

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE  
CAULIBUGULONAS E ANÁLOGOS**

**ALMIR ANDREÃO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
MAIO DE 2010

# **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE CAULIBUGULONAS E ANÁLOGOS**

**ALMIR ANDREÃO**

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Muniz de Lacerda Miranda

**Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
MAIO DE 2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

28/2010

Andreão, Almir

Síntese e avaliação da atividade anticancerígena de caulibugulonas e análogos / Almir Andreão. – Campos dos Goytacazes, 2010.

xxvi, 146 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) --Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2010.

Orientador: Paulo César Muniz de Lacerda Miranda.

Área de concentração: Ciências Naturais.

Bibliografia: f. 122-125.

1. Caulibugulonas 2. Isoquinolino-5,8-dionas 3. Anticancerígeno 4. Produtos naturais 5. Síntese I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título

# SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE CAULIBUGULONAS E ANÁLOGOS

**ALMIR ANDREÃO**

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais

Aprovada em 25 de fevereiro de 2010.

Comissão Examinadora:

---

Dr. Walter Luiz Brasil Medeiros – IF Fluminense - Campus Campos/RJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana Aparecida Giacomini - UENF

---

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro - UENF

---

Prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda - UENF  
(Orientador)

“Dedico esta tese a minha esposa Patrícia e ao meu filho Felipe, meus pais e irmãos, pessoas queridas que somaram um sentido especial em minha vida”

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo.

À minha família que sempre me apoiou em todos os momentos, pela educação, carinho, confiança e motivação.

À minha querida esposa Patrícia pela paciência, incentivo e carinho.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Centro de Ciências e Tecnologias, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Aos Professores Dr. Paulo Miranda e Dra. Rosana Giacomini, pela orientação segura e competente, pela dedicação, atenção e liberdade durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Milton Masahiko Kanashiro e ao mestrando Willian de Freitas do CBB-UENF pela disponibilidade e realização das análises com as células cancerígenas.

Aos colegas de laboratório: Karla, Juliana, Leonardo, Letícia, Lindomar, Neidemar, Max, Marlon e Carol, pela amizade construída e consolidada durante este período de doutorado, companheirismo, sugestões e ajudas experimentais, conselhos, e troca de informações.

Aos funcionários do CCT, em especial ao Ulisses, ao Robson, ao Roberto, ao Édson, à Tânia e à Marisa, pela atenção e disponibilidade.

À FAPERJ-UENF pela bolsa concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A vida é aquilo que  
você deseja diariamente.”  
André Luiz

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	xii
Lista de esquemas .....	xix
Lista de tabelas .....	xxii
Lista de abreviaturas .....	xxiii
Resumo .....	xxiv
Abstrato .....	xxv

## CAPÍTULO 1

<b>SÍNTESE DE CAULIBUGULONAS E ANÁLOGOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Caulibugulonas – metabólitos de origem marinha .....	1
1.2. Isoquinolinas .....	2
1.3. Sínteses de Isoquinolinas .....	5
1.3.1. Reação de Pomeranz-Fritsh .....	5
1.3.2. Reação de Bischler-Napieralski .....	7
1.3.3. Reação de Pictet-Gams .....	9
1.3.4. Reação de Pictet-Spengler .....	9
1.4. Reações de Isoquinolinas .....	11
1.4.1. Nitração .....	11
1.4.2. Sulfonação .....	11
1.4.3. Halogenação .....	12
1.4.4. Substituição nucleofílica aromática.....	13

1.4.5. Redução .....	13
1.4.6. Alquilação e Arilação .....	15
1.4.7. Aminação .....	16
1.4.8. Hidroxilação .....	16
1.5. Sistemas derivados de isoquinolinas .....	17
1.5.1. Hidroxiderivados .....	17
1.5.2. Aminoderivados .....	18
1.5.3. Alquilderivados .....	18
1.5.4. Ácidos .....	20
1.5.5. Sais quaternários de isoquinolínio .....	20
1.6. Aminoisoquinolinoquinonas .....	23
1.6.1. Sínteses de Aminoisoquinolinoquinonas .....	23
1.6.2. Caulibugulonas .....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA E PROPOSTA DE TRABALHO .....</b>	<b>34</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
3.1. Preparação da isoquinolino-5,8-diona [45] .....	36
3.2. Preparação da N-2,5-dimetoxibenziliden-N-2,2-dimetoxietilamina [42] .	38
3.3. Preparação da N-[2,2-dimetoxietil]-N-[2,5-dimetoxibenzil]amina [43] ....	40
3.4. Preparação da 5,8-dimetoxiisoquinolina [44] .....	43
3.5. Preparação da isoquinolino-5,8-diona [45] .....	46
3.6. Preparação da caulibugulona A [35] .....	48
3.7. Substituições no carbono 7 de isoquinolino-5,8-dionas .....	53
3.8. Estudos de RMN para a caulibugulona A .....	55
3.9. Preparação da caulibugulona D [38] e do análogo [46] .....	57
3.10. Preparação da 6,7-dicloroisoquinolino-5,8-diona [32] .....	59
3.11. Isoquinolino-5,8-dionas derivadas da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] . .....	61
3.12. Preparação das alquiloisoquinolino-5,8-dionas [37], [47] e [48] .....	62
3.13. Preparação das arilisoquinolino-5,8-dionas [33], [49], [50], [51] e [52]	64

<b>4. METODOLOGIA</b> .....	69
4.1. Instrumentos para caracterização das substâncias sintetizadas .....	70
<b>5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	72
5.1. Preparação da <i>N</i> -2,5-dimetoxibenziliden- <i>N</i> -2,2-dimetoxietilamina [42] .	72
5.2. Preparação da <i>N</i> -[2,2-dimetoxietil]- <i>N</i> -[2,5-dimetoxibenzil]amina [43] ....	72
5.3. Preparação da 5,8-dimetoxiisoquinolina [44] .....	73
5.4. Preparação da isoquinolino-5,8-diona [45] .....	74
5.5. Preparação da caulibugulona A [35] .....	74
5.6. Preparação da caulibugulona D [38] .....	75
5.7. Preparação da 7-( <i>N</i> -fenilamino)isoquinolino-5,8-diona [46] .....	75
5.8. Preparação da 6,7-dicloroisoquinolino-5,8-diona [32] .....	76
5.9. Preparação da 6-cloro-7-( <i>N</i> -metilamino)isoquinolino-5,8-diona [37] .....	76
5.10. Preparação da 6-cloro-7-( <i>N</i> -butilamino)isoquinolino-5,8-diona [47] .....	77
5.11. Preparação da 6-cloro-7-( <i>N</i> - <i>terc</i> -butilamino)isoquinolino-5,8-diona [48] .....	77
5.12. Preparação da 6-cloro-7-( <i>N</i> -fenilamino)isoquinolino-5,8-diona [33] .....	78
5.13. Preparação da 6-cloro-7-( <i>N</i> -2-bromofenilamino)isoquinolino-5,8- diona [49] .....	78
5.14. Preparação da 6-cloro-7-( <i>N</i> -4-bromofenilamino)isoquinolino-5,8- diona [50] .....	79
5.15. Preparação da 6-cloro-7-( <i>N</i> -2-metoxifenilamino)isoquinolino-5,8- diona [51] .....	79
5.16. Preparação da 6-cloro-7-( <i>N</i> -2-etoxifenilamino)isoquinolino-5,8-diona [52] .....	80

## CAPÍTULO 2

<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE CAULIBUGULONAS E ANÁLOGOS .....</b>	<b>81</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
2.1. Ensaio de Viabilidade Celular, Morte Celular por Necrose e Morte Celular por Apoptose .....	86
2.1.1. Isoquinolino-5,8-diona [35] (Caulibugulona A) .....	88
2.1.2. Isoquinolino-5,8-diona [37] (Caulibugulona C) .....	89
2.1.3. Isoquinolino-5,8-diona [38] (Caulibugulona D) .....	91
2.1.4. Isoquinolino-5,8-diona [46] .....	92
2.1.5. Isoquinolino-5,8-diona [47] .....	95
2.1.6. Isoquinolino-5,8-diona [48] .....	98
2.1.7. Isoquinolino-5,8-diona [33] .....	101
2.1.8. Isoquinolino-5,8-diona [49] .....	104
2.1.9. Isoquinolino-5,8-diona [50] .....	107
2.1.10. Isoquinolino-5,8-diona [51] .....	110
2.1.11. Isoquinolino-5,8-diona [52] .....	113
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>116</b>
3.1. Culturas de células .....	116
3.2. Quantificação e ajuste das culturas .....	116
3.3. Diluição e armazenamento das isoquinolino-5,8-dionas .....	116
3.4. Determinação da citotoxicidade celular .....	117
3.5. Ensaio Metabólico do MTT .....	118
3.6. Microscopia de fluorescência .....	119

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>120</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>122</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>126</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

Figura 1 -	Estrutura da isoquinolina [1] .....	2
Figura 2 -	Estrutura da papaverina [2] .....	3
Figura 3 -	Estruturas da coclaurina [3] e da norarmepavina [4] .....	3
Figura 4 -	Estruturas das naftilisoquinolinas [5], [6] e [7] .....	4
Figura 5 -	Estruturas da elipticina [8], da olivacina [9] e da janetina [10]	4
Figura 6 -	Mansouramicinas isoladas de <i>Cribrochalina</i> sp.....	23
Figura 7 -	Quinonas monossubstituídas [11] e dissubstituídas [12] .....	24
Figura 8 -	Estruturas de derivados N-substituídos de 1,4-naftoquinona [13] e 5,8-quinolinoquinona [14] .....	25
Figura 9 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-quinona [30] com o carbono 7 elétron deficiente .....	29
Figura 10 -	Estrutura de isoquinolino-5,8-dionas cloradas dissubstituídas nas posições 6 e 7 [31] .....	29
Figura 11 -	Estruturas das caulibugulonas A [35], B [36], C [37] e D [38].	31
Figura 12 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [45] .....	36
Figura 13 -	Isoquinolino-5,8-dionas com potencial atividade anticancerígena .....	37
Figura 14 -	Estrutura da imina [42] .....	38
Figura 15 -	Estrutura da imina [42] com os carbonos numerados. ....	40
Figura 16 -	Estrutura da amina [43] .....	40
Figura 17 -	Estrutura da amina [43] com os carbonos numerados .....	42
Figura 18 -	Estrutura da 5,8-dimetoxiisoquinolina [44] .....	43
Figura 19 -	Estrutura da isoquinolinodimetoxilada [44] com os carbonos numerados .....	45
Figura 20 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [45] .....	46

Figura 21 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [45] com os hidrogênios numerados .....	48
Figura 22 -	Estrutura da caulibugulona A [35] .....	49
Figura 23 -	Espectro no infravermelho da Caulibugulona A [35] .....	50
Figura 24 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da caulibugulona A [35] .....	51
Figura 25 -	Estrutura da caulibugulona A [35] com os carbonos numerados .....	52
Figura 26 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da caulibugulona A [35] .....	52
Figura 27 -	Estrutura da caulibugulona A [35] com hidrogênios e carbonos numerados .....	55
Figura 28 -	Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ -HMBC] da caulibugulona A [35] .....	56
Figura 29 -	Posição correta dos grupos amínicos na caulibugulona A e análogos .....	56
Figura 30 -	Estruturas da caulibugulona D [38] e da isoquinolino-5,8-diona [46] .....	57
Figura 31 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] .....	61
Figura 32 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [37] .....	62
Figura 33 -	Estruturas das isoquinolino-5,8-dionas [47] e [48] .....	63
Figura 34 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [33] .....	66
Figura 35 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [49] .....	66
Figura 36 -	Estruturas das isoquinolino-5,8-dionas [50] e [51] com os hidrogênios numerados .....	67
Figura 37 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [51] com os hidrogênios numerados .....	67
Figura 38 -	Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [52] com os hidrogênios numerados .....	68
Figura 39 -	Caulibugulonas A, C, D e análogos sintetizados .....	69

## CAPITULO 2

Figura 1 - Estruturas do gás mostarda (I) e do ácido fólico (II) .....	83
Figura 2 - Isoquinolino-5,8-dionas utilizadas na avaliação da atividade anticancerígena .....	85
Figura 3 - Efeitos citotóxicos da caulibugulona A [35], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	88
Figura 4 - Efeitos citotóxicos da caulibugulona C [37], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	89
Figura 5 - Efeitos citotóxicos da caulibugulona D [38], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	91
Figura 6 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [46], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	92
Figura 7 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [46], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação .....	93
Figura 8 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [46], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação .	93
Figura 9 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [46], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação ....	94
Figura 10 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [47], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	95
Figura 11 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [47], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação .....	96
Figura 12 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [47], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação .	96

Figura 13 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [47], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação ....	97
Figura 14 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [48], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	98
Figura 15 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [48], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação .....	99
Figura 16 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [48], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação .	99
Figura 17 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [48], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação ....	100
Figura 18 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [33], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	101
Figura 19 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [33], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação .....	102
Figura 20 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [33], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação .	102
Figura 21 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [33], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação ....	103
Figura 22 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [49], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	104
Figura 23 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [49], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação .....	105
Figura 24 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [49], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação .	105
Figura 25 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [49], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação ....	106
Figura 26 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [50], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	107

Figura 27 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [50], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação .....	108
Figura 28 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [50], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação .	108
Figura 29 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [50], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação ....	109
Figura 30 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [51], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	110
Figura 31 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [51], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação .....	111
Figura 32 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [51], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação .	111
Figura 33 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [51], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação ....	112
Figura 34 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [52], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação ....	113
Figura 35 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [52], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação .....	114
Figura 36 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [52], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação .	114
Figura 37 -	Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [52], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação ....	115

## APÊNDICE

Figura 1A -	Espectro de massas da imina [42] .....	127
Figura 2A -	Espectro no infravermelho da imina [42] .....	127
Figura 3A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da imina [42] .....	128
Figura 4A -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da imina [42] ....	129
Figura 5A -	Espectro de massas da amina [43] .....	130
Figura 6A -	Espectro no infravermelho da amina [43] .....	130
Figura 7A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da amina [43] ....	131
Figura 8A -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da amina [43] ...	132
Figura 9A -	Espectro de massas da isoquinolina [44] .....	133
Figura 10A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da amina [44].	133
Figura 11A -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da isoquinolina [44] .....	134
Figura 12A -	Espectro de massas da isoquinolino-5,8-diona [45] .....	135
Figura 13A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da isoquinolino- 5,8-diona [45] .....	135
Figura 14A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Caulibugulona D [38] .....	136
Figura 15A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Isoquinolino- 5,8-diona [46] .....	137
Figura 16A -	Espectro de massas da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32]	138
Figura 17A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Isoquinolino- 5,8-diona diclorada [32] .....	132
Figura 18A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Caulibugulona C [37] .....	139
Figura 19A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Isoquinolino- 5,8-diona [47] .....	140
Figura 20A -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Isoquinolino- 5,8-diona [48] .....	141

Figura 21A - Espectro de massas da isoquinolino-5,8-diona [33] .....	142
Figura 22A - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Isoquinolino-5,8-diona [33] .....	142
Figura 23A - Espectro no infravermelho da Isoquinolino-5,8-diona [49] .....	143
Figura 24A - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Isoquinolino-5,8-diona [50] .....	144
Figura 25A - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Isoquinolino-5,8-diona [51] .....	145
Figura 26A - Espectro de massas da isoquinolino-5,8-diona [52] .....	146

## LISTA DE ESQUEMAS

### CAPITULO 1

Esquema 1 - Síntese de imina através da condensação do dietilacetal com o aminoacetaldeído .....	5
Esquema 2 - Síntese de isoquinolina através da ciclização de imina .....	5
Esquema 3 - Síntese de isoquinolina com grupos eletroretiradores no anel aromático .....	6
Esquema 4 - Síntese de isoquinolinas 7-substituídas .....	6
Esquema 5 - Síntese de isoquinolinas substituídas no carbono-1 .....	7
Esquema 6 - Desidrogenação de diidroisoquinolinas .....	8
Esquema 7 - Ciclização na posição <i>para</i> ao grupo ativante em amidas <i>meta</i> -substituídas .....	8
Esquema 8 - Síntese de isoquinolinas a partir de aminas potencialmente insaturadas .....	9
Esquema 9 - Síntese de 1,2,3,4-tetraidroisoquinolinas a partir de aminas do tipo (2-feniletil)-amina e aldeídos em meio ácido .....	10
Esquema 10- Reação de ciclização com anel aromático ativado com substituintes hidroxílicos .....	10
Esquema 11- Reação de nitração de isoquinolinas .....	11
Esquema 12- Reações de sulfonação de isoquinolinas a baixas e altas temperaturas .....	12
Esquema 13- Halogenação de isoquinolinas .....	12
Esquema 14- Substituição seletiva em 3-haloisoquinolinas .....	13
Esquema 15- Redução seletiva dos anéis da isoquinolina .....	13
Esquema 16- Redução de isoquinolinas com $\text{LiAlH}_4$ .....	14
Esquema 17- Redução de sais <i>N</i> -alquiloisoquinolínio com $\text{NaBH}_4$ em meio prótico .....	14
Esquema 18- Alquilação ou arilação de isoquinolinas .....	15
Esquema 19- Alquilação de isoquinolinas utilizando reagentes de Grignard .....	15

Esquema 20-	Síntese de 1-aminoisoquinolinas utilizando $\text{KNH}_2$ e amônia	16
Esquema 21-	Síntese de 1-isoquinolona utilizando KOH .....	16
Esquema 22-	Tautomeria de isoquinolinas hidroxiladas na posição 1 .....	17
Esquema 23-	Formas cetônica e fenólica de isoquinolinas hidroxiladas na posição 3 .....	17
Esquema 24-	Tautomeria de 1-aminoisoquinolina e de 6-aminoisoquinolina .....	18
Esquema 25-	Tautomeria de 3-aminoisoquinolina .....	18
Esquema 26-	Condensação de isoquinolinas com grupo alquila na posição $\alpha$ ao nitrogênio em meio básico como ácido .....	19
Esquema 27-	Descarboxilação de ácidos isoquinolino-1-carboxílicos .....	20
Esquema 28-	Adição de nucleófilos organometálicos, hidróxidos e hidretos a sais de quaternários de isoquinolínio .....	21
Esquema 29-	Reações do sal de N-acilisoquinolínio com cianeto - processos de Reissert .....	21
Esquema 30-	Síntese de heterocíclicos substituídos utilizando compostos de Reissert .....	22
Esquema 31-	Desprotonação de N-alquilderivados de isoquinolínio na posição 1 .....	22
Esquema 32-	Síntese de aminoquinonas por adição direta de aminas .....	24
Esquema 33-	Reação de aminação de quinona halogenada .....	25
Esquema 34-	Síntese da 2-amino-1,4-naftoquinona [17] com ácido hidrazóico .....	26
Esquema 35-	Síntese da 2-amino-8-hidroxi-naftoquinona [19] com azida de sódio .....	26
Esquema 36-	Síntese da 6-amino-2,4-dimetilquinolino-5,8-quinona [21] a partir da 2,4-dimetilquinolino-5,8-quinona [20] com ácido hidrazóico .....	27
Esquema 37-	Síntese da 2-amino-1,4-naftoquinona [22] com difenilsulfimida ou metilfenilsulfimida .....	27

