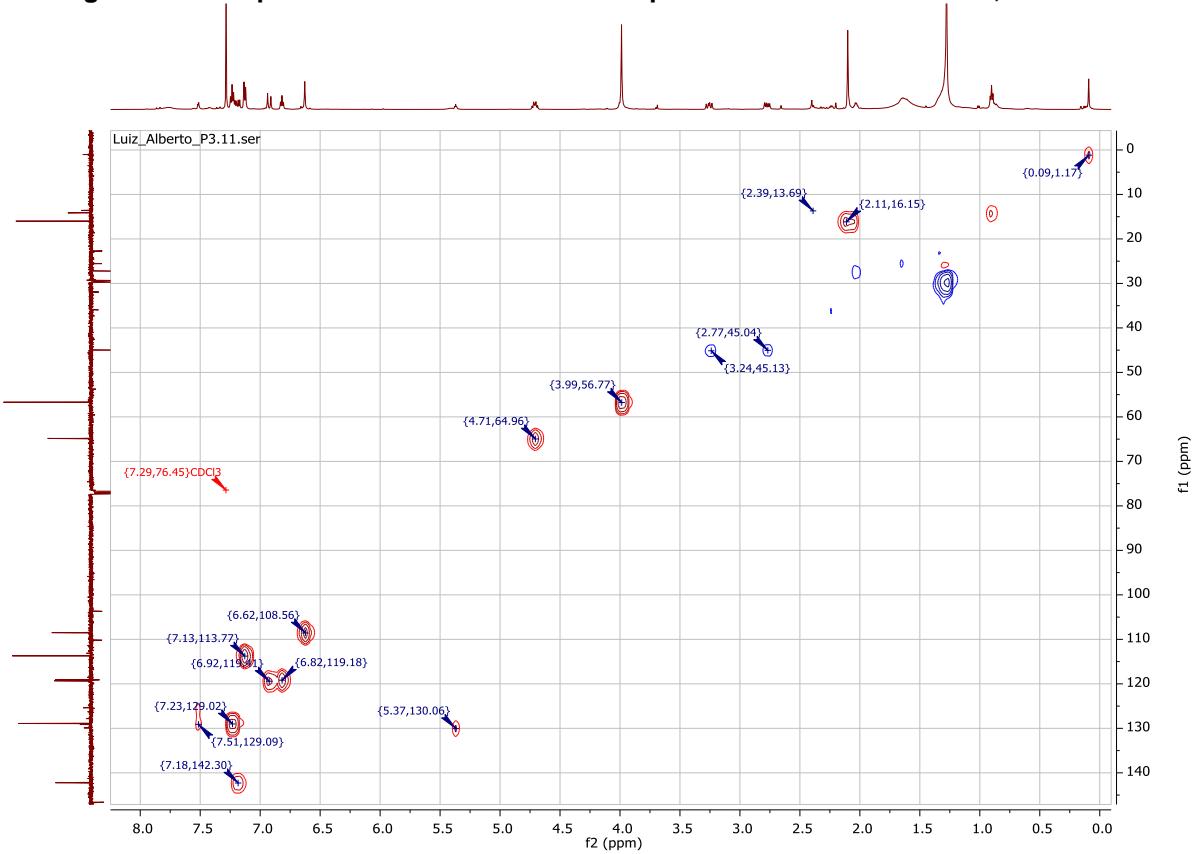
Figura A 20. Espectro de RMN 1H obtido para o Produto 3, em CDCl3, 600 MHz**Figura A 21. Mapa de contornos HMQC obtido para o Produto 3 em CDCl3, 600 MHz**

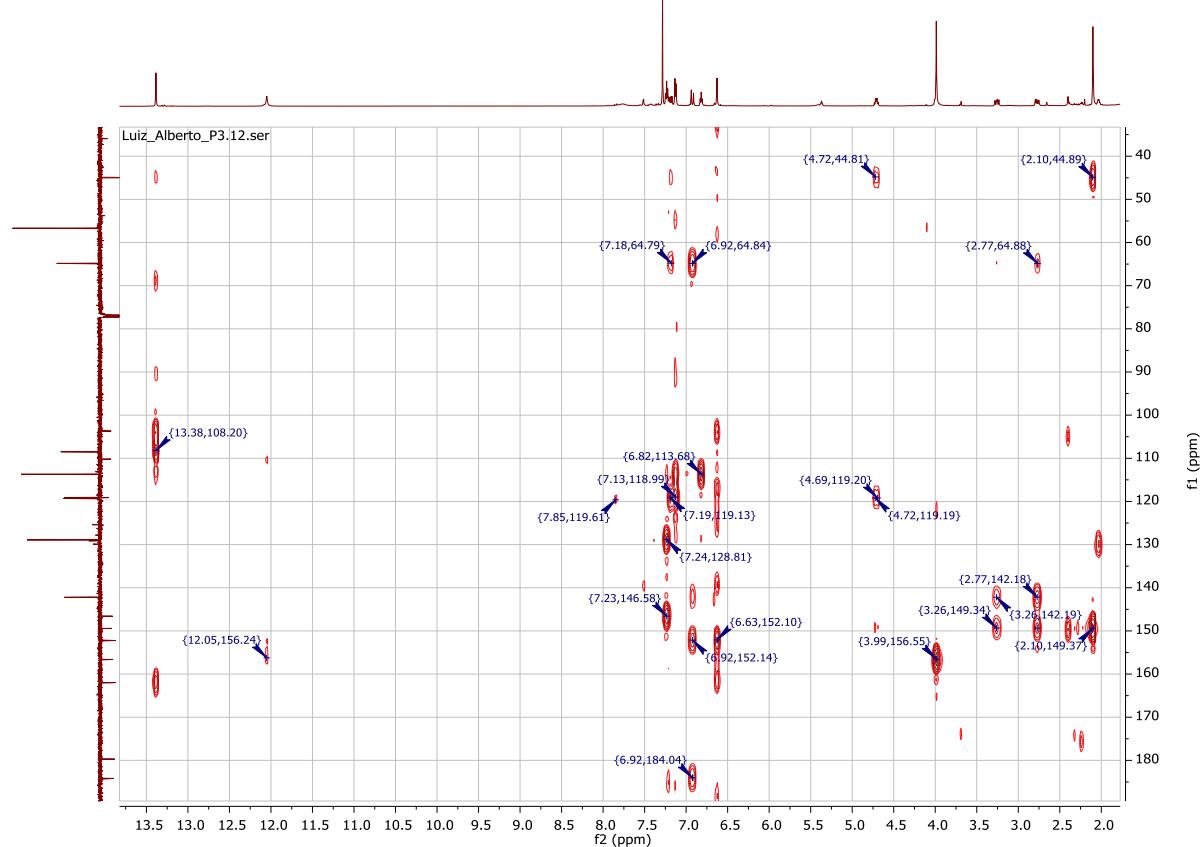