Esquema 38-	Síntese da 2,5-diaminobenzoquinona [24] a partir da 2,5-dimetoxibenzoquinona [23] com amônia em etanol .....	28
Esquema 39-	Síntese da 2-metóxi-1,4-naftoquinonas ou da 6-metoxiquinolina-5,8-quinona .....	28
Esquema 40-	Síntese da 7-aminoisoquinolinoquinona [29] a partir da 7-bromoisoquinolinoquinona [27] por reação com azida sódica e trifenilfosfina .....	29
Esquema 41-	Reação de substituição na 6,7-dicloroisoquinolino-5,8-diona [32] .....	30
Esquema 42-	Estruturas de ressonâncias para isoquinolino-5,8-diona diclorada .....	30
Esquema 43-	Síntese da 7-aminoisoquinolinoquinona [34] .....	31
Esquema 44-	Síntese da caulibugulona A [35] a partir do 5-hidroxiisoquinolino [39] .....	32
Esquema 45-	Síntese da caulibugulona B [36] a partir da caulibugulona A [35] e da caulibugulona C [37] a partir da caulibugulona A [35] .....	32
Esquema 46-	Síntese da caulibugulona D [38] a partir do 5-hidroxiisoquinolino [39] .....	33
Esquema 47-	Rota de síntese empregada na obtenção das isoquinolinas [44] e [45] .....	35
Esquema 48-	Mecanismo para a preparação da imina [42] e da amina [43] .....	43
Esquema 49-	Esquema geral das sínteses das isoquinolino-5,8-dionas [35], [38] e [46] .....	48
Esquema 50-	Estruturas de ressonância para as isoquinolino-5,8-dionas	54
Esquema 51-	Síntese da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] .....	59
Esquema 52-	Esquema geral da síntese das alquilisoquinolino-5,8-dionas cloradas .....	61
Esquema 53-	Esquema geral da síntese das arilisoquinolino-5,8-dionas	64

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

Tabela 1 -	Principais sinais do EM para a imina [42] .....	39
Tabela 2 -	Principais sinais do EM para a amina [43] .....	41
Tabela 3 -	Principais sinais do EM para a 5,8-dimetoxiisoquinolina [44] ...	44
Tabela 4 -	Principais sinais do EM para a isoquinolino-5,8-diona [45] .....	47
Tabela 5 -	Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ da caulibugulona A [35] sintética, comparados com valores citados na literatura .....	51
Tabela 6 -	Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ da caulibugulona A [35] sintética, comparados com valores citados na literatura .....	53
Tabela 7 -	Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no espectro de HMBC da caulibugulona A [35] .....	55
Tabela 8 -	Principais dados de RMN $^1\text{H}$ para as isoquinolino-5,8-dionas [38] e [46] .....	58
Tabela 9 -	Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ da caulibugulona D [38] sintética, comparados com valores citados na literatura .....	58
Tabela 10 -	Principais sinais do EM para a isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] .....	60
Tabela 11 -	Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ da caulibugulona C [37] sintética, comparados com valores citados na literatura .....	63
Tabela 12 -	Principais dados de RMN $^1\text{H}$ para as isoquinolino-5,8-dionas [47] e [48] .....	64
Tabela 13 -	Principais sinais do EM para a isoquinolino-5,8-diona clorada [33] .....	65
Tabela 14 -	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para as arilisoquinolino-5,8-dionas [39], [40] e [41] .....	67
Tabela 15 -	Principais sinais do EM para a arilisoquinolino-5,8-diona [52].	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
$\text{CDCl}_3$	Deuteroclorofórmio
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
DCM	Diclorometano
d	duplete
dd	duplo duplete
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilssulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
$\text{Et}_2\text{O}$	Éter dietílico
EtOAc	Acetato de etila
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
IV	Infravermelho
m	multiplete
Me	Metila
MeOH	Metanol
m/z	Razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica
PENDANT	Polarization enhancement nurtured during attached nucleus testing
APTS	Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
$R_f$	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	simpleto
t	triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
$\delta$	Deslocamento químico

## RESUMO

A busca de solução para a cura do câncer é um trabalho constante conduzido pela pesquisa química. No presente trabalho foram sintetizadas as caulibugulonas A [35], C [37] e D [38] e uma série de análogos com potencial atividade anticancerígena e com a rota sintética ainda não descrita na literatura. Estas substâncias foram preparadas, inicialmente, a partir da condensação da 2,2-dimetoxietanamina com o 2,5-dimetoxibenzaldeído, levando à obtenção da *N*-2,5-dimetoxibenziliden-*N*-2,2-dimetoxietilamina, convertida em duas etapas na 5,8-dimetoxiisoquinolina. Como material de partida, essa isoquinolina foi utilizada no preparo das caulibugulonas A [35], C [37] e D [38], de quatro isoquinolino-5,8-dionas, de nove isoquinolino-5,8-dionas cloradas. A avaliação da atividade cancerígena dessas substâncias foi feita em ensaios preliminares, sob condições de laboratório, com as células cancerígenas U937 (leucêmica humana), MOLT4 (leucêmica humana), COLO205 (colon humano) e H460 (pulmão humano), nas concentrações de 0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 2,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 4,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Nesses bioensaios, as isoquinolino-5,8-dionas 7-(*N*-fenilamino)isoquinolino-5,8-diona [46] e 6-cloro-7-(*N*-fenilamino)isoquinolino-5,8-diona [33] demonstraram os maiores efeitos de citotoxicidade sobre as células cancerígenas testadas. Nos ensaios referentes às atividades citotóxica e citostática, sob condições de laboratório, num período de incubação de 48 horas, somente a isoquinolino-5,8-diona [33] apresentou apenas atividade citotóxica e as isoquinolino-5,8-dionas [49] e [50] apresentaram apenas atividade citostática. Os resultados deste trabalho sugerem a realização de novos ensaios, com outras espécies de células e também com alguns tipos de enzimas, testando outras formulações e doses, a fim de se obter conclusão definitiva sobre o potencial anticancerígeno das substâncias sintetizadas.

## ABSTRACT

The search for a solution for the cure of cancer is a constant work lead by chemical research. In the present work the caulibugulones A [35], C [37] and D [38] were synthesized a series of analogs with potential anticarcinogenic activity and the synthetic route yet not described in literature. These substances were prepared, initially, from the condensation of the 2,2-dimethoxyetanamine with the 2,5-dimethoxybenzaldehyde, obtaining from it the N-2,5-dimethoxybenzyliden-N-2,2-dimethoxyetylamine, converted in two phases to the 5,8-dimethoxyisoquinoline. As an starting material this isoquinoline was used in the preparation of the caulibugulones A [35], C [37] and D [38], of four isoquinolin-5,8-diones, of nine chloride isoquinolin-5,8-diones. The evaluation of the carcinogenic activity of these substances was made in preliminary sampling, under lab conditions, with carcinogenic U937 cells (human leukemia), MOLT4 (human leukemia), COLO205 (human colon) and H460 (human lung), in the concentrations of  $0,25 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . In these bioassays, the isoquinolin-5,8-diones 7-(N-phenylamine)isoquinolin-5,8-dione [46] and 6-chlorine-7-(N-fenilamine) isoquinolin-5,8-dione [33] demonstrated the largest effects of the citotoxicity regarding the tested carcinogenic cells. In the samplings regarding the citotoxic and citostatic activities, under lab conditions, in a 48 hour incubation period, only the isoquinolin-5,8-dione [33] presented only citotoxic activity and the isoquinolin-5,8-diones [49] and [50] presented just citostatic activity. The results of this work suggest the making of new samplings, with other cellular species and also with some kinds of enzymes, testing other formulas and doses, so as to obtain definite conclusion regarding the synthesized compounds anticarcinogenic potential.

## CAPÍTULO 1

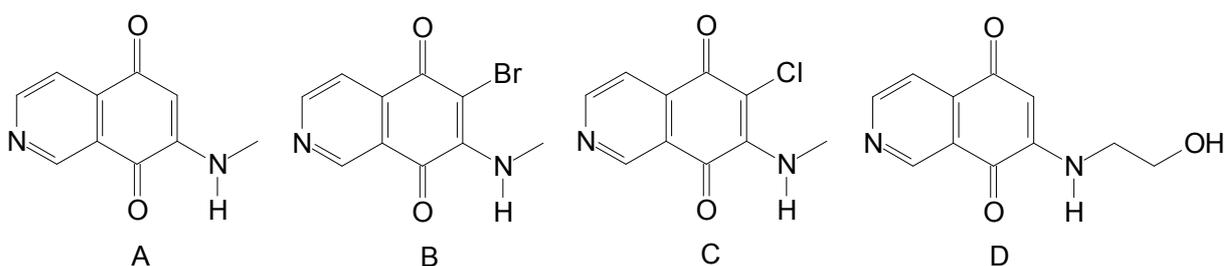
### SÍNTESE DE CAULIBUGULONAS E ANÁLOGOS

#### 1. Introdução

##### 1.1. Caulibugulonas - metabólitos de origem marinha

Produtos naturais marinhos têm se tornado um campo cada vez mais comum de pesquisa ao longo dos últimos anos. Mais de 12000 novas substâncias já foram descritas a partir de organismos marinhos, ainda que o meio marinho permaneça relativamente inexplorado, em comparação com o meio terrestre (JIMENEZ *et alii*, 2009).

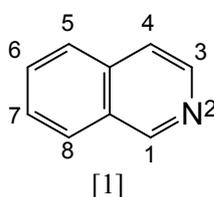
Metabólitos secundários de briozoários têm uma grande variedade de estruturas. Uma coleção do briozoário marinho *Caulibugula Intermis*, do Indo-Pacífico, levou ao isolamento de quatro novas isoquinolinoquinonas (caulibugulonas A, B, C e D).



Este interesse nos derivados isoquinolínicos deve-se ao amplo espectro de atividades biológicas. Estas substâncias também têm sido usadas na terapia de doenças, como antitumoral; no combate de *endo*- e *exo*-parasitos e, como antimicrobiano, entre outras (JIMENEZ *et alii*, 2009).

## 1.2. Isoquinolinas

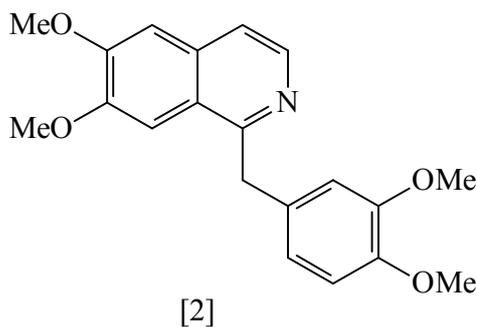
Nos últimos anos, as substâncias com esqueleto isoquinolínico [1] adquiriram grande relevância no campo da Química Orgânica por seu esqueleto fazer parte com grande frequência da estrutura molecular de muitas substâncias naturais ativas biologicamente, com propriedades antitumorais, antimicrobianas, antiinflamatórias, citotóxicas etc, e pela sua utilização como substância de partida na síntese de muitos outros produtos (KOUZNETSOV *et alii*, 2005).



**Figura 1** – Estrutura da isoquinolina [1].

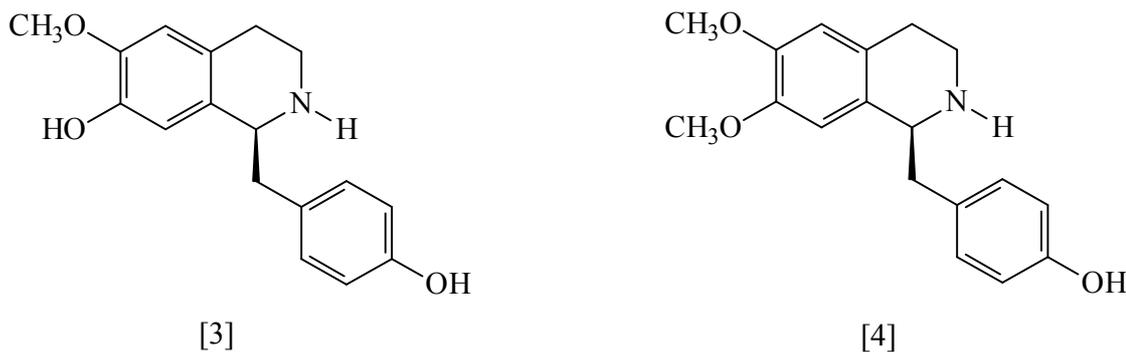
Segundo Meléndez-Gómez e Kouznetsov (2005), tanto os compostos isoquinolínicos naturais como os sintéticos são de grande interesse devido a seu amplo espectro de atividade biológica, assim como o estudo de seu modo de ação e as diversas estratégias de síntese utilizadas nas suas preparações.

A papaverina [2] e seus derivados são exemplos de alcalóides isoquinolínicos muito úteis para o tratamento de vários problemas. Dentre os principais destacam-se: vasodilatador na insuficiência circulatória cerebral, relaxante muscular da musculatura lisa, coadjuvante na melhoria dos sintomas de senilidade, redutor de risco de acidentes vasculares cerebrais, e redutor das crises de vertigens em pessoas idosas (SPEICH *et alii*, 2002).



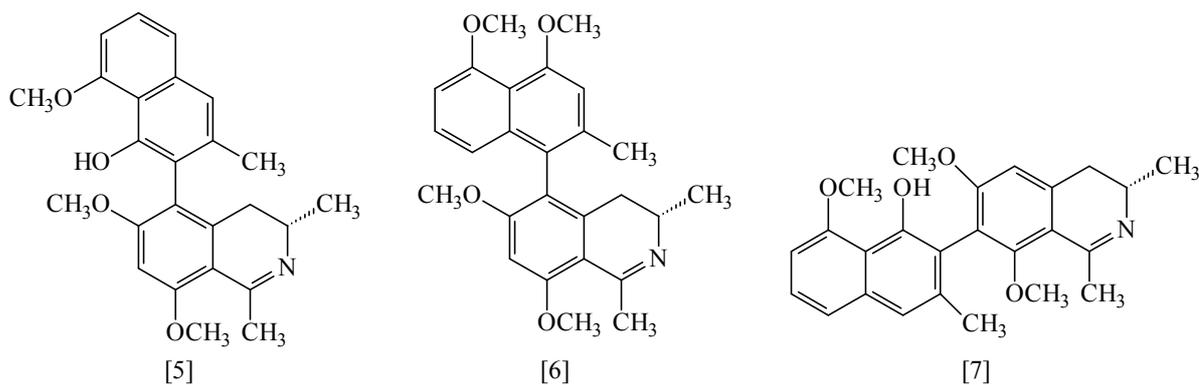
**Figura 2** – Estrutura da papaverina [2].

Segundo Ozorio e colaboradores (2006), são muitos os alcalóides isoquinolínicos com atividade antiparasitária. A coclaurina [3] e a norarmepavina [4] apresentam forte atividade contra o crescimento de epimastigoto de *Trypanosoma cruzi* com uma IC<sub>50</sub> *in vitro* ao redor de 0,30 mM.



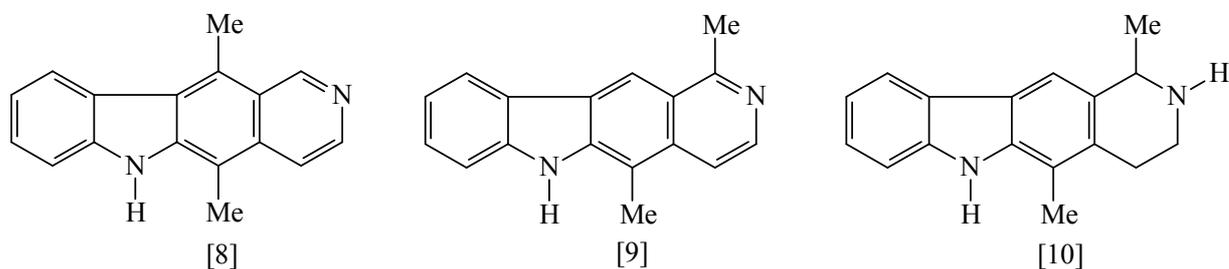
**Figura 3** – Estruturas da coclaurina [3] e da norarmepavina [4].

As naftilisoquinolinas [5], [6] e [7] são alcalóides biarílicos quirais isolados de plantas pertencentes às famílias Ancistrocladaceae e Dioncophyllaceae e têm mostrado atividades antiprotozoárias, em particular atividade antiplasmodial. Estas substâncias também mostraram forte atividade contra os parasitos *Leishmania donovani* e *T. cruzi* (OZORIO *et alii*, 2006).



**Figura 4** – Estruturas das nafilisoquinolinas [5], [6] e [7].

Outros exemplos de compostos isoquinolínicos cuja atividade antitumoral já é bastante conhecida são os alcalóides tetracíclicos elipticina [8], olivacina [9] e janetina [10] (YSHIKURA *et alii*, 2000). A elipticina, isolada pela primeira vez em 1959 da *Ocrosia elliptica*, desperta grande interesse farmacêutico devido à sua atividade antitumoral estar relacionada com a interação com o DNA (PEDERSEN *et alii*, 2005).



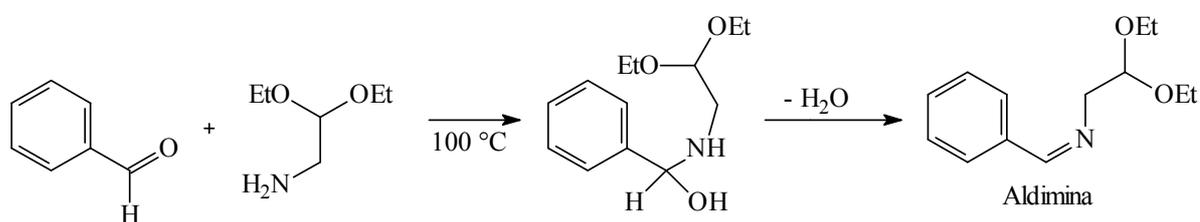
**Figura 5** – Estruturas da elipticina [8], da olivacina [9] e da janetina [10].

### 1.3. Sínteses de Isoquinolinas

#### 1.3.1. Reação de Pomeranz-Fritsh

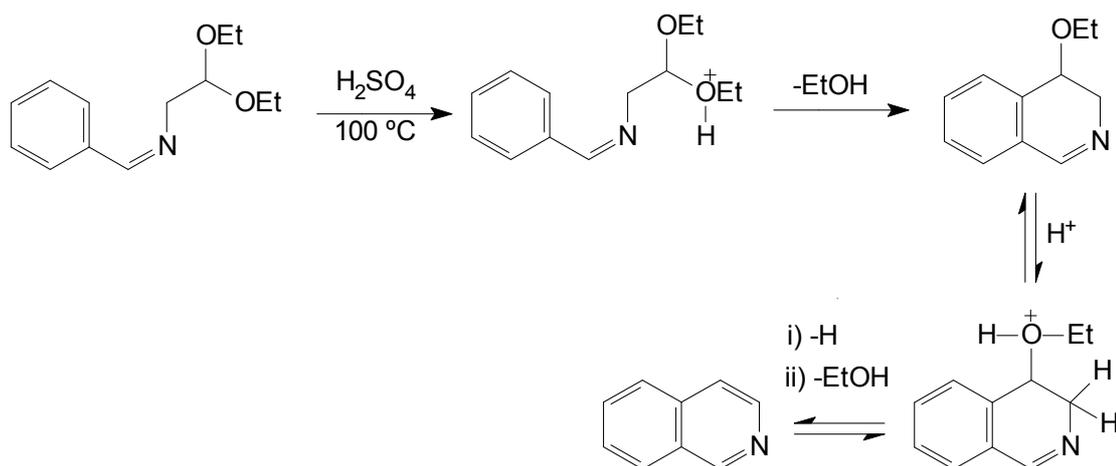
Segundo ShklyaeV (2002), a síntese de isoquinolina pelo procedimento de Pomeranz-Fritsh ocorre através de dois passos:

a) Em primeiro lugar o benzaldeído se condensa com o dietilacetal do aminoacetaldeído para formar uma imina, em condições suaves (**Esquema 1**).



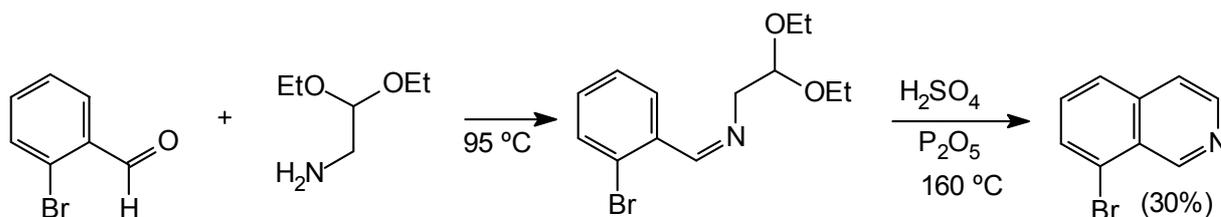
**Esquema 1** – Síntese de imina através da condensação do dietilacetal com o aminoacetaldeído.

b) A imina cicliza por tratamento com ácido forte e por eliminação de etanol produz uma isoquinolina. Um processo competitivo que reduz o rendimento do processo é a hidrólise da imina (**Esquema 2**).



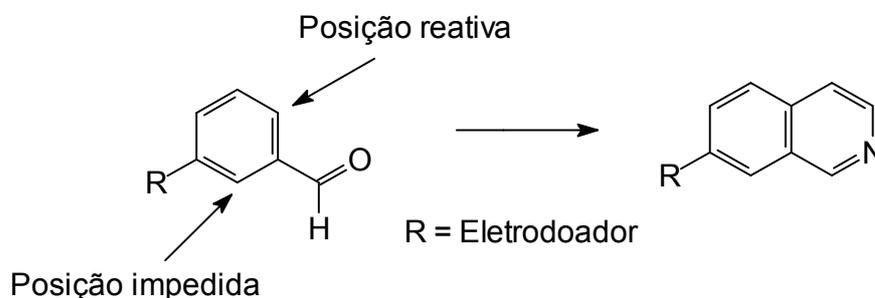
**Esquema 2** – Síntese de isoquinolina através da ciclização de imina.

Este segundo passo é uma substituição eletrofílica aromática ( $S_{EAr}$ ), e isto explica o porquê da reação se processar melhor com substituintes que aumentam a densidade eletrônica do anel aromático e pior com substituintes que a reduzem. Todavia, esta metodologia ainda é o melhor procedimento para obter isoquinolinas com grupos eletroretiradores no anel aromático (**Esquema 3**).



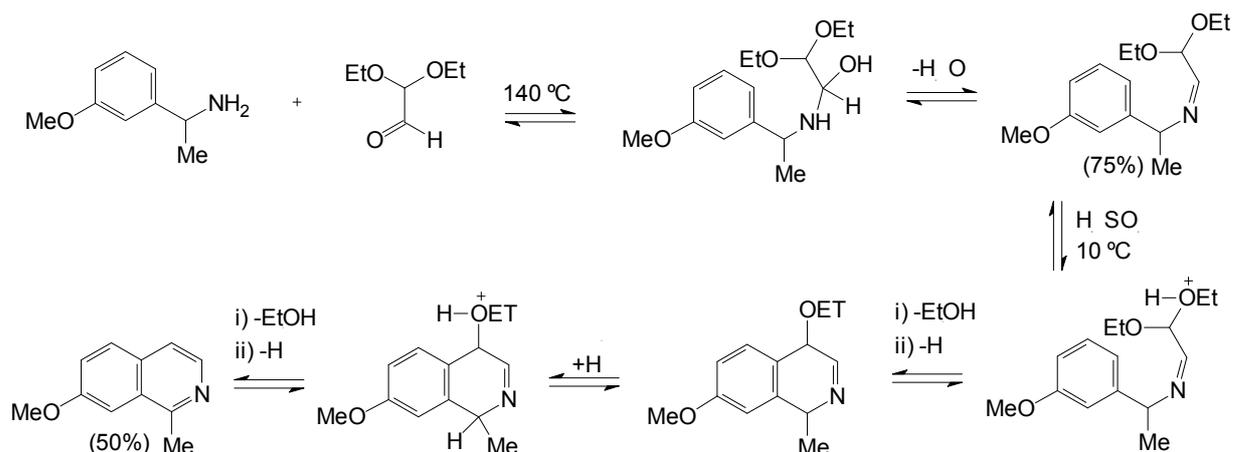
**Esquema 3** – Síntese de isoquinolina com grupos eletroretiradores no anel aromático.

Os grupos eletrodoadores em posição *meta* ao grupo formila são os que mais aceleram a reação (deslocalizam a carga nas duas posições *orto* ao ~CHO) e dirigem a ciclização na posição *para* em relação a eles dando lugar a isoquinolinas 7-substituídas, conforme o **Esquema 4**, a seguir:



**Esquema 4** – Síntese de isoquinolinas 7-substituídas.

Segundo Shklyayev (2002), este método de síntese não permite obter facilmente isoquinolinas substituídas em C-1 (**Figura 1**), pois no primeiro passo implicaria formar uma cetenimina a partir do dietilacetal de aminoacetaldeído e da cetona. Este processo, não é favorecido pelo fato da carbonila cetônica ser menos eletrofílica e mais impedida que a carbonila aldeídica. Entretanto, isoquinolinas substituídas em C-1 podem ser preparadas com uma variante deste procedimento que utiliza uma benzilamina adequadamente substituída e um dialquilacetal do glicoxal (**Esquema 5**).



**Esquema 5** – Síntese de isoquinolinas substituídas no carbono-1.

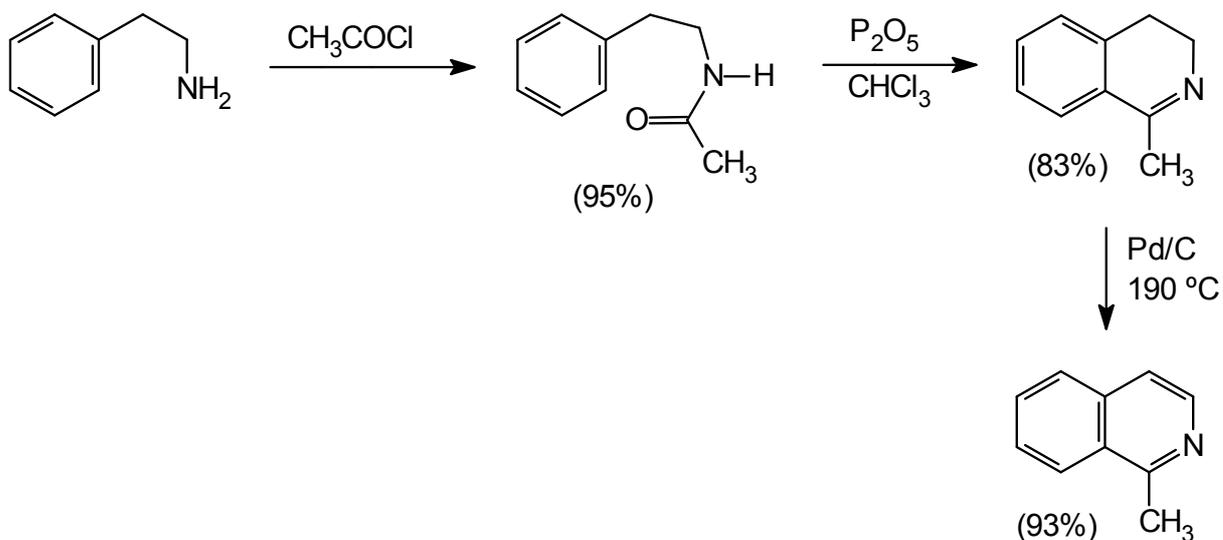
Nem o método de Pomeranz-Fritsch nem sua variante permitem obter isoquinolinas substituídas em C-3 nem em C-4, dessa forma não é um método útil para isoquinolinas substituídas no anel heteroaromático.

### 1.3.2. Reação de Bischler-Napieralski

Segundo Min e colaboradores (2004), a reação de Bischler-Napieralski implica na reação do 1-amino-2-feniletano com um cloreto ou um anidrido de ácido para formar uma amida que pode ciclizar com perda de água para dar uma 3,4-diidroisoquinolina.

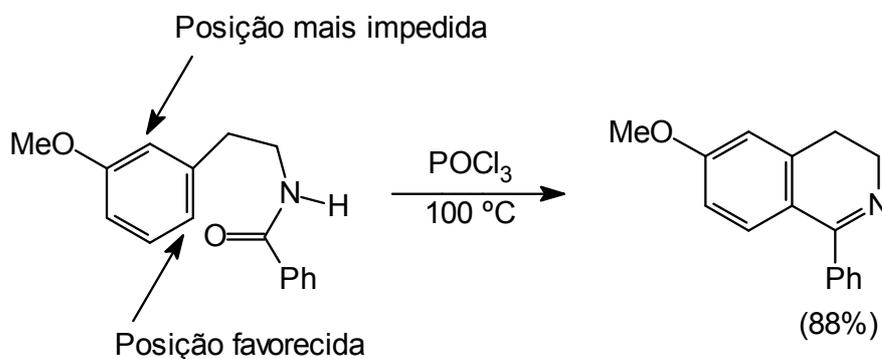
Os agentes de ciclização mais comumente utilizados são o P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (pentóxido de fósforo), o POCl<sub>3</sub> (oxicloreto de fósforo) e o SOCl<sub>2</sub> (cloreto de tionila).

As diidroisoquinolinas podem desidrogenar (oxidar) originando suas correspondentes isoquinolinas com paládio, enxofre ou dissulfeto de difenila (**Esquema 6**).



**Esquema 6** – Desidrogenação de diidroisoquinolinas.

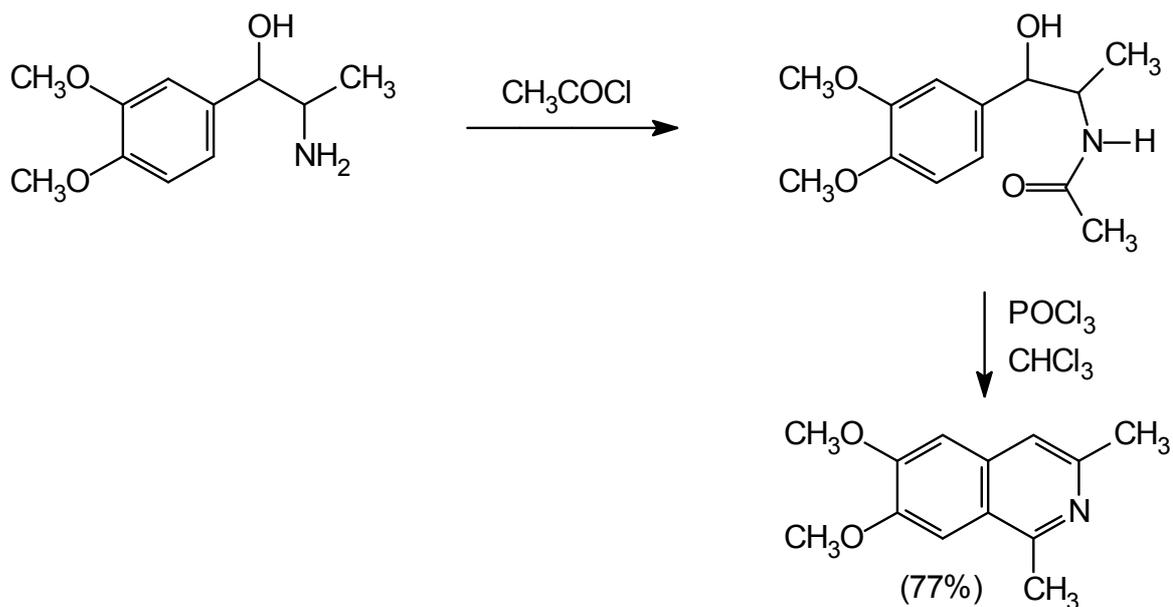
O passo de ciclização é uma  $S_{\text{E}}\text{Ar}$  e portanto será favorecido por substituintes eletrodadores no anel aromático do 1-amino-2-feniletano. As aminas *meta*-substituídas, como no exemplo a seguir, conduzem exclusivamente a isoquinolinas substituídas em C-6, pois a ciclização ocorre em *para* ao grupo ativante, conforme demonstrado no **Esquema 7**, a seguir:



**Esquema 7** – Ciclização na posição *para* ao grupo ativante em amidas *meta*-substituídas.

### 1.3.3. Reação de Pictet-Gams

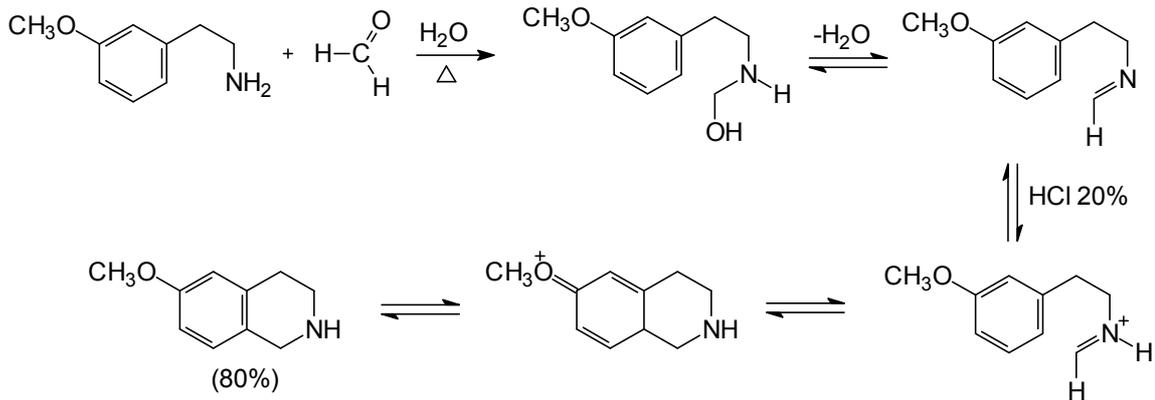
Segundo ShklyaeV (2002), a reação de Pictet-Gams é uma modificação da síntese de Bischler-Napieralski que utiliza aminas do tipo (2-feniletil)amina potencialmente insaturadas para obter assim heterociclos totalmente aromáticos e sendo, portanto, não necessário o passo da oxidação (**Esquema 8**).



**Esquema 8** – Síntese de isoquinolinas a partir de aminas potencialmente insaturadas.

### 1.3.4. Reação de Pictet-Spengler

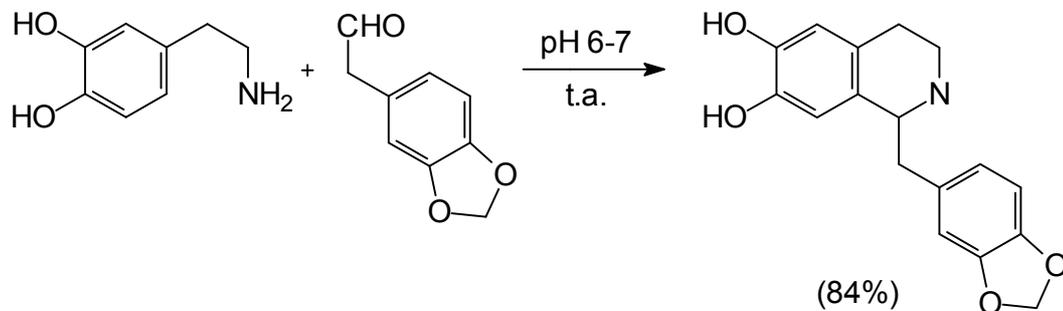
As aminas do tipo (2-feniletil)-amina também podem reagir facilmente com aldeídos e com bons rendimentos dando aldíminas que podem ciclizar em meio ácido a 1,2,3,4-tetraidroisoquinolinas. De novo a ciclização é uma  $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$  e será favorecida por substituintes eletrodadores (**Esquema 9**) (SHKLYAEV, 2002).



**Esquema 9** – Síntese de 1,2,3,4-tetraidroisoquinolinas a partir de aminas do tipo (2-feniletíl)-amina e aldeídos em meio ácido.

A ciclicação precisa de substituintes ativantes colocados adequadamente e, assim, ativando as posições *orto* ao grupo aminoetila. O fechamento do anel, sempre que possível, ocorre em *para* ao grupo ativante.

Quando o anel aromático está muito ativado com substituintes hidroxílicos o fechamento do anel ocorre em condições suaves (**Esquema 10**) (OLIVEIRA & KOIKE, 2003).



**Esquema 10** – Reação de ciclicação com anel aromático ativado com substituintes hidroxílicos.

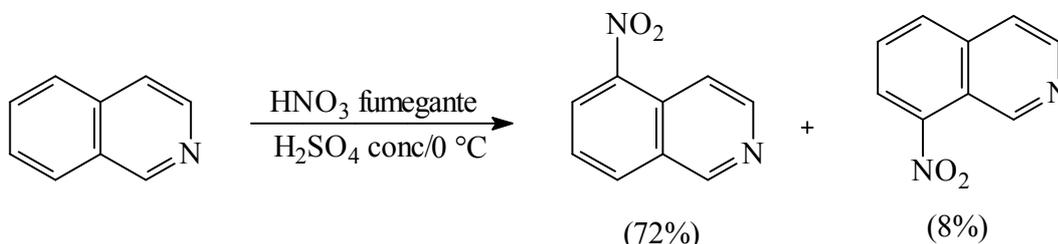
## 1.4. Reações de Isoquinolinas

Segundo Shaikh e colaboradores (1986), as mesmas reações sofridas pela piridina ocorrem com as isoquinolinas. Formam *N*-óxidos e sais quaternários apresentando basicidade similares a da piridina, O  $pK_a$  da isoquinolina é 5,4 e o da piridina 5,2.

Em condições fortemente ácidas, a substituição eletrofilica na isoquinolina ocorre preferencialmente no anel carbocíclico, Em geral é observada a substituição nas posições 5 ou 8, ou em ambas (SHAIKH *et alii*,1986).

### 1.4.1. Nitração

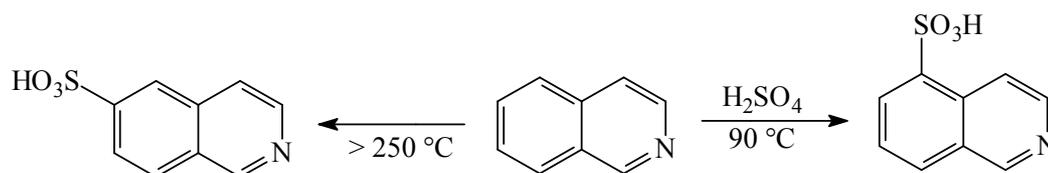
As reações de nitração da isoquinolina conduzem majoritariamente à 5-nitroisoquinolina. A reação transcorre por ataque do íon nitrônio ao heterociclo *N*-protonado (**Esquema 11**) (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 11** – Reação de nitração de isoquinolinas.

### 1.4.2. Sulfonação

Segundo Seiyaku (1966), a sulfonação conduz majoritariamente ao produto de substituição na posição 5- produzindo o respectivo ácido sulfônico. A reação a altas temperaturas leva ao produto de controle termodinâmico, o ácido 6-isoquinolinossulfônico, de acordo com o **Esquema 12**, a seguir:

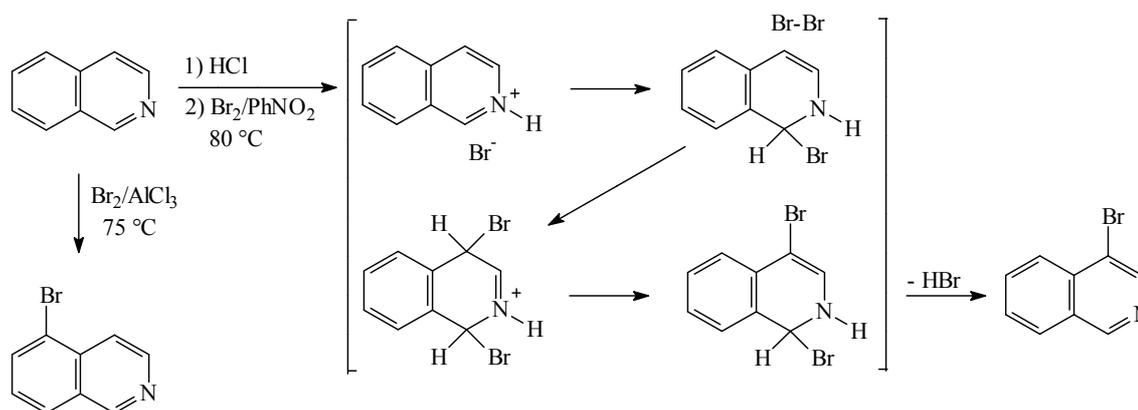


**Esquema 12** – Reações de sulfonação de isoquinolinas a baixas e altas temperaturas.

### 1.4.3. Halogenação

A halogenação de isoquinolinas é bastante complexa e os produtos obtidos dependem das condições de reação. Em presença de cloreto de alumínio as isoquinolinas se convertem com bons rendimentos em 5-haloisoquinolinas, **Esquema 13** (SEIYAKU, 1966).