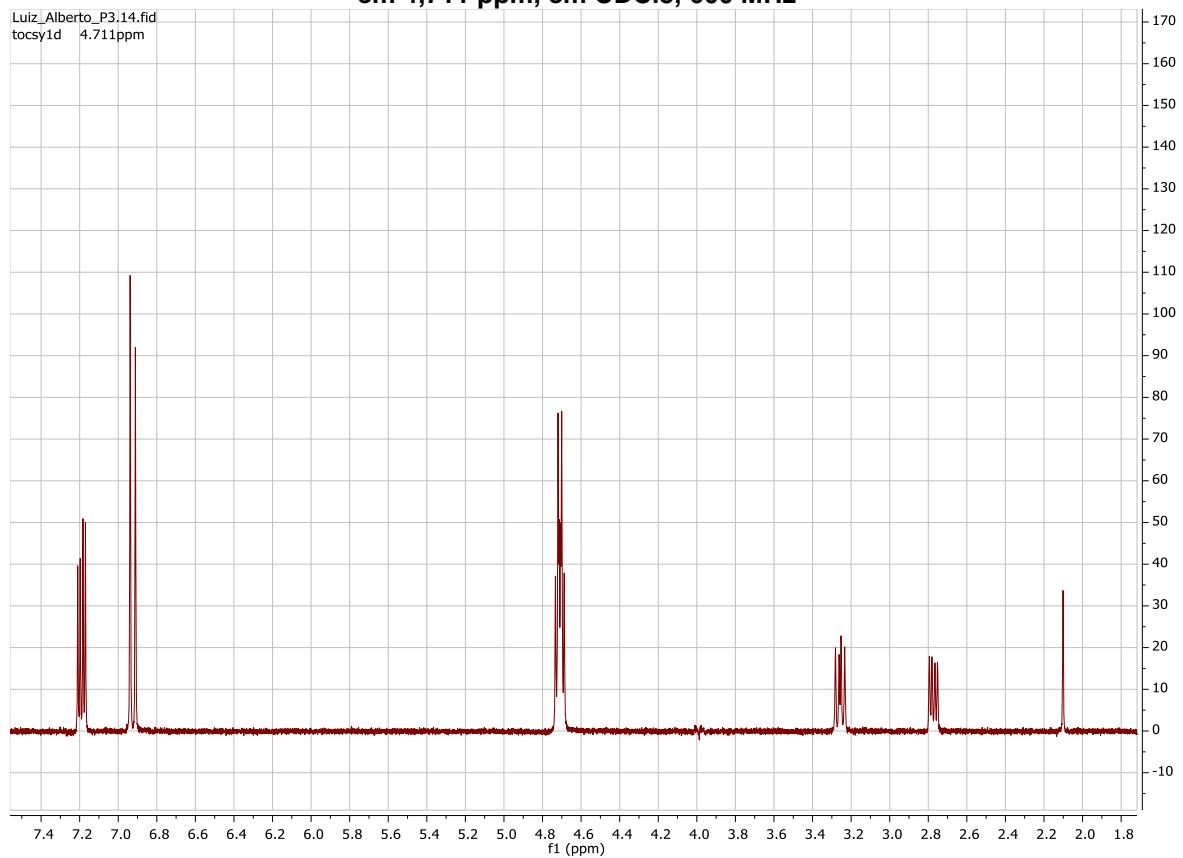
Figura A 22. Mapa de contornos HMBC obtido para o Produto 3 em CDCl₃, 600 MHz**Figura A 23. Espectro de RMN TOCSY obtido para o Produto 3, com irradiação no Hidrogênio em 4,711 ppm, em CDCl₃, 600 MHz**