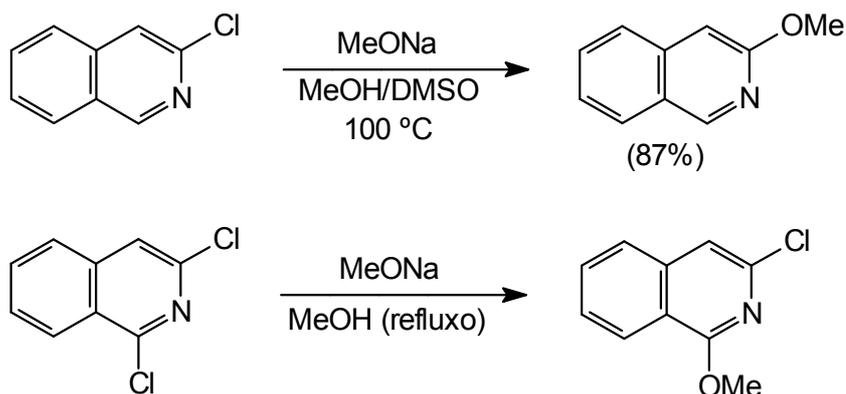
A introdução do halogênio no anel heterocíclico ocorre em condições relativamente suaves, nas quais o par de elétrons do nitrogênio inicia a sequência por interação com um eletrófilo conduzindo a 4-bromoisoquinolina. Os processos implicam em um ataque do halogênio ao sal (**Esquema 13**) (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 13** – Halogenação de isoquinolinas.

#### 1.4.4. Substituição nucleofílica aromática

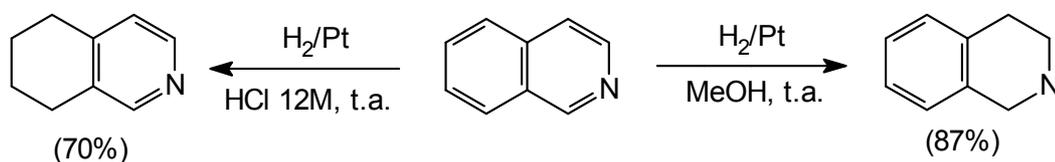
A substituição nas 3-haloisoquinolinas requer condições energéticas e, por isso, é possível uma substituição seletiva em 1,3-dicloroisoquinolinas (**Esquema 14**) (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 14** – Substituição seletiva em 3-haloisoquinolinas.

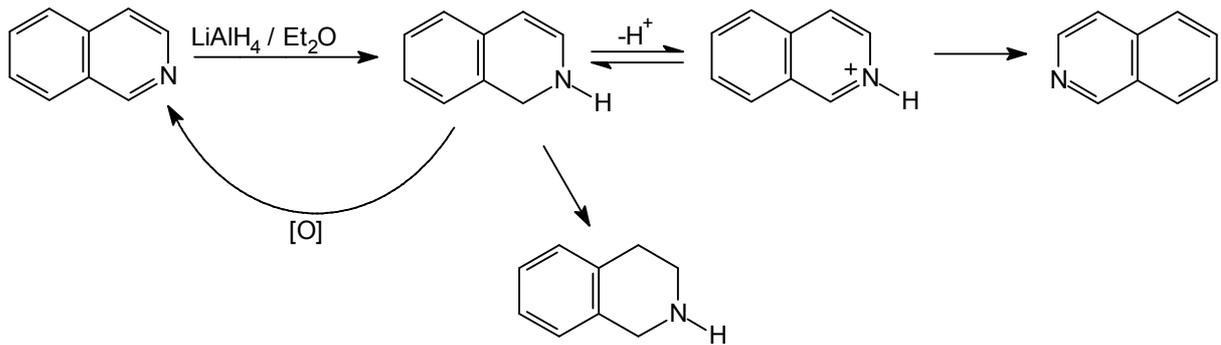
#### 1.4.5. Redução

A redução seletiva do anel heterocíclico da isoquinolina pode ser conseguida utilizando  $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$  ou por hidrogenação catalítica a temperatura ambiente. Em condições fortemente ácidas a hidrogenação catalítica reduz seletivamente o anel carboaromático e ao se prolongar o tempo de reação obtém-se o derivado peridrogenado (**Esquema 15**) (SEIYAKU, 1966).



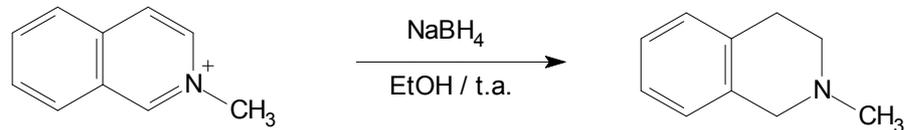
**Esquema 15** - Redução seletiva dos anéis da isoquinolina.

Com o  $\text{LiAlH}_4$  são geradas 1,2-diidroisoquinolinas, que podem oxidar-se facilmente a sistemas totalmente aromáticos, ou a uma mistura de tetraidroderivado e composto aromático, especialmente em meio ácido, conforme evidenciado no **Esquema 16** descrito a seguir (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 16** – Redução de isoquinolinas com  $\text{LiAlH}_4$ .

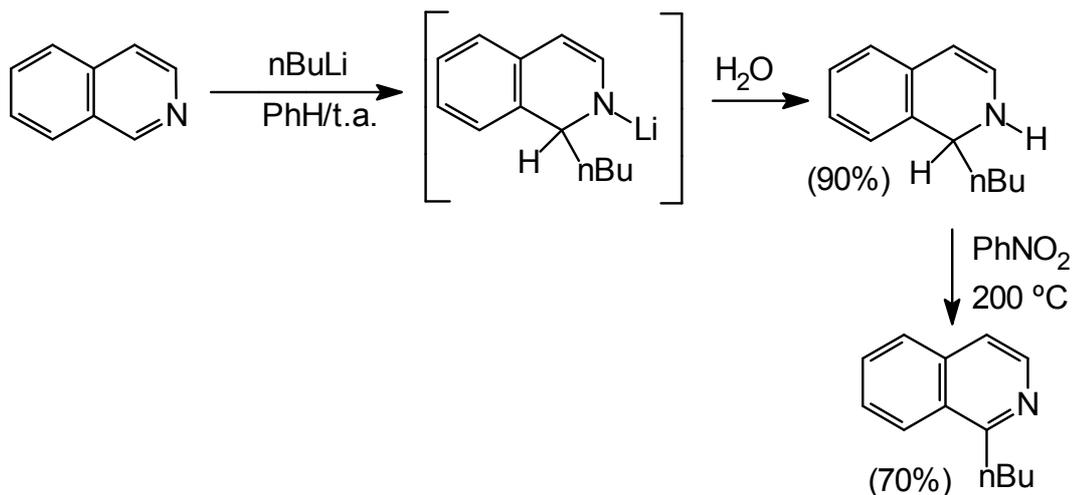
Segundo Shklyayev (2002), o anel heterocíclico dos sais de *N*-alquilsisoquinolínio se reduz facilmente por hidrogenação catalítica ou com  $\text{NaBH}_4$  em meio prótico (**Esquema 17**).



**Esquema 17** – Redução de sais *N*-alquilsisoquinolínio com  $\text{NaBH}_4$  em meio prótico.

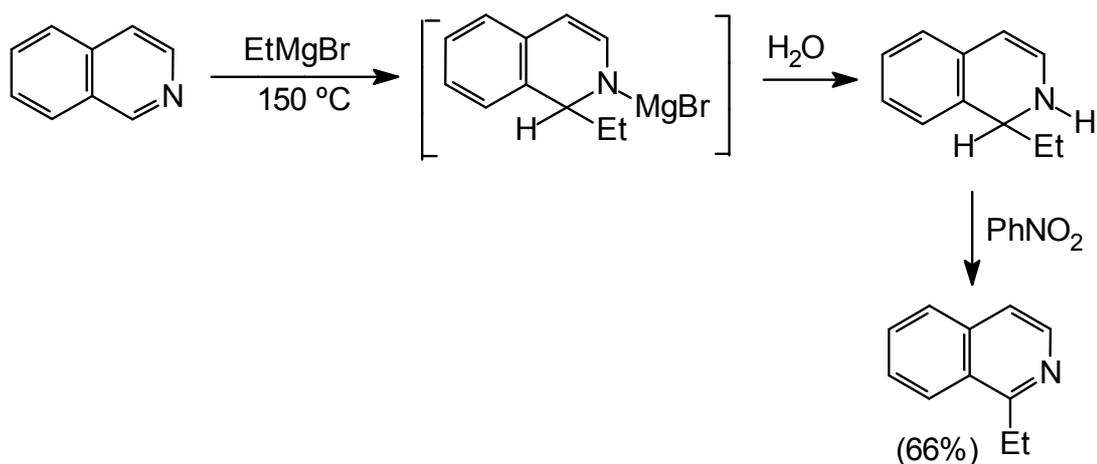
### 1.4.6. Alquilação e Arilação

Haleto de alquil ou arilmagnésio, assim como aril ou alquilítio, reagem com isoquinolinas fornecendo diidroisoquinolinas estáveis que podem ser rearomatizadas com um oxidante adequado (**Esquema 18**) (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 18** – Alquilação ou arilação de isoquinolinas.

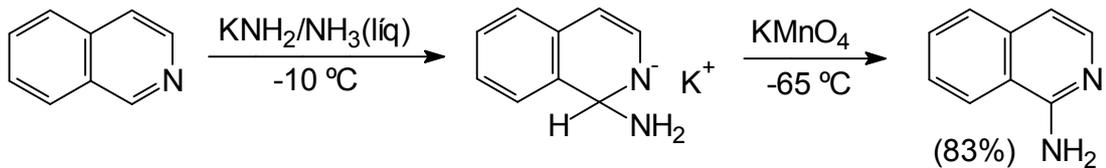
Os reagentes de Grignard alquílicos requerem temperaturas mais elevadas como pode ser visto no **Esquema 19**.



**Esquema 19** – Alquilação de isoquinolinas utilizando reagentes de Grignard.

### 1.4.7. Aminoação

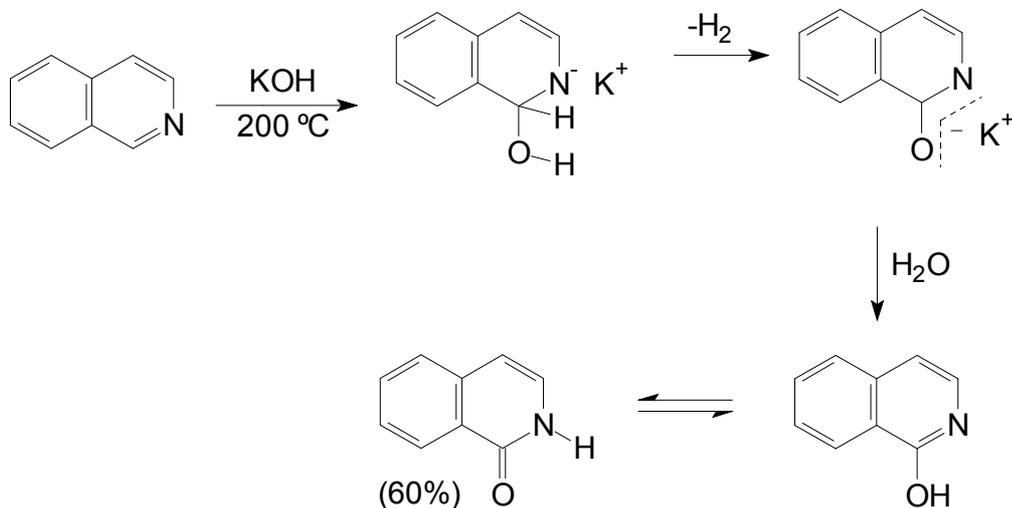
Isoquinolinas reagem com  $\text{KNH}_2$  e amônia líquida fornecendo aminas via diadroadutos e conduzem exclusivamente a 1-aminoisoquinolina, após oxidação, conforme é mostrado no **Esquema 20** (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 20** – Síntese de 1-aminoisoquinolinas utilizando  $\text{KNH}_2$  e amônia.

### 1.4.8. Hidroxilação

Segundo Seiyaku (1966), as isoquinolinas podem ser hidroxiladas diretamente com  $\text{KOH}$  a alta temperatura despreendendo-se  $\text{H}_2$  e originando 1-isoquinolona (**Esquema 21**).

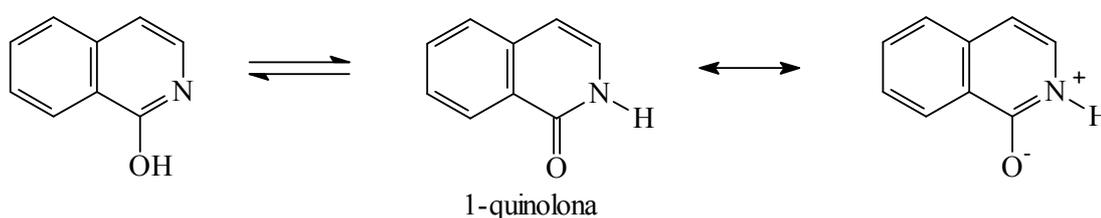


**Esquema 21** – Síntese de 1-isoquinolona utilizando  $\text{KOH}$ .

## 1.5. Sistemas derivados de isoquinolinas

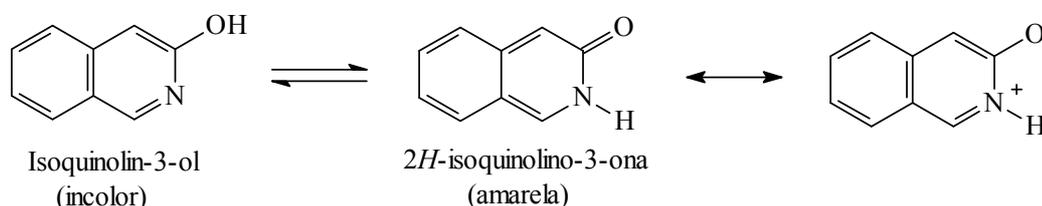
### 1.5.1. Hidroxiderivados

As isoquinolinas com grupos hidroxilas se comportam como fenóis, salvo quando a hidroxila se encontra em posição 1. Neste caso o tautômero mais estável é a isoquinolona (**Esquema 22**) (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 22** – Tautomeria de isoquinolinas hidroxiladas na posição 1.

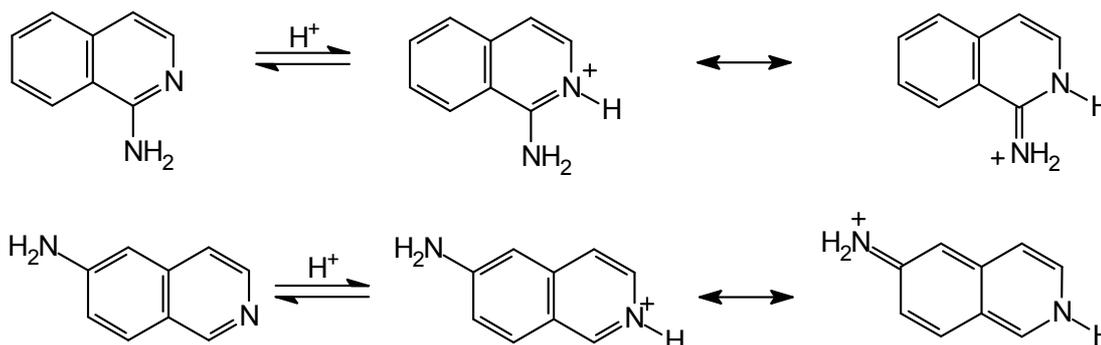
O derivado hidroxilado na posição 3 da isoquinolina pode existir na forma cetônica ou fenólica dependendo das condições, já que ambos possuem estabilidades comparáveis. Em meios pouco polares como o éter ou o éter de petróleo predomina o isoquinolin-3-ol que é incolor. Já em solventes próticos como a água ou o etanol observa-se a *2H*-isoquinolino-3-ona que é amarela. Experimentalmente, uma solução etérea incolor de isoquinolin-3-ol se torna amarela pela adição de metanol (**Esquema 23**) (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 23** – Formas cetônica e fenólica de isoquinolinas hidroxiladas na posição 3.

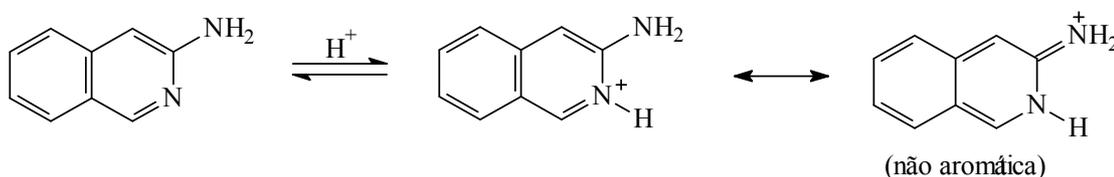
### 1.5.2. Aminoderivados

Seiyaku (1966), afirma que as aminoquinolinas e as aminoisoquinolinas existem como tautômeros amino e todas são protonadas no nitrogênio heterocíclico. As amins mais básicas desta família são as 1 e a 6-aminoisoquinolinas com  $pK_a$  de 7,6 e 7,2, respectivamente (**Esquema 24**).



**Esquema 24** – Tautomeria de 1-aminoisoquinolina e de 6-aminoisoquinolina.

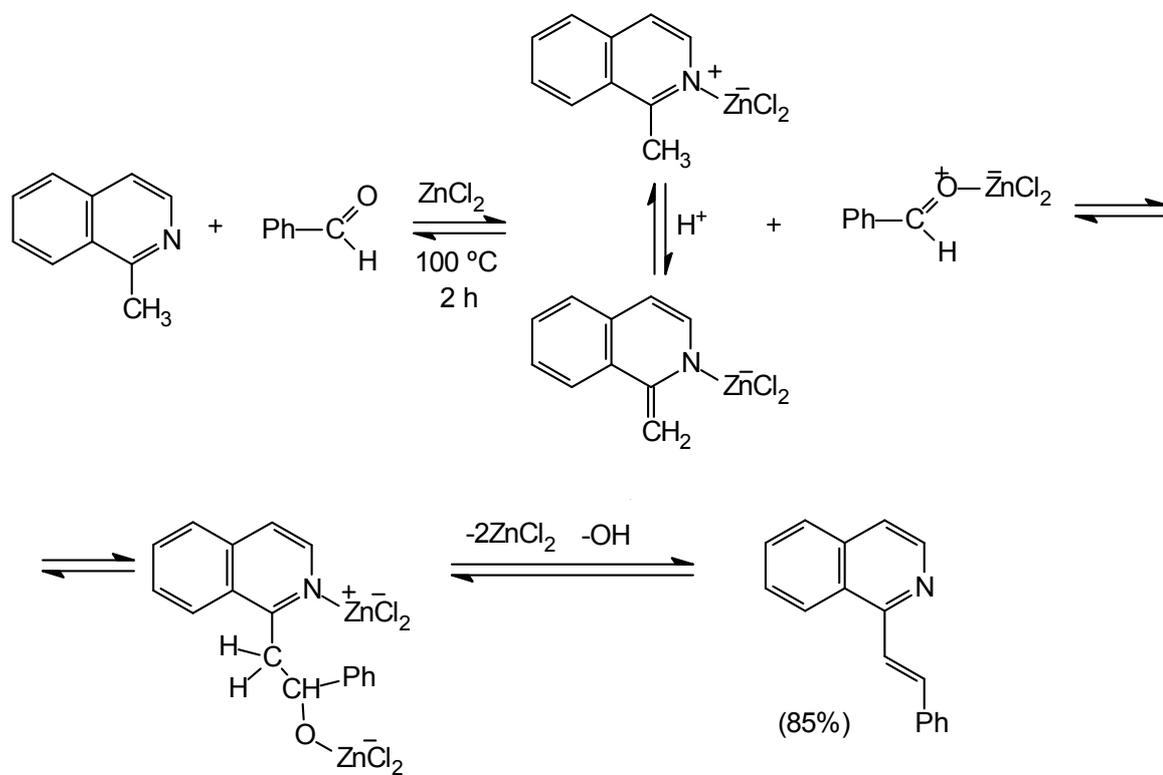
Entretanto, a 3-aminoisoquinolina é menos básica ( $pK_a = 5,0$ ) (**Esquema 25**).



**Esquema 25** - Tautomeria de 3-aminoisoquinolina.

### 1.5.3. Alquilderivados

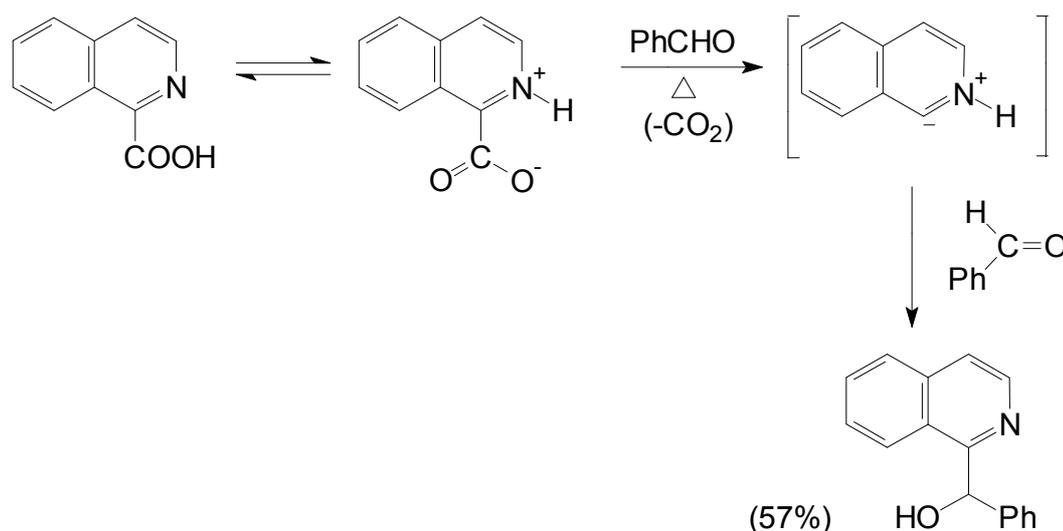
Os hidrogênios de um grupo alquila ligados ao carbono  $\alpha$  colocado em posição 1 de isoquinolina são ácidos e permitem conduzir processos de condensação tanto em meio básico como ácido (**Esquema 26**).



**Esquema 26** – Condensação de isoquinolinas com grupo alquila na posição  $\alpha$  ao nitrogênio tanto em meio básico como em meio ácido.

### 1.5.4. Ácidos

Os ácidos isoquinolino-1-carboxílicos podem ser descarboxilados com facilidade via um intermediário carregado que pode ser tratado com um aldeído como eletrófilo (**Esquema 27**) (SEIYAKU, 1966).

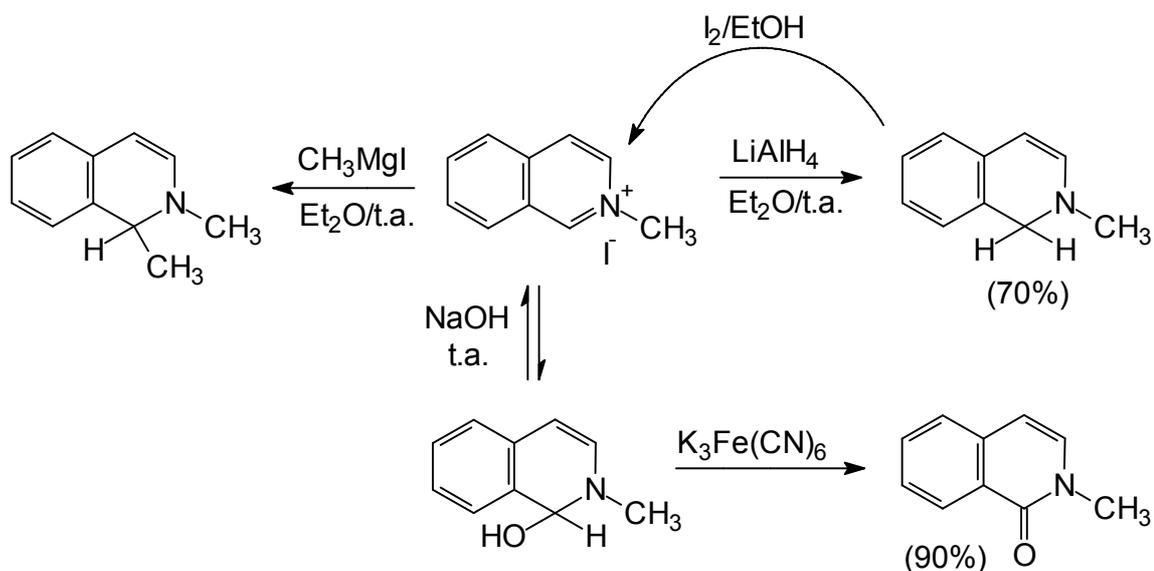


**Esquema 27** – Descarboxilação de ácidos isoquinolino-1-carboxílicos.

### 1.5.5. Sais quaternários de isoquinolínio.

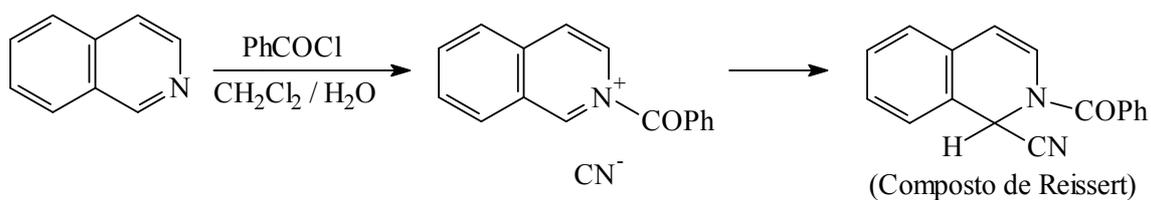
A propriedade mais importante das isoquinolinas é a facilidade com que reagem com reagentes nucleofílicos. Os sais de isoquinolínio reagem só em C-1 (processo regioespecífico), quando a posição 1 está ocupada se obtém traços de substituição em C-3 (SEIYAKU, 1966).

A adição de nucleófilos organometálicos, hidróxidos e hidretos transcorre facilmente e os diidroderivados que se obtém devem ser manejados com cuidado para que não se decomponham e nem se oxidem. Em muitos casos estes intermediários são estáveis e requerem oxidantes para se rearomatizarem (**Esquema 28**) (SEIYAKU, 1966).



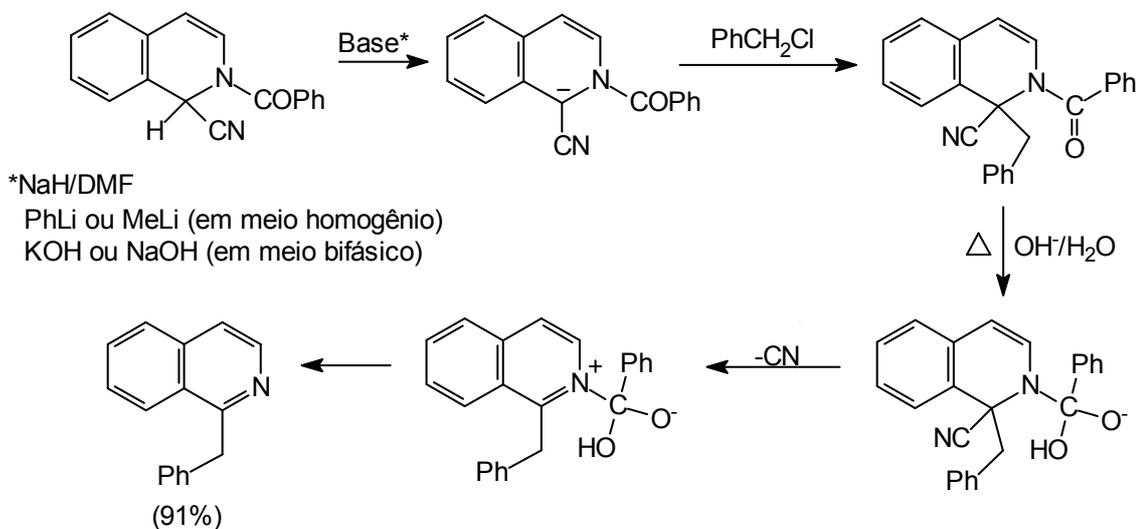
**Esquema 28** - Adição de nucleófilos organometálicos, hidróxidos e hidretos a sais de quaternários de isoquinolínio.

Reações do sal de N-acilisoquinolínio com cianeto são conhecidas como processos de Reissert. O agente acilante é o cloreto de benzoíla e a reação se processa em meio bifásico diclorometano e água (**Esquema 29**) (NOVAES *et alii*, 1999).



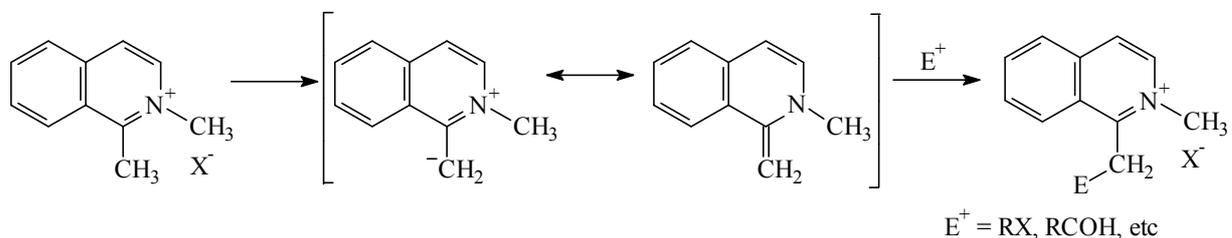
**Esquema 29** – Reações do sal de N-acilisoquinolínio com cianeto - processos de Reissert.

Os compostos de Reissert são muito úteis para introduzir eletrófilos ( $\text{E}^+$ ) no anel heterocíclico, desprotonar e eliminar  $\text{CN}^-$ , conduzindo a heterocíclicos substituídos (**Esquema 30**) (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 30** – Síntese de heterocíclicos substituídos utilizando compostos de Reissert.

Os N-alquilderivados de isoquinolínio em posição 1 se desprotonam no carbono  $\alpha$  muito facilmente. Muitas vezes não é necessário sequer bases, já que o carbânion se encontra muito estabilizado (**Esquema 31**) (SEIYAKU, 1966).



**Esquema 31** – Desprotonação de N-alquilderivados de isoquinolínio na posição 1.

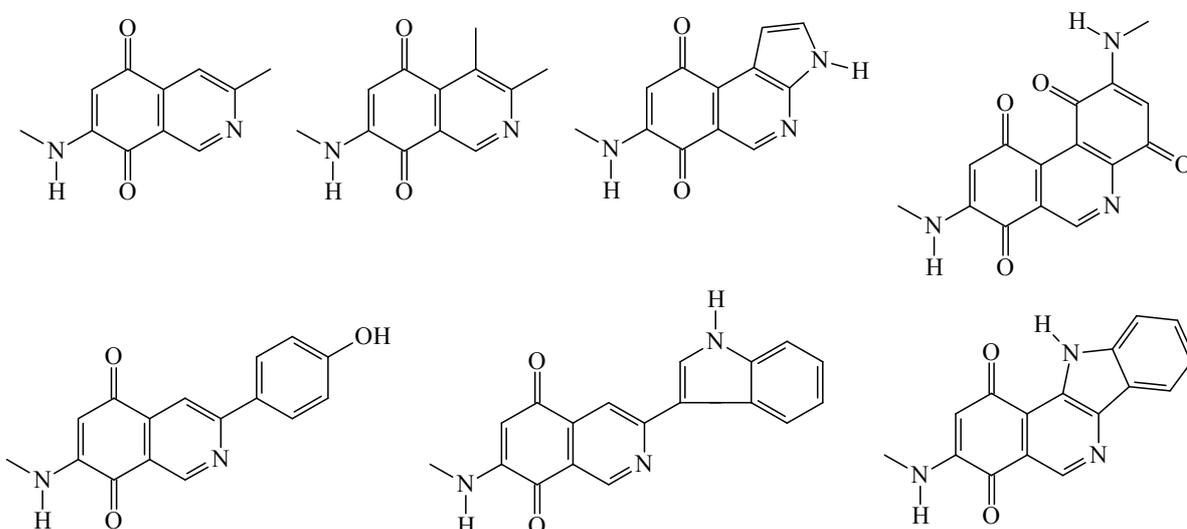
## 1.6. Aminoisoquinolinoquinonas

### 1.6.1. Sínteses de Aminoisoquinolinoquinonas

Segundo Owton (1999), a unidade aminoquinona se encontra presente em um grande número de compostos de interesse terapêutico que tem apresentando atividades antitumorais, antibacterianos, antiprotozoários, antifúngicos, entre outras.

O deslocamento nucleofílico de halogênios nos derivados de isoquinolino-5,8-quinonas dão resultados interessantes que são utilizados na síntese de antibióticos tais como as mansouramicinas (**Figura 6**) que possuem em suas estruturas a 7-aminoisoquinolinoquinona (LAATSCH, 2006).

As mansouramicinas, isoladas da esponja marinha azul *Cribrochalina sp.*, apresentam pronunciada atividade citotóxica com valores de  $IC_{50}$  abaixo de  $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  e atividade contra vírus, bactérias e malária (LAATSCH, 2006).

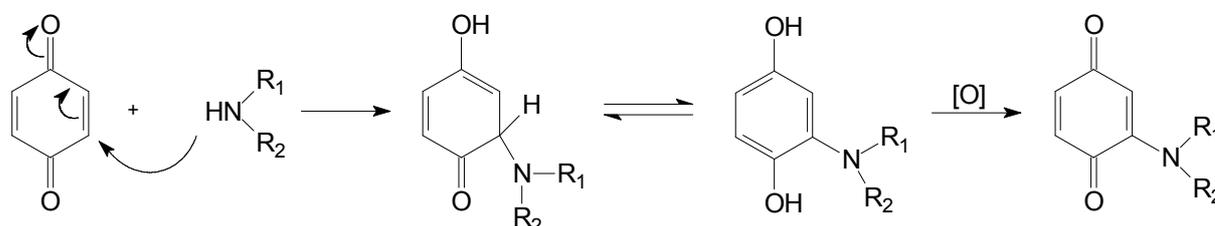


**Figura 6** – Mansouramicinas isoladas de *Cribrochalina sp.*

Muitos destes compostos isolados de produtos naturais têm gerado um grande interesse científico devido à sua fácil preparação. Os métodos de obtenção de aminoisoquinolinoquinonas são múltiplos e variados, destacando-se principalmente a reação de adição/oxidação do anel quinônico, a aminação direta, e as reações de

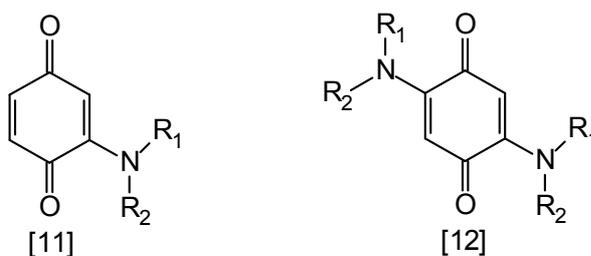
substituição nucleofílica em que um grupo amino substitui um átomo de hidrogênio (WIPF *et alii*, 2004).

Segundo Shaikh e colaboradores (1986), a adição direta de aminas a quinonas se processa por um ataque nucleofílico de aminas primárias ou secundárias, alifáticas ou aromáticas, ao sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado do anel quinônico mediante um mecanismo de adição conjugada, para formar um hemiaminal vinílico. Este intermediário se tautomeriza na hidroquinona e, posteriormente, se oxida na aminoquinona por ação direta do ar, agentes oxidantes ou mesmo pela quinona de partida (**Esquema 32**).



**Esquema 32** – Síntese de aminoquinonas por adição direta de aminas.

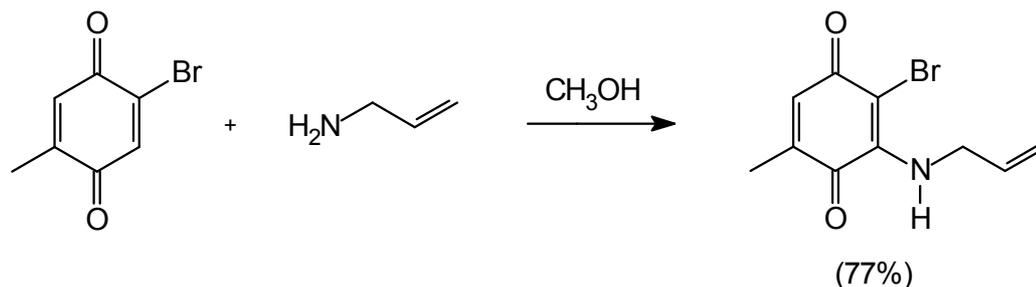
A aminação oxidativa de *p*-benzoquinonas está descrita por um grande número de autores em diferentes condições experimentais, conduzindo a misturas de quinonas monossustituídas [11] e dissustituídas [12] (SHAIKH *et alii*, 1986).



**Figura 7** – Quinonas monossustituídas [11] e dissustituídas [12].

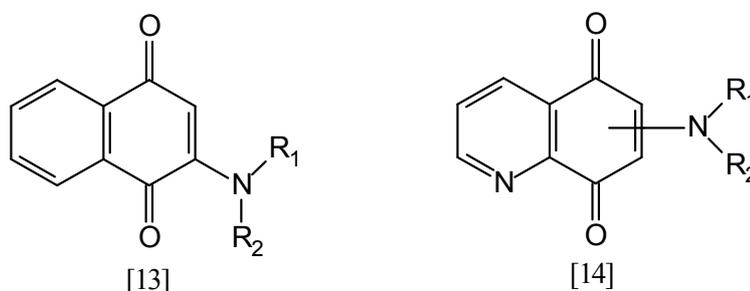
Segundo Llorente (1995), a facilidade com que a amina se adiciona ao sistema quinônico depende em grande parte da natureza da amina, sendo mais frequente a formação de produtos de monoadição no caso de aminas secundárias, e de dupla adição com aminas primárias. No caso de existirem substituintes no anel benzoquinônico a reação de aminação é regioseletiva dependendo da posição do grupo amino, da natureza eletrônica e dos efeitos estéreos dos substituintes. Em geral, a

substituição ocorre predominantemente na posição mais eletrofílica do anel quinônico. Por exemplo, a aaminação *orto* a um doador eletrônico como uma metoxila é desfavorecida, enquanto que a mesma reação é favorecida se um grupo aceptor de elétrons como o bromo estivesse no lugar da metoxila, como se pode verificar no **Esquema 33**. Neste se observa que a adição está favorecida frente à substituição, provavelmente por razões eletrônicas.