Figura A 24. Espectro de massas de alta resolução obtidos no modo positivo. O Produto 4 possui fórmula molecular $C_{23}H_{18}N_2O_6$ correspondendo a massa exata calculada de 418,1165 u para a molécula desprotonada, apresentando um erro de 4,305 ppm comparado com o observado no espectro.

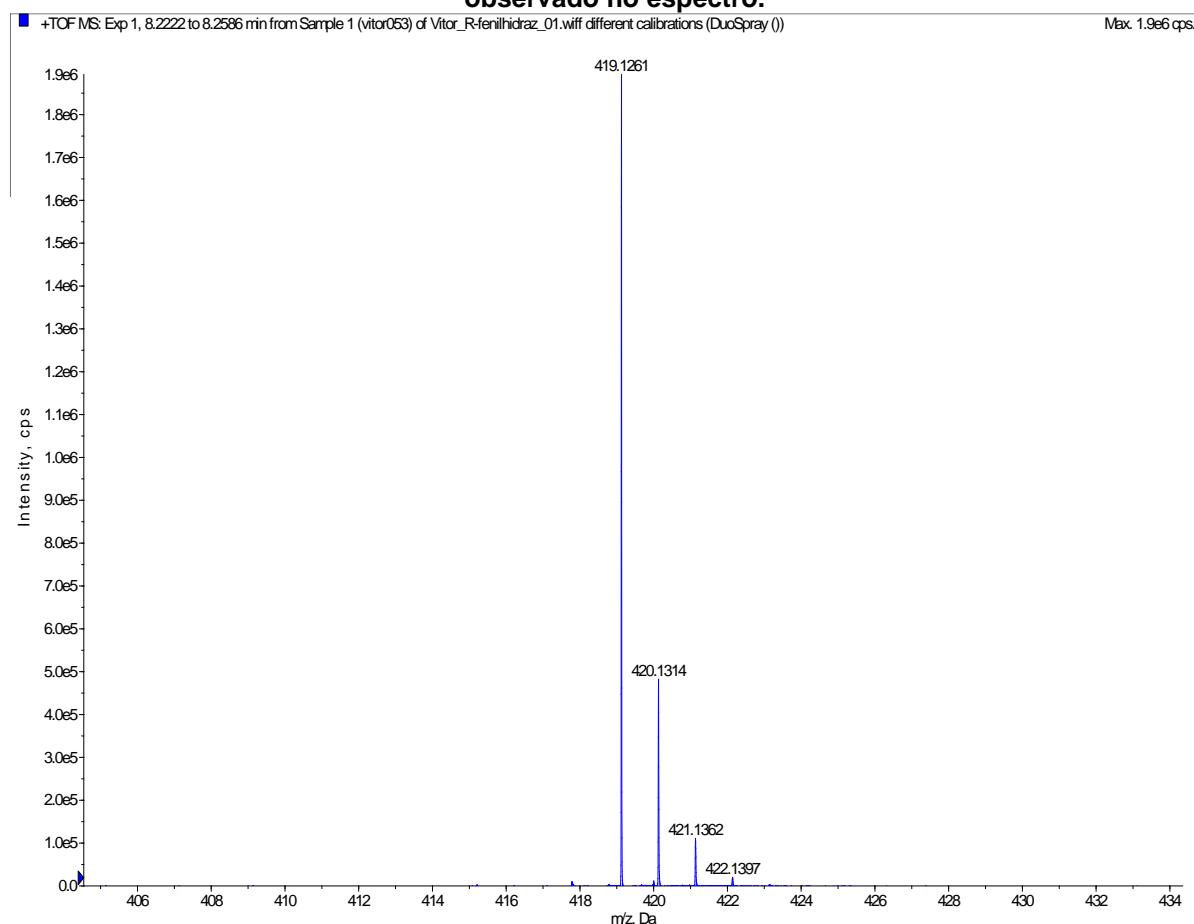


Figura A 25. Espectro de RMN ^1H obtido para o Produto 4, em CDCl_3 , 600 MHz

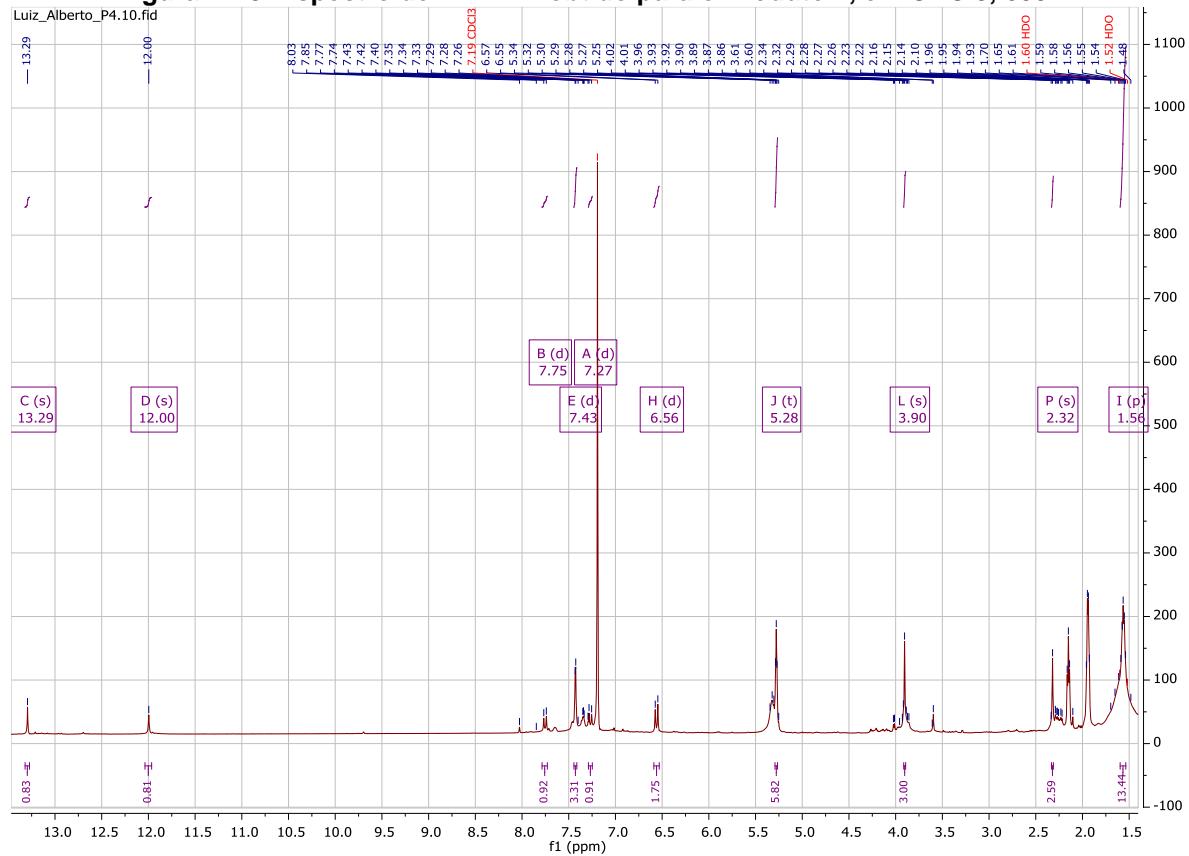


Figura A 26. Mapa de contornos HMQC obtido para o Produto 4, em CDCl₃, 600 MHz.