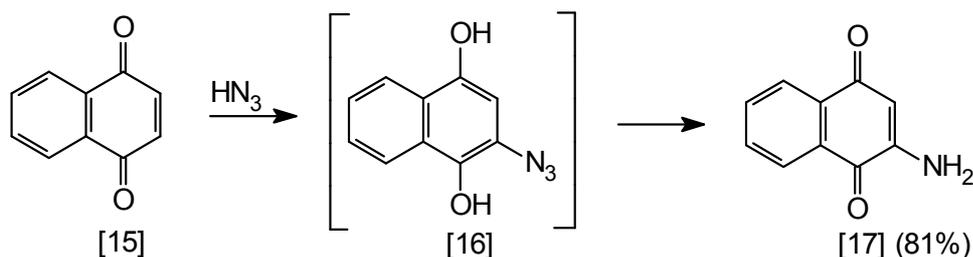
**Esquema 33** – Reação de aaminação de quinona halogenada.

Na adição de aminas a outros sistemas quinônicos tais como 1,4-naftoquinona e 5,8-quinolinaquinona obtem-se os derivados N-substituídos correspondentes [13] e [14] (OWTON, 1999 e WIPF *et alii*, 2004).



**Figura 8** – Estruturas de derivados N-substituídos de 1,4-naftoquinona [13] e 5,8-quinolinaquinona [14].

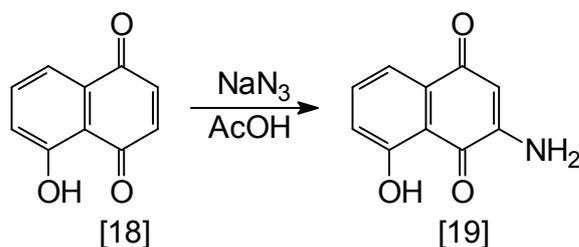
Aminoquinonas sem substituintes no nitrogênio amínico são conseguidas através de adição com ácido hidrazóico. A 2-amino-1,4-naftoquinona [17] pode ser preparada por adição de azida sódica em ácido acético a 1,4-naftoquinona [15]. A adição de ácido hidrazóico origina um intermediário instável de azidonaftoquinona [16], que se oxida ao grupo azido por transferência intramolecular redox de átomos de hidrogênio da hidroquinona e que, finalmente, se reduz com liberação de nitrogênio (**Esquema 34**) (FIESER & HARTWELL, 1935).



**Esquema 34** – Síntese da 2-amino-1,4-naftoquinona [17] com ácido hidrazóico.

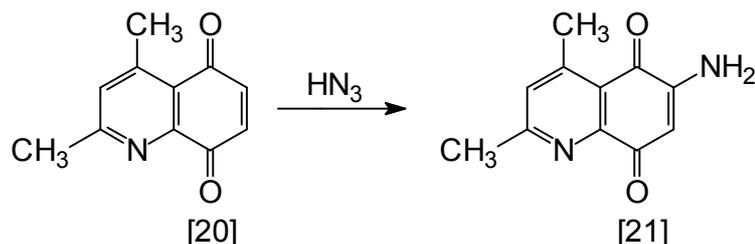
A reação do ácido hidrazóico com quinonas segue um padrão geral de adição a sistemas carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados.

O caráter eletrônico dos substituintes dirige a regioseletividade da adição. Na reação regioseletiva com azida de sódio a 5-hidroxi-naftoquinona [18] produz como único produto de reação a 2-amino-8-hidroxi-naftoquinona [19] (**Esquema 35**) (LLORENTE, 1995).



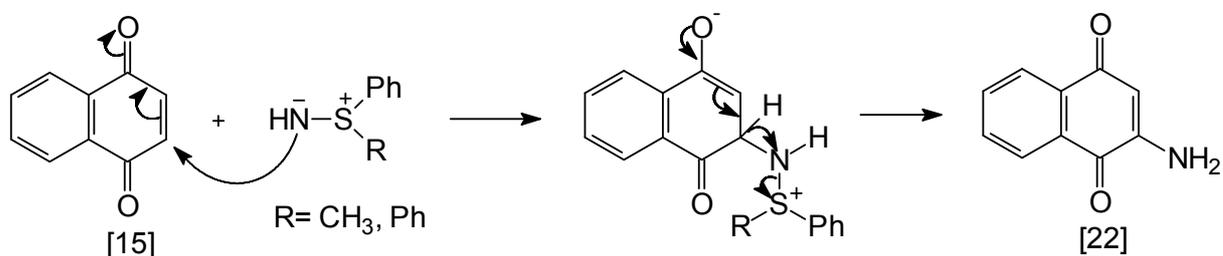
**Esquema 35** – Síntese da 2-amino-8-hidroxi-naftoquinona [19] com azida de sódio.

Para derivados de quinolina-5,8-quinona, a adição de ácido hidrazóico segue mostrando a regioseletividade esperada. Assim, a 2,4-dimetilquinolino-5,8-quinona [20] produz majoritariamente a 6-amino-2,4-dimetilquinolina-5,8-quinona [21] através da oxido-redução intramolecular do intermediário 6-azido-2,4-dimetil-5,8-diidroxiquinolina (**Esquema 36**) (LLORENTE, 1995).



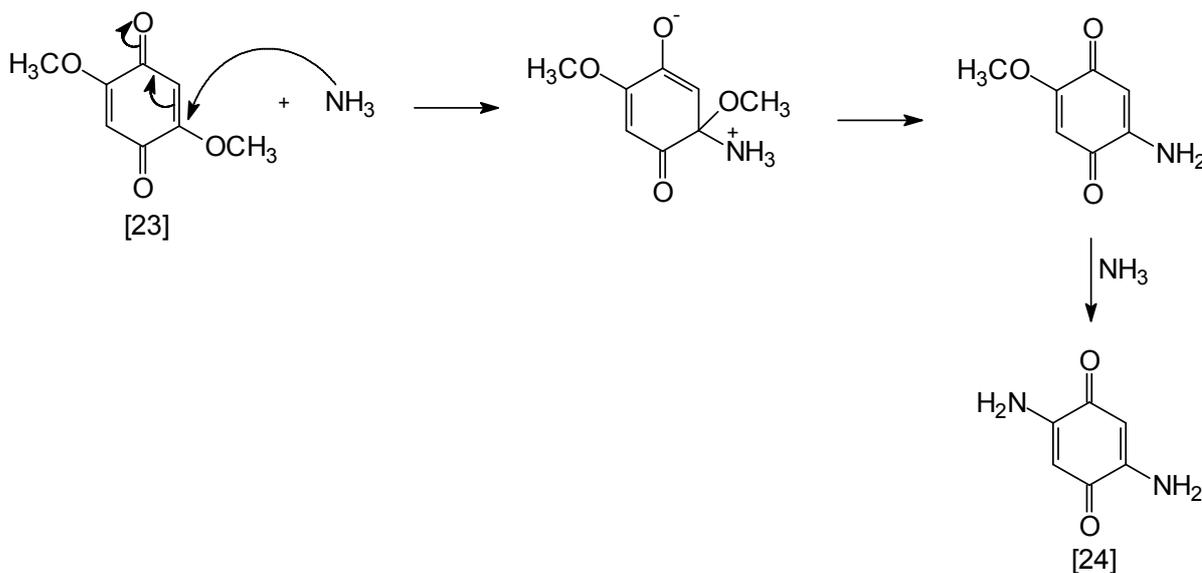
**Esquema 36** – Síntese da 6-amino-2,4-dimetilquinolino-5,8-quinona [21] a partir da 2,4-dimetilquinolino-5,8-quinona [20] com ácido hidrazóico.

Segundo Llorente (1995), o tratamento de 1,4-naftoquinona [15] com difenilsulfimida ou metilfenilsulfimida conduz ao produto aminado [22] (**Esquema 37**).



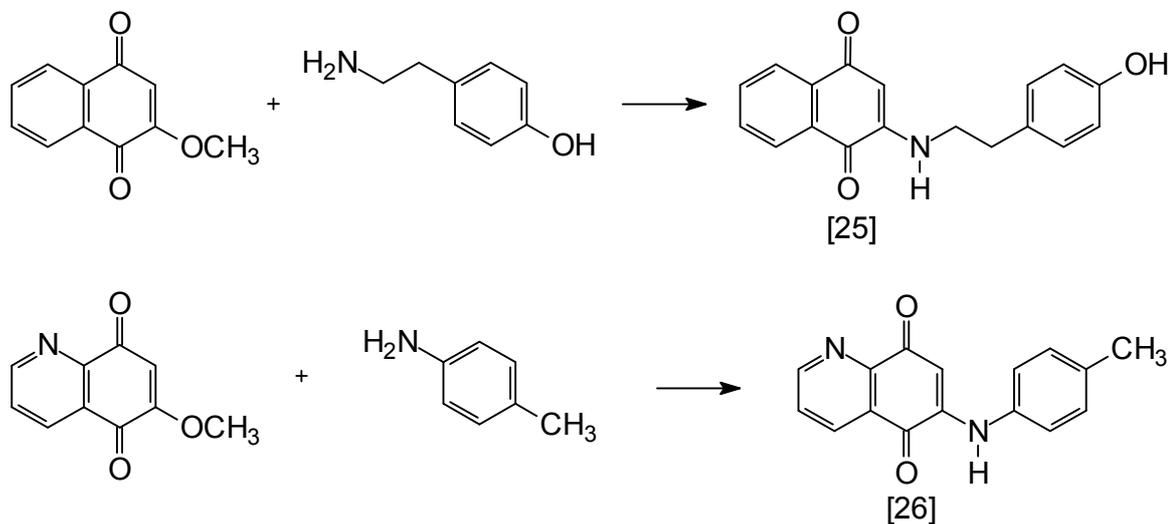
**Esquema 37** - Síntese da 2-amino-1,4-naftoquinona [22] com difenilsulfimida ou metilfenilsulfimida.

Outro método de síntese de aminoquinonas é com a utilização de anéis quinônicos contendo grupos como o alcóxi ou halogênios. O tratamento de 2,5-dimetoxibenzoquinona [23] com amônia em etanol, leva a obtenção de 2,5-diaminobenzoquinona [24] através dos intermediários indicados no **Esquema 38** (LLORENTE, 1995).



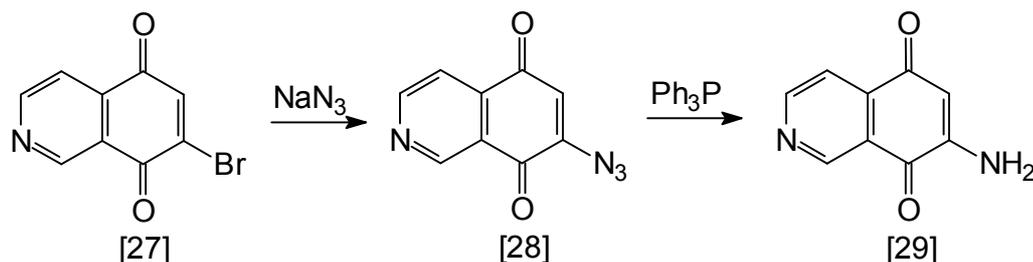
**Esquema 38** – Síntese da 2,5-diaminobenzoquinona [24] a partir da 2,5-dimetoxibenzoquinona [23] com amônia em etanol.

Este método pode ser estendido a outras aminas alifáticas e aromáticas com excelentes resultados assim como a outros anéis quinônicos, como 2-metóxi-1,4-naftoquinonas [25] ou 6-metoxiquinolina-5,8-quinona [26] (**Esquema 39**).



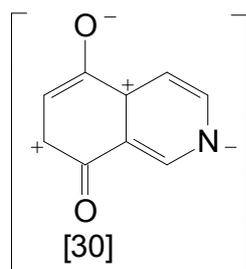
**Esquema 39** – Síntese da 2-metóxi-1,4-naftoquinonas ou da 6-metoxiquinolina-5,8-quinona.

Assim, a partir da 7-bromoisoquinolinoquinona [27], por reação com azida sódica, se obtém o 7-azidoderivado [28], cuja redução posterior com trifenilfosfina origina a 7-aminoisoquinolinoquinona [29] (**Esquema 40**) (LLORENTE, 1995).



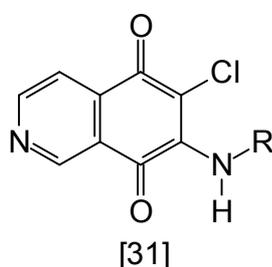
**Esquema 40** – Síntese da 7-aminoisoquinolinoquinona [29] a partir da 7-bromoisoquinolinoquinona [27] por reação com azida sódica e trifenilfosfina.

Segundo Shaikh (1986), a reação de adição entre azanaftoquinonas e nucleófilos apropriados é um método eficiente e regioseletivo para obter azanaftoquinonas substituídas devido a maior polaridade da dupla ligação 6-7 da naftoquinona. No caso da isoquinolino-5,8-quinona [30] tem-se preferencialmente a adição de aminas na posição 7, já que é mais susceptível ao ataque nucleofílico (Figura 9).



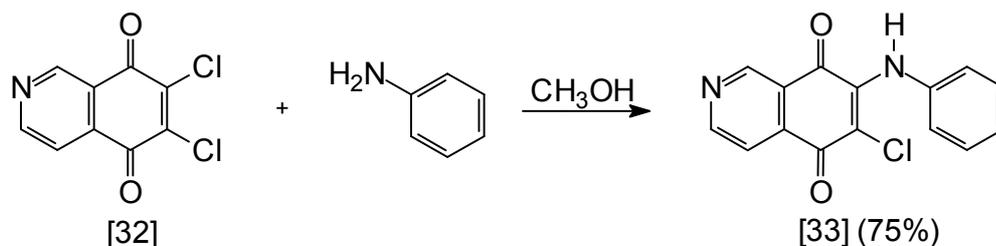
**Figura 9** – Estrutura da isoquinolino-5,8-quinona [30] com o carbono 7 elétron deficiente.

Segundo Kim e colaboradores (2007), muitas propriedades biológicas têm sido aumentadas pela presença de substituintes como o cloro e grupos amino em quinonas, como acontece nas isoquinolino-5,8-dionas dissustituídas nas posições 6 e 7 [31].



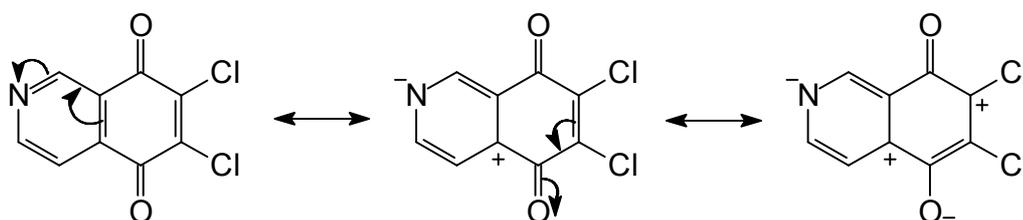
**Figura 10** – Estrutura de isoquinolino-5,8-dionas cloradas dissustituídas nas posições 6 e 7 [31].

A substituição de um átomo de cloro da 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona por uma amina na presença de um equivalente de carbonato de potássio acontece com bons rendimentos (LLORENTE, 1995). Estes resultados também são observados com a 6,7-dicloro-isoquinolino-5,8-diona [32] (**Esquema 41**) (SHAIKH, 1986).



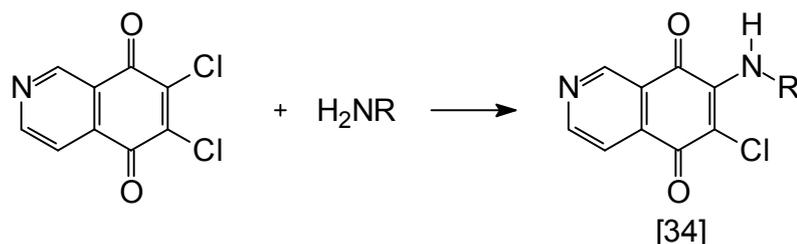
**Esquema 41** – Reação de substituição na 6,7-dicloroisoquinolino-5,8-diona [32].

De acordo com Shaikh (1986), a reação entre a 6,7-dicloroisoquinolino-5,8-diona [32] e anilina na presença de metanol origina preferencialmente a 6-cloro-7-fenilaminoisoquinolino-5,8-diona [33] (**Esquema 42**).



**Esquema 42** – Estruturas de ressonâncias para isoquinolino-5,8-diona diclorada.

Já que o efeito retirador de elétrons do nitrogênio isoquinolínico incrementa a eletrofilicidade da carbonila em 8 e este efeito se transmite através do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado na posição 6, resulta que o grupo amino nesta posição é menos nucleófilo que quando se encontra na posição 7 e, portanto, os rendimentos com a 7-aminoisoquinolinoquinona [34] são superiores ao obtidos com seu isômero em posição 6 (**Esquema 43**) (SHAIKH, 1986).



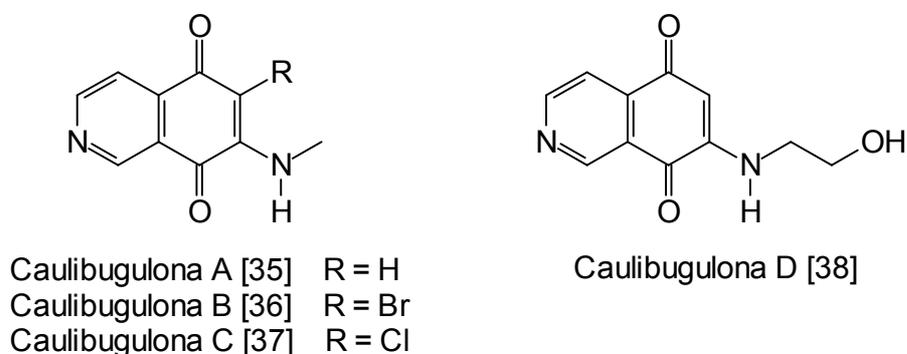
**Esquema 43** – Síntese da 7-aminoisoquinolinoquinona [34].

### 1.6.2. Caulibugulonas

Caulibugulonas são moléculas isoladas do briozoário marinho *Calibugula intermis* e que revelaram a ação diretamente sobre a via das enzimas Map p38, com consequente indução de apoptose em várias linhagens de células cancerígenas (MILANOWSKI *et alii*, 2004 *apud* MAYER & GUSTAFSON, 2006).

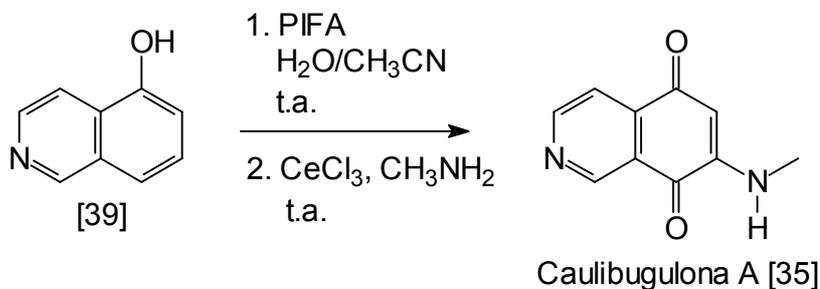
As caulibugulonas isoladas deste animal são em número de seis, denominadas pelas seis primeiras letras do alfabeto (A-F). A avaliação de suas atividades biológicas revelou que estas são intensas contra a linhagem celular murina IC2, com concentrações variando entre 0,03 e 1,67 mg·mL<sup>-1</sup> (WIPF *et alii*, 2004).