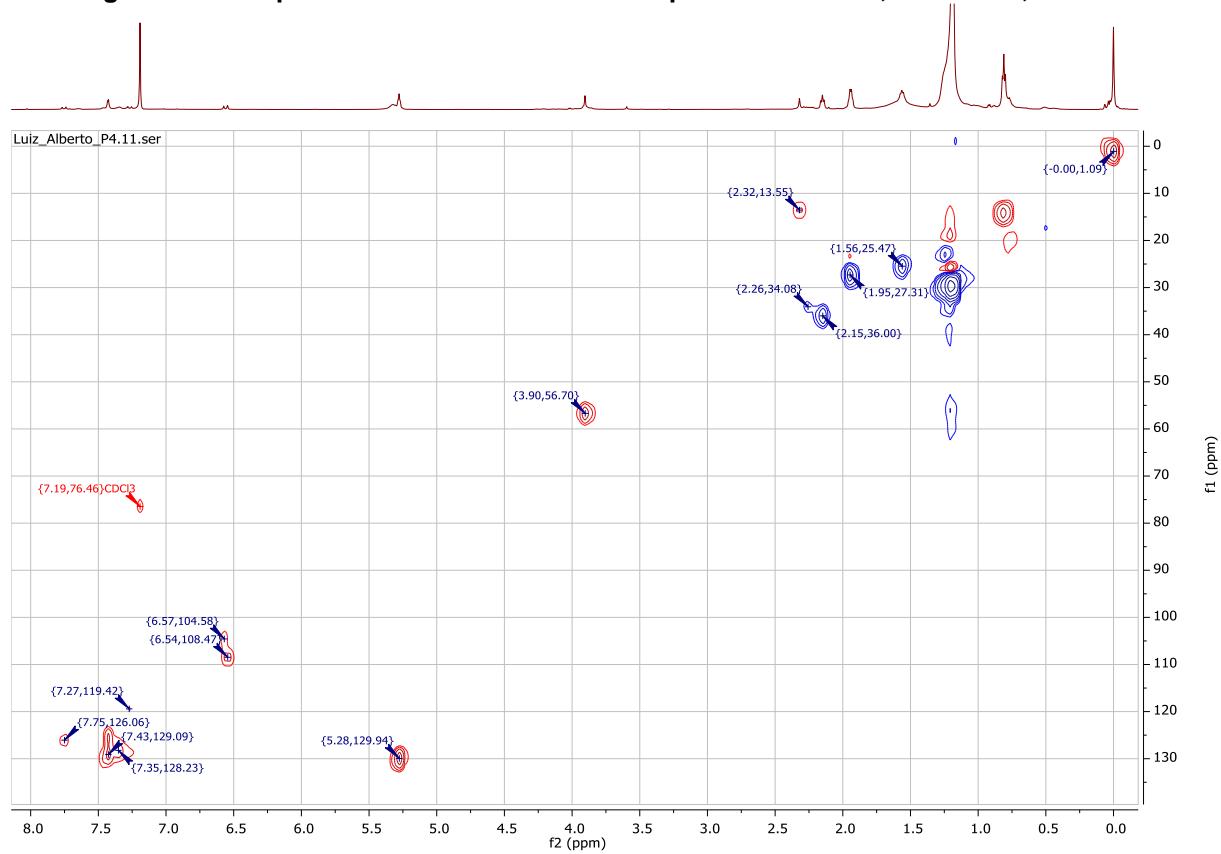
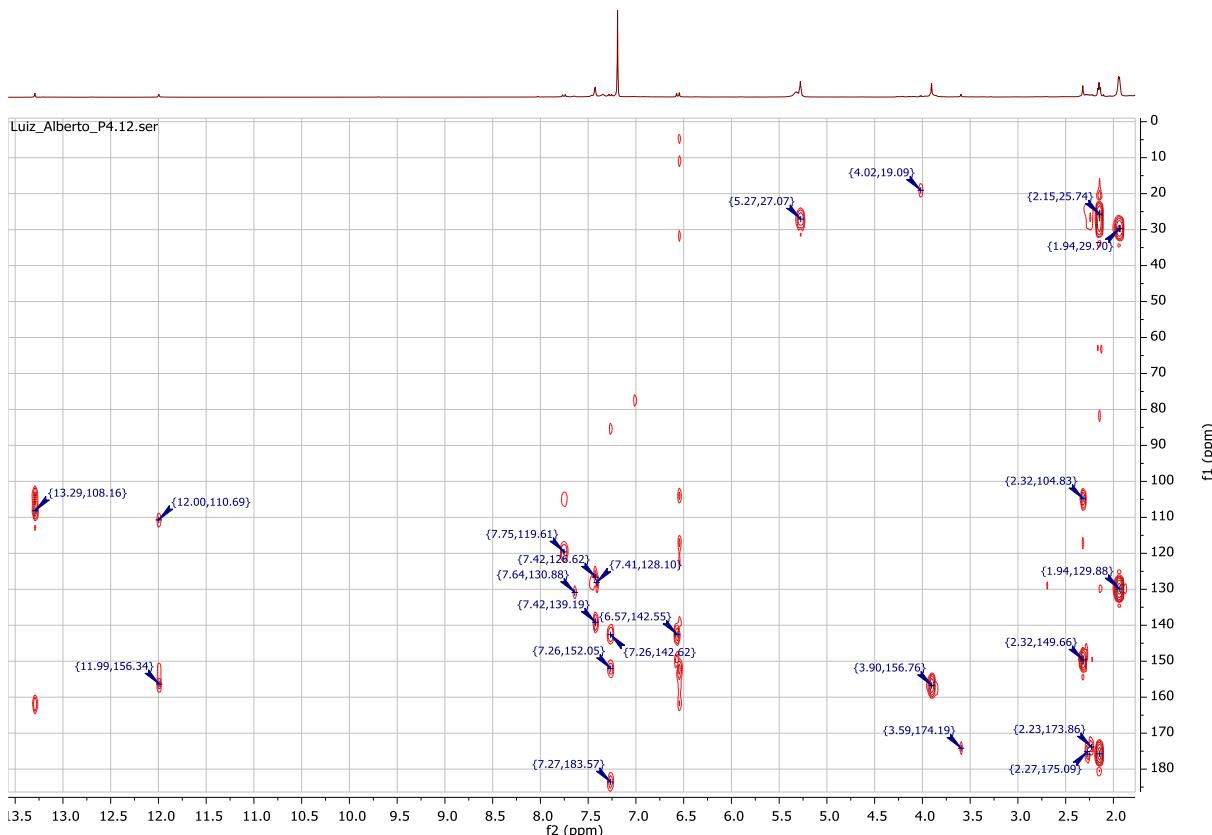


Figura A 27. Mapa de contornos HMBC obtido para o Produto 4, em CDCl₃, 600 MHz

8. Referências

- ¹ Shi, Q.W.; Li, L.G.; Huo, C.H.; Zhang, M.L.; Wang, Y.F. *Study on natural medicinal chemistry and new drug development*. Chin. Tradit. Herb. Drugs **2010**, *41*, 1583–1589.
- ² Fabricant, D.S.; Farnsworth, N.R. *The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery*. Environ. Health Perspect. **2001**, *109*, 69–75.
- ³ Yuan, H.; Ma, Q.; Piao, G.; *The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products*. Molecules **2016**, *21*, 559.