Segundo Wipf e colaboradores (2004), as aminoisoquinolinoquinonas caulibugulonas A [35], B [36], C [37] e D [38] (**Figura 11**), com o grupo amino na posição 7, podem ser obtidas a partir do 5-hidroxiisoquinolino [39].



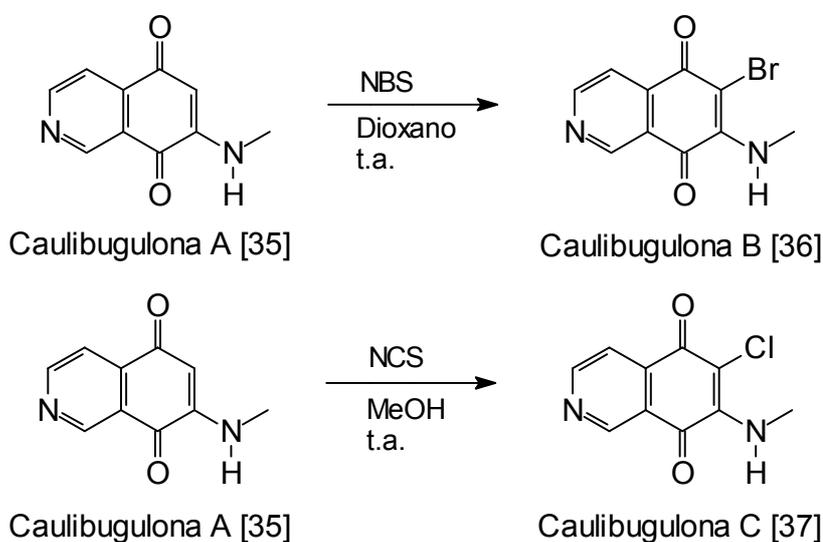
**Figura 11** – Estruturas das caulibugulonas A [35], B [36], C [37] e D [38].

Estes mesmos autores, neste mesmo trabalho, descreveram que a síntese destas substâncias pode ser realizada através da reação entre o 5-hidroxiisiquinolino [39] com iodobenzeno bis(trifluoroacetato) PIFA em solução de acetonitrila e água e subsequente adição *in situ* de  $\text{CeCl}_3$  e metilamina (**Esquema 44**).



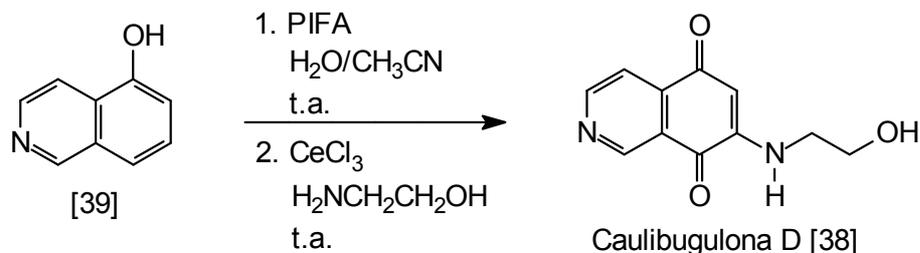
**Esquema 44** – Síntese da caulibugulona A [35] a partir do 5-hidroxiisiquinolino [39].

Em seguida, a caulibugulona A [35] foi tratada com N-bromosuccinimida (NBS) e com N-clorosuccinimida (NCS) para produzir as caulibugulonas B [36] e C [37], respectivamente (**Esquema 45**).



**Esquema 45** – Síntese da caulibugulona B [36] a partir da caulibugulona A [35] e da caulibugulona C [37] a partir da caulibugulona A [35].

Finalmente, a caulibugulona D [38] foi sintetizada a partir do 5-hidroxiisoquinolino [39] através de duas etapas. Numa primeira etapa oxidou-se o 5-hidroxiisoquinolino [39] com iodobenzeno bis(trifluoroacetato), PIFA, em solução de acetonitrila e água. Em seguida, tratou-se a isoquinolino-5,8-diona obtida com 2-aminoetanol (**Esquema 46**).



**Esquema 46** – Síntese da caulibugulona D [38] a partir do 5-hidroxiisoquinolino [39].

Uma das contribuições mais importantes dos compostos quinolínicos e isoquinolínicos é seu conhecido aporte na luta contra o câncer. Nos últimos anos, os alcalóides isoquinolínicos têm despertado um interesse muito grande nos pesquisadores da área, especialmente as caulibugulonas, por terem demonstrado propriedades citotóxicas potentes, amplo espectro antitumoral, além de propriedades antimicrobianas e antivirais (MILANOWSKI *et alii*, 2004 *apud* MAYER & GUSTAFSON, 2006).

Dessa forma, este trabalho descreve, no capítulo 1, a síntese das caulibugulonas A, C e D e de análogos estruturais, com o intuito de se obter agentes químicos eficientes no combate a células cancerígenas, mais seletivos e menos tóxicos ao homem.

Os ensaios biológicos relativos a todas as substâncias são apresentados no capítulo 2, onde é relatado o estudo da atividade anticancerígena com as células - U937 (leucemia humana, linhagem monocítica), MOLT4 (leucemia humana, linhagem linfocítica), COLO205 (câncer de cólon humano, linhagem epitelioide) e H460 (câncer pulmonar humano, linhagem epitelioide).

Finalmente, são apresentadas as conclusões e as referências bibliográficas consultadas.

## **2. Justificativa e proposta de trabalho**

Tendo em vista o grande impacto das doenças causadas pelo câncer nos dias atuais na expectativa de vida da população, não só brasileira como mundial, a busca por novos e mais eficientes fármacos torna-se cada vez mais importante.

O mercado nacional movimentou, em 2008, mais de 10 bilhões de reais com medicamentos e o aumento previsto na receita para o ano de 2009 foi de 6% a 8%. O Brasil é considerado o sétimo mercado mundial de medicamentos, com uma taxa elevada de demanda. Dentre os vários setores em que atua, a produção de medicamentos representa uma parcela considerável. Todavia, praticamente toda a tecnologia existente pertence a companhias multinacionais. O desenvolvimento de tecnologia própria é importante, principalmente quando se considera a vitalidade do mercado mundial de fármacos.

Uma vez que o tratamento do câncer pode danificar células e tecidos saudáveis, poderão ocorrer efeitos secundários indesejáveis. Estes efeitos dependem do tipo e extensão do tratamento e podem variar conforme os doentes ou entre as sessões de tratamento. Os efeitos secundários dos fármacos anticancerígenos dependem, sobretudo, do tipo de medicamento e da dose administrada.

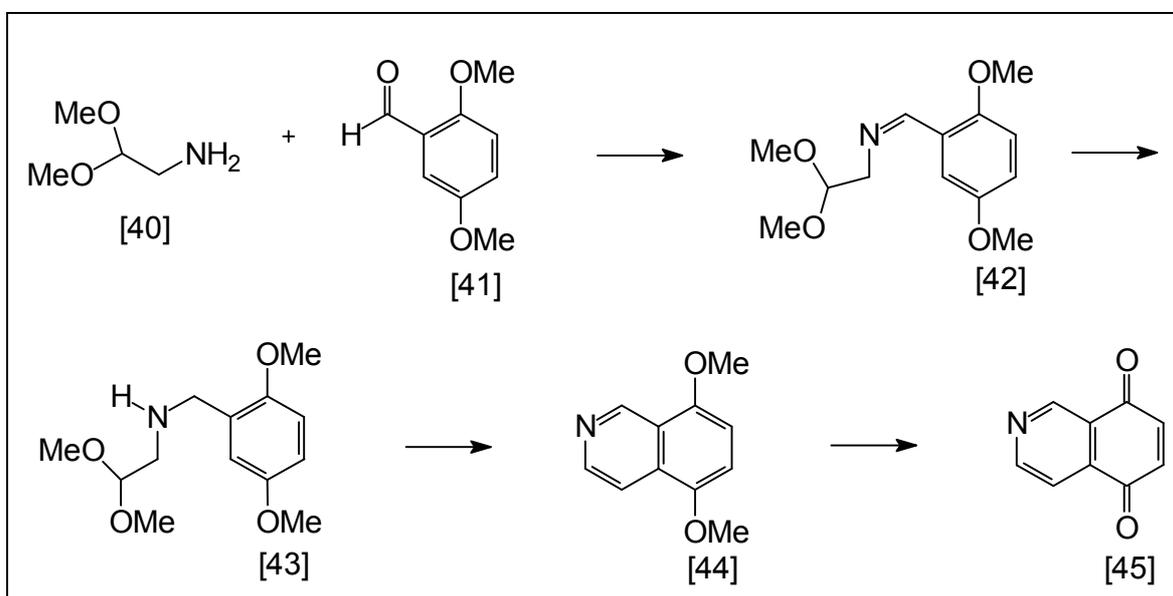
Apesar de existirem muitas substâncias com atividade anticancerígena, há a necessidade de desenvolver novos produtos que sejam seletivos, ligando-se seletivamente a sítios de ação determinados e em baixas dosagens, e assim apresentando o mínimo possível de efeitos colaterais.

Dessa forma, como as caulibugulonas apresentam atividade antitumoral comprovada e devido à limitada quantidade de caulibugulonas obtidas de fontes naturais, decidiu-se investigar uma rota sintética para a obtenção de maior quantidade de material para ensaios biológicos.

É importante salientar que atualmente existem apenas duas sínteses de caulibugulonas descritas na literatura, a de Wipf (2004) e a de Tamagnan (2004) e seus respectivos colaboradores.

Assim, este trabalho descreve a síntese total inédita das caulibugulonas A, C e D, em um número menor de etapas do que as já descritas na literatura. Aqui também será mostrada a avaliação da atividade anticancerígena das caulibugulonas A, C e D e de nove análogos preparados.

As substâncias foram preparadas inicialmente pela condensação entre a 2,2-dimetoxietanamina [40] e o aldeído [41], seguida da redução da imina [42]. Em seguida, a amina [43] foi ciclizada com ácido trifluoroacético levando à formação da isoquinolina dimetoxilada [44], que, em presença de nitrato de cério amoniacal (CAN) produziu a isoquinolino-5,8-diona [45] (**Esquema 47**).

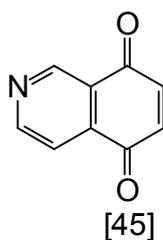


**Esquema 47** - Rota de síntese empregada na obtenção das isoquinolinas [44] e [45].

### 3 – Resultados e Discussão

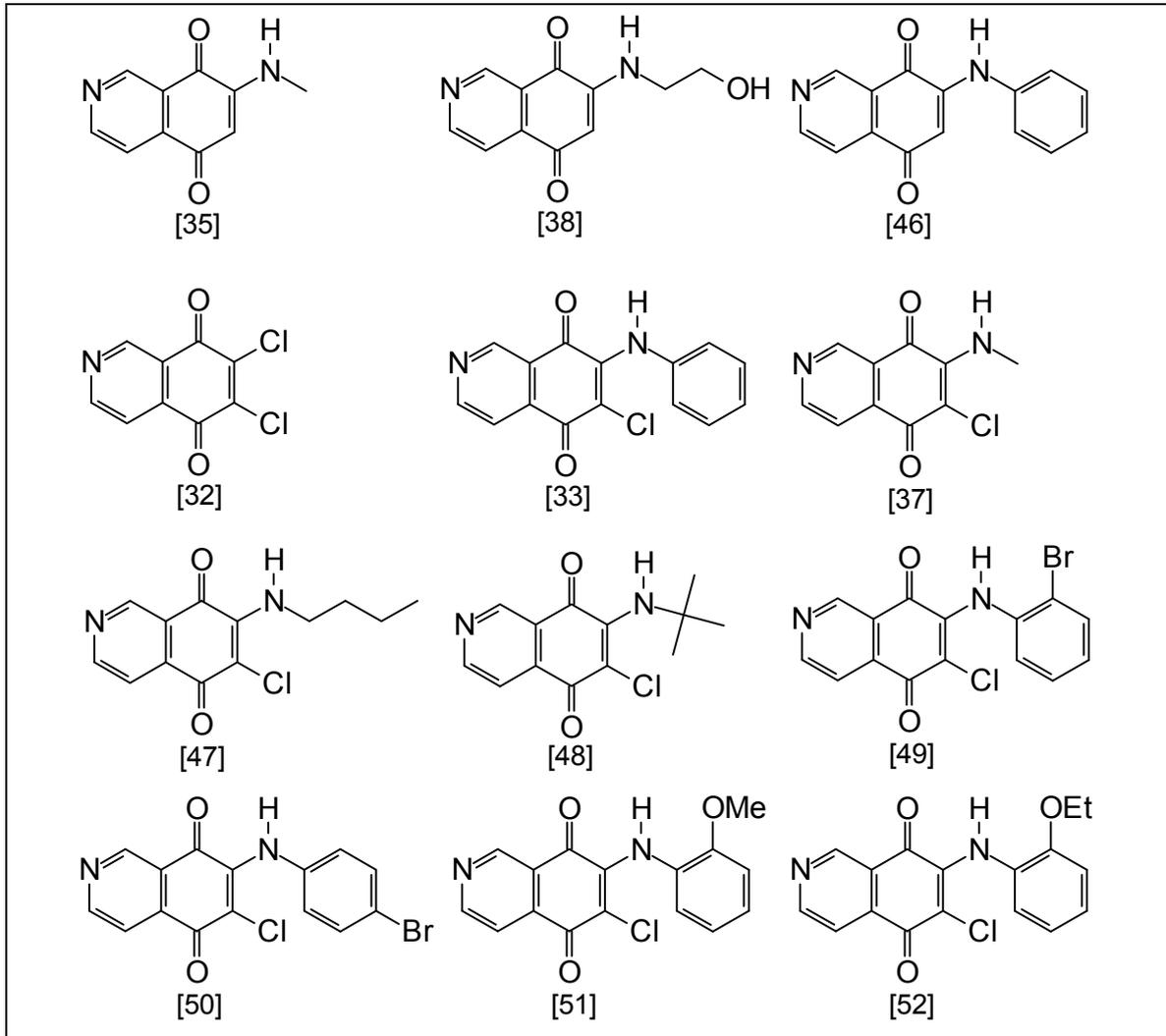
#### 3.1. Preparação da isoquinolino-5,8-diona [45]

Visando o preparo de novas substâncias com atividade anticancerígena foi sintetizada uma série de substâncias derivadas da isoquinolino-5,8-diona [45], intermediário-chave para a síntese das caulibugulonas e análogos. A escolha desse esqueleto básico baseou-se nos dados publicados por Ryu (1999) e Wipf (2004), e seus respectivos colaboradores, os quais descreveram as sínteses e as avaliações de atividades biológicas de caulibugulonas A [35], C [37] e D [38] e de alguns análogos que se mostravam promissores na inibição de células tumorais.



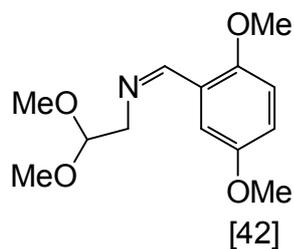
**Figura 12** - Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [45].

Dessa forma, a isoquinolino-5,8-diona [45] é um intermediário essencial para a preparação de substâncias dos tipos mostrados na **Figura 13**, requeridos para avaliação de atividade anticancerígena.



**Figura 13** – Isoquinolino-5,8-dionas com potencial atividade anticancerígena.

### 3.2. Preparação da N-2,5-dimetoxibenziliden-N-2,2-dimetoxietilamina [42]



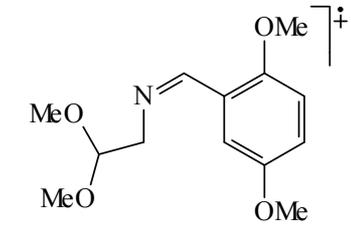
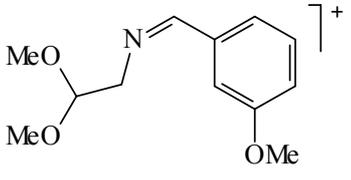
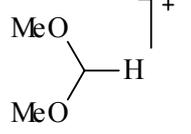
**Figura 14** - Estrutura da imina [42].

Para o preparo da isoquinolino-5,8-diona [45], utilizou-se como material de partida a imina [42], que foi preparada a partir da condensação da 2,2-dimetoxietanamina [40] com o aldeído [41], em tolueno como solvente, sob refluxo (Esquema 47).

A purificação da mistura contendo a imina [42] se fez por meio de coluna cromatográfica de sílica-gel, tendo como eluente hexano e acetato de etila (2:1,  $R_f=0,6$ ), que resultou na obtenção de um óleo alaranjado com 95% de rendimento.

O primeiro indício da formação da imina [42] se deu pela análise de seu espectro de massas (**Figura 1A**, Apêndice). Na **Tabela 1** estão indicados os principais sinais do EM com os possíveis fragmentos iônicos.

**Tabela 1** – Principais sinais do EM para a imina [42].

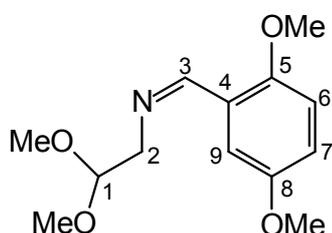
Íons ( <i>m/z</i> )	% do pico base	Fragmento iônico
253	4	
190	2	
75	100	

Outro indício que reforça a formação da imina [42] foi através de seu espectro no infravermelho por transformada de Fourier, que mostrou um sinal em  $1641\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento imínico e o desaparecimento do sinal em  $1676\text{ cm}^{-1}$ , de estiramento carbonílico de aldeído do material de partida [41] (**Figura 2A**, Apêndice).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da imina [42] (**Figura 3A**, Apêndice) confirmou a estrutura da substância desejada. Entre as evidências que suportam o sucesso da transformação se destacam o simpleto em  $\delta = 3,37$  dos hidrogênios dos grupos metoxilas alifáticos; os dois simpletos em  $\delta = 3,78$  e  $3,79$  dos hidrogênios dos grupos metoxilas aromáticos; o tripleto em  $\delta = 4,64$  ( $J = 4,5\text{ Hz}$ ) do hidrogênio H1; um duplete em  $\delta = 7,46$  ( $J = 4,5\text{ Hz}$ ) do hidrogênio H2; o simpleto em  $\delta = 8,65$  do hidrogênio H3; o duplete em  $\delta = 6,78$  ( $J = 7,0\text{ Hz}$ ) do hidrogênio H6; o duplo duplete em  $\delta = 6,89$

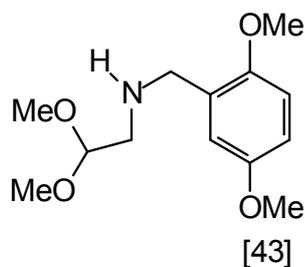
( $J= 7,0$  Hz e  $J= 1,5$  Hz) do hidrogênio H7; o duplete em  $\delta= 6,91$  ( $J= 1,5$  Hz) do hidrogênio H9.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 4A**, Apêndice) o sinal em  $\delta= 53,8$  foi atribuído aos carbonos das metoxilas alifáticas e os situados em  $\delta= 55,9$  e  $56,4$  às metoxilas aromáticas. Outros sinais atribuídos foram os localizados em  $\delta= 104,2$ , (C1); em  $\delta= 64,0$ , (C2); em  $\delta= 159,5$ , (C3); em  $\delta= 125,0$ , (C4), em  $\delta= 153,7$ , (C5); em  $\delta= 118,8$ , (C6); em  $\delta= 110,7$ , (C7); em  $\delta= 153,5$ , (C8); e em  $\delta= 112,8$ , (C9).