- ⁴ Zhang, L.H.; Li, J. *Current situation and developing trends of modernization of traditional Chinese Medicine*. J. Zhejiang Univ. Med. Sci. **2011**, *40*, 349–353.
- ⁵ Chan, K.; Shaw, D.; Simmonds, M.S.; Leon, C.J.; Xu, Q.; Lu, A.; Sutherland, I.; Ignatova, S.; Zhu, Y.P.; Verpoorte, R.; et al. *Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese materia medica*. J. Ethnopharmacol. **2012**, *140*, 469–475.
- ⁶ Tu, P.F.; Guo, H.Z.; Guo, D.A. *Researches on active constituents of natural and traditional medicine and development of new drugs*. J. Peking Univ. Health Sci. **2002**, *34*, 513–518.
- ⁷ Guo, Z.; *The modification of natural products for medical use*. Acta Pharmaceutica Sinica B. **2017**, *7*(2), 119–136.
- ⁸ Ting, I. P.; *Plant physiology*. NY: Addison Wesley Series in Life Sciences. **1982**.
- ⁹ Bernards, M. A.; *Plant natural products: a primer*. Canadian Journal of Zoology, **2010**, *88*, 601-6014
- ¹⁰ Pinho, B. R.; Sousa C.; Oliveira J. M. A.; Valentão P.; Andrade P. B.; *Naphthoquinones' biological activities and toxicological effects*. In: Bitterlich A, Fischl S. (Eds.) *Bioactive compounds: Type, biological activities and health effects*. New York: Nova Science Publishers; **2012**. p. 181-218.
- ¹¹ Edreva, A.; Velikova, V.; Tsonev, T.; Dagnon, S.; Gürel, A.; Aktaş, L.; Gesheva, E.; *Stress protective role of secondary metabolites: Diversity of functions and mechanisms*. General and Applied Plant Physiology, **2008**, *34*, 67-78.
- ¹² Thomson, R. H.; (1987). *Naturally Occurring Quinones*. Vol. 111, **1987**. London: Chapman & Hall.
- ¹³ Bruneton, J.; *Pharmacognosy: Phytochemistry Medicinal Plants*. **1999**, 2nd Edition. Hampshire, UK: Intercept Ltd.

- ¹⁴ P. Babula, V. Adam, L. Havel, R. Kizek, *Curr. Pharm. Anal.* **2009**, 5, 47.
- ¹⁵ H. Y. Qiu, P. F. Wang, Z. Z. Wang, Y. L. Luo, D. Q. Hu, J. L. Qi, G. H. Lu, Y. J. Pang, R. W. Yang, H. L. Zhu, *RSC Adv.* **2016**, 6, 83003.
- ¹⁶ D. Raghu, D. Karunagaran, *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 1130.
- ¹⁷ Y. Kumagai, Y. Shinkai, T. Miura, A. K. Cho, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, 52, 221.
- ¹⁸ Nowicka, B.; Kruk, J.; *Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones*. *Biochimica et Biophysica ACTA*, **2010**, 1797, 1587-1605
- ¹⁹ Li, C. J.; Wang, C.; Pardee, A. B.; *Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells*. *Cancer Research*, **2009**, 55, 3712-3715
- ²⁰ O'brien, P. J.; *Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity*. **1991**, *Chemico-Biological Interactions*, 80, 1-41.
- ²¹ Buffinton, G. D.; Öllinger, K.; Brunmark, A.; Cadenas, E.; *DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4aphtoquinone derivates and glutathionyl-quinone conjugates*. **1989**, *Biochemical Journal*, 257, 561-571
- ²² J. Nordberg, E. S. Arner, *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, 31, 1287
- ²³ Qiu, H.; Wang, P.; Lin, H.; Tang, C.; Zhu, H.; Yang, Y; *Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents*. **2018**, *Chem. Biol. Drug. Des.* 91, 681-690.
- ²⁴ W. R. Wilson, M. P. Hay, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11, 393.
- ²⁵ Brasier, A. R.; *The NF-Kb regulatory network*. **2006**, *Cardiovascular Toxicology*, 6, 110-130.
- ²⁶ Chen X, Yang L, Oppenheim JJ and Howard MZ: *Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives*. **2002**, *Phytother Res* 16: 199-209.
- ²⁷ Xu Y, Xu X, Gao X, Chen H and Geng L; *Shikonin suppresses IL-17-induced VEGF expression via blockage of JAK2/STAT3 pathway*. **2014**, *Int Immunopharmacol* 19: 327-333.
- ²⁸ Yoon Y, Kim YO, Lim NY, Jeon WK and Sung HJ; *Shikonin, a ingredient of Lithospermum erythrorhizon induced apoptosis in HL60 human premyelocytic leukemia cell line*. **1999**, *Planta Med* 65: 532-535.
- ²⁹ Jing, H.; Sun, Q.; Fan, J.; Zhang, Y.; Yang, J.; Jia, J.; Li, J.; Guo, J.; Luo, S.; Zheng, Y.; *Shikonin induces poptosis of HaCaT cells via the mitochondrial, Erk and Akt pathways*. **2016**, *Molecular medicine reports*, 13, 3009-3016
- ³⁰ Curtin, M.E.; *Harvesting profitable products from plant tissue culture*. *Biotechnology*, **1983**, 1, 649-657.
- ³¹ Silva, J. M.; Pinto, M. C. F. R.; Simone, C. A.; Soares, J. G.; Reys, J. R. M.; Filho, J. D. S.; Harrison, W. T. A.; Carvalho, C. E. M.; Goulart, M. O. F.; Junior, E. N. S.; Pinto, A. V.; *Synthesis and characterisation of a new polycyclic phenazine from 1,4-naphthoquinone*. **2011**, *Tetrahedron Letters*, 52, 2415-2418
- ³² Neves-Pinto, C.; Malta, V. R. S.; Pinto, M. C. F. R.; Santos, R. H. A.; de Castro, S. L.; Pinto, A. V. J. *Med. Chem.* **2002**, 45, 2112.
- ³³ Yan, J.; Liu, W.; Cai, J.; Li, D.; Hua, H.; Cao, H.; *Advances in Phenazines over the Past Decade: Review of Their Pharmacological Activities, Mechanisms of Action, Biosynthetic Pathways and Synthetic Strategies*. **2021**, *Mar. Drugs.* 19, 610.
- ³⁴ Dandawate, P.; Khan, E.; Padhye, S.; Gaba, H.; Sinha, S.; Deshpande, J.; Swamy, K. V.; Khetmalas, M.; Ahmad, A.; Sarkar, F.H.; *Synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxic activity of novel plumbagin hydrazones against breast cancer cells*. **2012**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 3104-3108
- ³⁵ Carvalho, C. E. M.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Harrison, W. *Heterocyclic derivatives from natural occurring naphthoquinones: synthesis, characterization and X-ray structure of beta-lapachone hydrazo compounds*. **2002**, *Dyes and Pigments*, 52, 209-214.
- ³⁶ Unagul, P.; Wongsa, P.; Kittakoop, P.; Intamas, S.; Srikitkulchai, P. Tanticharoen, M.; *Production of red pigments by the insect pathogenic fungus Cordyceps unilateralis BCC 1869*. **2005**, 32, 135-140
- ³⁷ Mendonça, J. N.; *Estudo químico de micro-organismos na produção de corantes naturais*. Tese de doutorado na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.
- ³⁸ George, R. F.; Kandeel, M.; El-Ansary, D. Y.; El Kerdawy, A. M. *Some 1,3,5-trisubstituted pyrazoline derivatives targeting breast cancer: Design, synthesis, cytotoxic activity, EGFR inhibition and molecular docking*. **2020**. *Bioorganic Chemistry* 99 (2020) 103780.
- ³⁹ Reis, W.J.; Bozzi, I.A.O.; Ribeiro, M.F.; Halicki, P.C.B.; Ferreira, L.A.; da Silva, P.E.A.; Ramos, D.F.; de Simone, C.A.; Júnior, E.N.S. *Design of hybrid molecules as antimycobacterial compounds: Synthesis of isoniazid-naphthoquinone derivatives and their activity against susceptible and resistant strains of Mycobacterium tuberculosis*. **2019**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 27(2019) 4143-4150.

⁴⁰ Kappe, C. O.; Pieber, B.; Dallinger, D. *Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality?* **2013**. Angew. Chem. Int. Ed. **2013**, 52, 1088 – 1094.