**Figura 15** - Estrutura da imina [42] com os carbonos numerados.

### 3.3. Preparação da N-[2,2-dimetoxietil]-N-[2,5-dimetoxibenzil]amina [43]



**Figura 16** - Estrutura da amina [43].

A preparação da amina [43] foi através da redução da imina [42] com boroidreto de sódio em metanol, à temperatura ambiente. A purificação da mistura contendo a amina [43] se fez por meio de coluna cromatográfica de sílica-gel, tendo como eluente hexano e acetato de etila (1:2,  $R_f=0,4$ ), que resultou na obtenção de um óleo amarelo com 100% de rendimento. O primeiro indício da formação da amina [43] se deu pela análise de seu espectro de massas (**Figura 5A**, Apêndice). Na **Tabela 2** estão indicados os principais sinais do EM com os possíveis fragmentos iônicos.

**Tabela 2** – Principais sinais do EM para a amina [43].

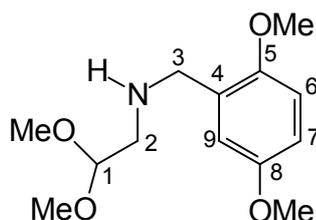
Íons ( <i>m/z</i> )	% do pico base	Fragmento iônico
255	7	
180	30	
151	100	

Outro indício da formação da amina [43] se deu pela análise de seu espectro no infravermelho, que mostrou o desaparecimento do sinal em  $1641\text{ cm}^{-1}$ , característico de estiramento imínico do material de partida [42] (**Figura 6A**, Apêndice).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amina [43] (**Figura 7A**, Apêndice) confirmou a estrutura da substância desejada. Destacam-se os seguintes sinais: um simpleto em  $\delta = 3,32$  dos hidrogênios das metoxilas alifáticas; dois simpletos em  $\delta = 3,73$  e  $3,76$  dos hidrogênios das metoxilas aromáticas; um tripleto em  $\delta = 4,50$  ( $J = 5,3\text{ Hz}$ ) do hidrogênio H1; um duplete em  $\delta = 2,71$  ( $J = 5,3\text{ Hz}$ ) do hidrogênio H2; e o aparecimento de um simpleto relacionado ao hidrogênio amínico (NH) em  $\delta = 3,12$  e de um simpleto em

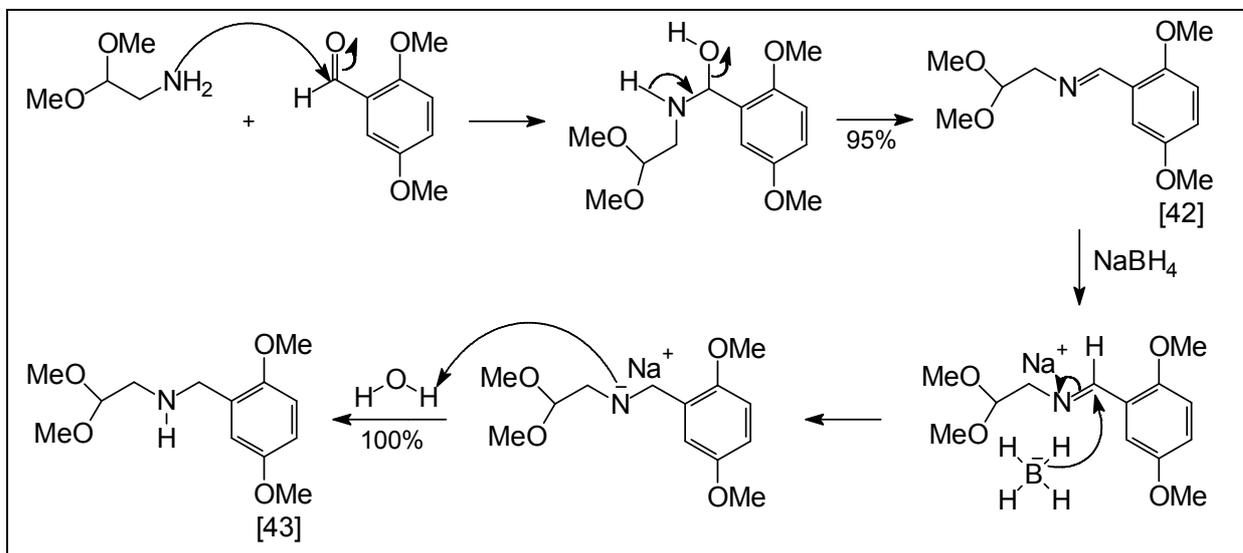
$\delta = 3,80$  para os hidrogênios H3. Estes dois últimos indícios são corroborados pelo desaparecimento do simpleto em  $\delta = 8,70$  relacionado ao hidrogênio H3 imínico. Os outros sinais desta molécula são um duplete em  $\delta = 6,75$  ( $J = 7,0$  Hz) do hidrogênio H6; um duplo duplete em  $\delta = 6,74$  ( $J = 7,0$  Hz e  $J = 1,6$  Hz), relacionado com o hidrogênio H7; e o duplete em  $\delta = 6,84$  ( $J = 1,6$  Hz) do hidrogênio H9.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 8A**, Apêndice) o sinal em  $\delta = 53,8$  foi atribuído aos carbonos das metoxilas alifáticas, e os localizados em  $\delta = 54,9$  e  $55,8$  aos carbonos das metoxilas aromáticas. Em  $\delta = 103,8$  tem-se o carbono C1; em  $\delta = 48,8$  o C2; e em  $\delta = 49,8$  o C3. Em  $\delta = 128,0$  observamos o carbono C4, em  $\delta = 153,2$  o C5; em  $\delta = 116,2$  o C6; em  $\delta = 111,1$  o C7; em  $\delta = 151,7$  o C8; e em  $\delta = 112,6$  tem-se o carbono C9.



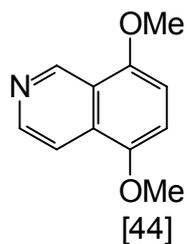
**Figura 17** - Estrutura da amina [43] com os carbonos numerados.

No **Esquema 48** sugere-se o mecanismo para a formação da imina [42] e sua posterior redução por transferência de hidreto.



**Esquema 48** – Mecanismo para a preparação da imina [42] e da amina [43].

### 3.4. Preparação da 5,8-dimetoxiisoquinolina [44]



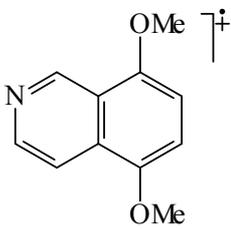
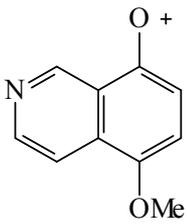
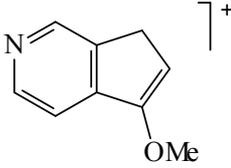
**Figura 18** - Estrutura da 5,8-dimetoxiisoquinolina [44].

Uma vez produzida a amina [43], foi realizada a ciclização empregando a reação de Pictet-Spengler, com ácido trifluoroacético, para a preparação da isoquinolina dimetoxilada [44], conforme metodologia descrita por Rousseau e Dodd (*apud* LE HYARIC *et alii*, 2002).

Nesta reação o ácido trifluoroacético foi adicionado à amina [43], sendo que a adição foi realizada sob atmosfera de nitrogênio, banho de gelo e com velocidade bastante lenta para que a reação de ciclização fosse favorecida. A mistura reacional foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica-gel, tendo como eluente hexano e acetato de etila, na proporção de 3:1 ( $R_f = 0,4$ ). Deste processo foi isolado um óleo amarelo em 68% de rendimento.

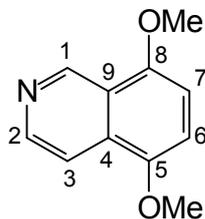
A confirmação estrutural da substância foi feita, inicialmente, pela análise do seu espectro de massas (**Figura 9A**, Apêndice). Na **tabela 3** estão indicados os principais sinais com os possíveis fragmentos iônicos.

**Tabela 3** – Principais sinais do EM para a 5,8-dimetoxiisoquinolina [44].

Íons ( $m/z$ )	% do pico base	Fragmento iônico
189	73	
174	100	
146	27	

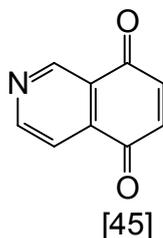
A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 5,8-dimetoxiisoquinolina [44] (**Figura 10A**, Apêndice) confirmou a estrutura da substância desejada, em primeira análise pela ausência dos sinais dos hidrogênios das metoxilas alifáticas. Outros fatos que corroboram esta idéia são os simpletos em  $\delta = 3,94$  e  $3,97$  dos hidrogênios dos grupos metoxilas aromáticos, e o simpleto em  $\delta = 9,57$  associado ao hidrogênio H1. Outros sinais relevantes são o duplete em  $\delta = 8,55$  ( $J = 5,6$  Hz), do hidrogênio H2; o duplete em  $\delta = 7,92$  do H3 ( $J = 5,6$  Hz); o duplete em  $\delta = 6,73$  ( $J = 9,0$  Hz) do H6; e o duplete em  $\delta = 6,88$  ( $J = 9,0$  Hz) do H7.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 11A**, Apêndice) os sinais em  $\delta = 55,8$  e  $55,9$ , foram associados aos carbonos das metoxilas aromáticas. Já os sinais em  $\delta = 147,2$ ;  $\delta = 143,3$ ; e  $\delta = 114,7$  foram atribuídos respectivamente aos carbonos C1, C2 e C3 da parte heterocíclica da isoquinolina. Os carbonos do outro anel foram atribuídos da seguinte forma:  $\delta = 121,3$  (C4);  $\delta = 148,5$  (C5);  $\delta = 103,5$  (C6);  $\delta = 107,8$  (C7),  $\delta = 149,8$  (C8); e  $\delta = 129,5$  (C9).



**Figura 19** - Estrutura da isoquinolinodimetoxilada [44] com os carbonos numerados.

### 3.5. Preparação da isoquinolino-5,8-diona [45]

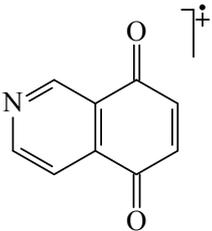
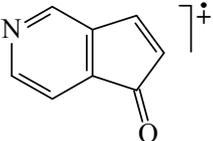
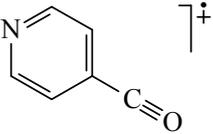
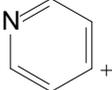


**Figura 20** - Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [45].

Segundo Carrijo e Romero (2000) a oxidação de sistemas aromáticos para quinonas utilizando oxidantes de cério (IV) se processa, normalmente, com bons rendimentos. Baseando-se no procedimento descrito por Owton (1999) a isoquinolino-5,8-diona [45] foi preparada através da oxidação da 5,8-dimetoxiisoquinolina [44] com nitrato de cério amoniacal (CAN), tendo como solvente uma mistura de acetonitrila e água 40%. Nesse procedimento, a 5,8-dimetoxiisoquinolina [44] dissolvida em acetonitrila foi tratada com quatro equivalentes de CAN. A reação foi realizada em banho de gelo (0 °C), adicionando-se o CAN bem lentamente (1 h). A mistura reacional foi deixada sob agitação durante uma hora, a 0 °C. Após este período, foi observado por CCD que o material de partida já havia sido consumido. O produto obtido na forma de um sólido amarelo com faixa de fusão observada entre 136 e 137 °C foi submetido à purificação em coluna cromatográfica tendo como eluente hexano e acetato de etila na proporção de 2:1 ( $R_f = 0,3$ ), com 65% de rendimento, entretanto, tivemos dificuldade para purificá-lo já que o mesmo é bastante instável. A estrutura de [45] foi confirmada por CG-EM e RMN de  $^1\text{H}$ .

A confirmação estrutural da isoquinolino-5,8-diona foi feita, inicialmente, pela análise do seu espectro de massas (**Figura 12A**, Apêndice). Na **Tabela 4** estão indicados os principais sinais com os possíveis fragmentos iônicos.

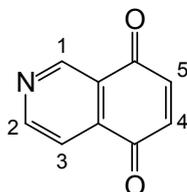
**Tabela 4** – Principais sinais do EM para a isoquinolino-5,8-diona [45].

Íons ( $m/z$ )	% do pico base	Fragmento iônico
159	100	
131	11	
105	25	
77	17	

O espectro de massas para a isoquinolino-5,8-diona [45] mostrou o íon molecular em  $m/z=159$ . A perda de CO ( $M-28$ ) forneceu o íon em  $m/z=131$ . Com a perda  $HC\equiv CH$  forneceu o íon em  $m/z=105$ , que por sua vez perdeu novamente CO fornecendo o sinal em  $m/z=77$ .

O espectro de RMN  $^1H$  apresenta sinais condizentes com [45] (**Figura 13A**, Apêndice) e confirma a presença dos 5 hidrogênios da isoquinolino-5,8-diona como dois dupletos em  $\delta = 7,07$  ( $J = 9,0$  Hz) para o hidrogênio H4 e em  $\delta = 7,14$  ( $J = 9,0$  Hz) para o H5; um duplete em  $\delta = 7,93$  ( $J = 4,7$  Hz) para o H3, além do duplete em  $\delta = 9,04$  ( $J = 4,7$  Hz)

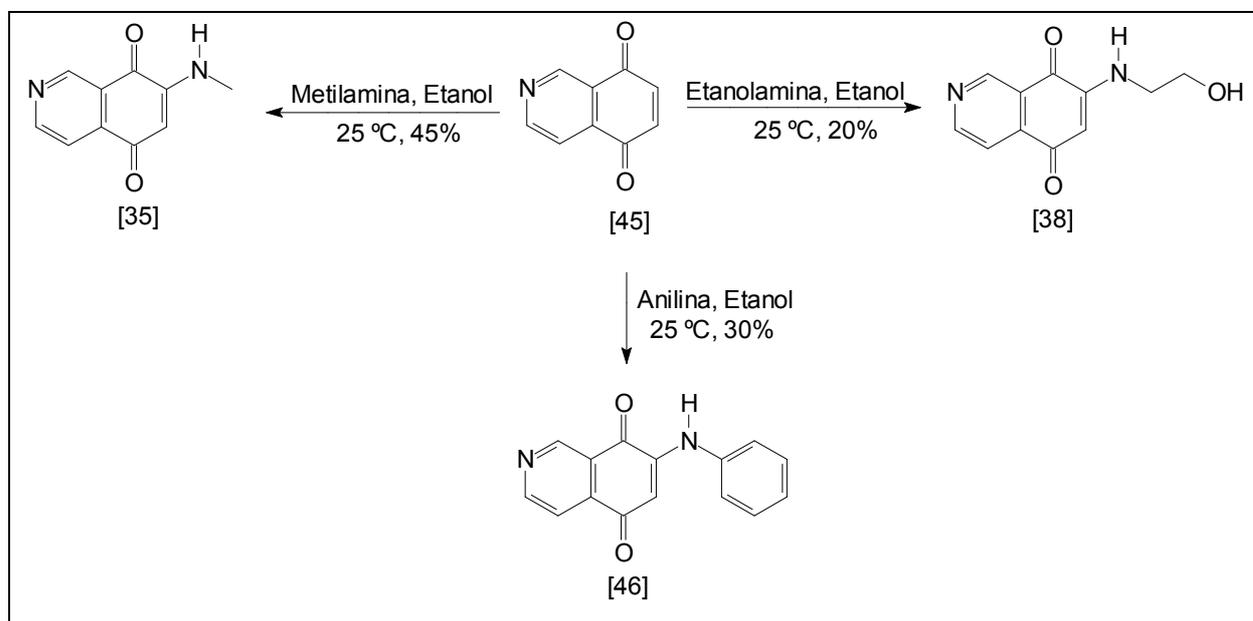
para o H2 e do simpleto em  $\delta = 9,24$  para o H1. Associado a estes dados tem-se a ausência dos sinais referentes às metoxilas aromáticas em  $\delta = 3,94$  e  $3,97$ .



**Figura 21** - Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [45] com os hidrogênios numerados.

A etapa seguinte do trabalho consistiu na conversão da isoquinolino-5,8-diona [45] nas caulibugulonas A [35], D [38] e no análogo [46], conforme mostrado no **Esquema 49** a seguir.

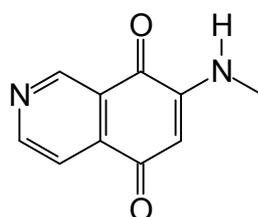
### 3.6. Preparação da caulibugulona A [35]



**Esquema 49** - Esquema geral das sínteses das isoquinolino-5,8-dionas [35], [38] e [46].

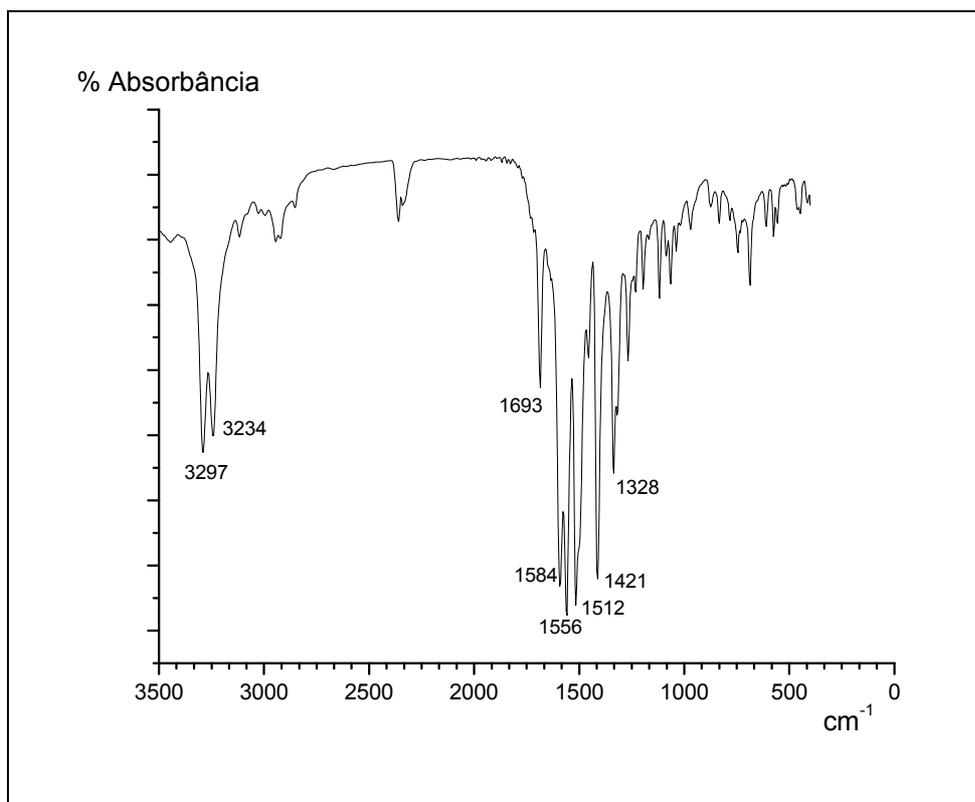
Para a obtenção das isoquinolino-5,8-dionas, mostradas na no esquema 49, decidiu-se utilizar etanol 95%, uma vez que Ryu e colaboradores (1999) já haviam alcançado bons resultados na síntese de outros derivados da isoquinolino-5,8-diona [45]. As misturas reacionais permaneceram sob agitação magnética por aproximadamente duas horas, sendo constantemente monitoradas por meio de análises cromatográficas em camada delgada. Após duas horas de agitação as misturas reacionais foram elaboradas e submetidas a processo cromatográfico em placa preparativa.

O primeiro derivado sintetizado foi a caulibugulona A [35], cujo indício da sua formação se deu pelo aparecimento de um ponto que absorve luz UV, em CCD, apresentando valor de  $R_f$  maior que o da isoquinolino-5,8-diona [45]. Após a elaboração da mistura reacional e separação por cromatografia preparativa utilizando-se como eluente diclorometano e metanol (200:1,  $R_f= 0,4$ ) obteve-se a caulibugulona A [35] em 45% de rendimento na forma de um sólido vermelho com faixa de fusão observada entre 228 e 230 °C.



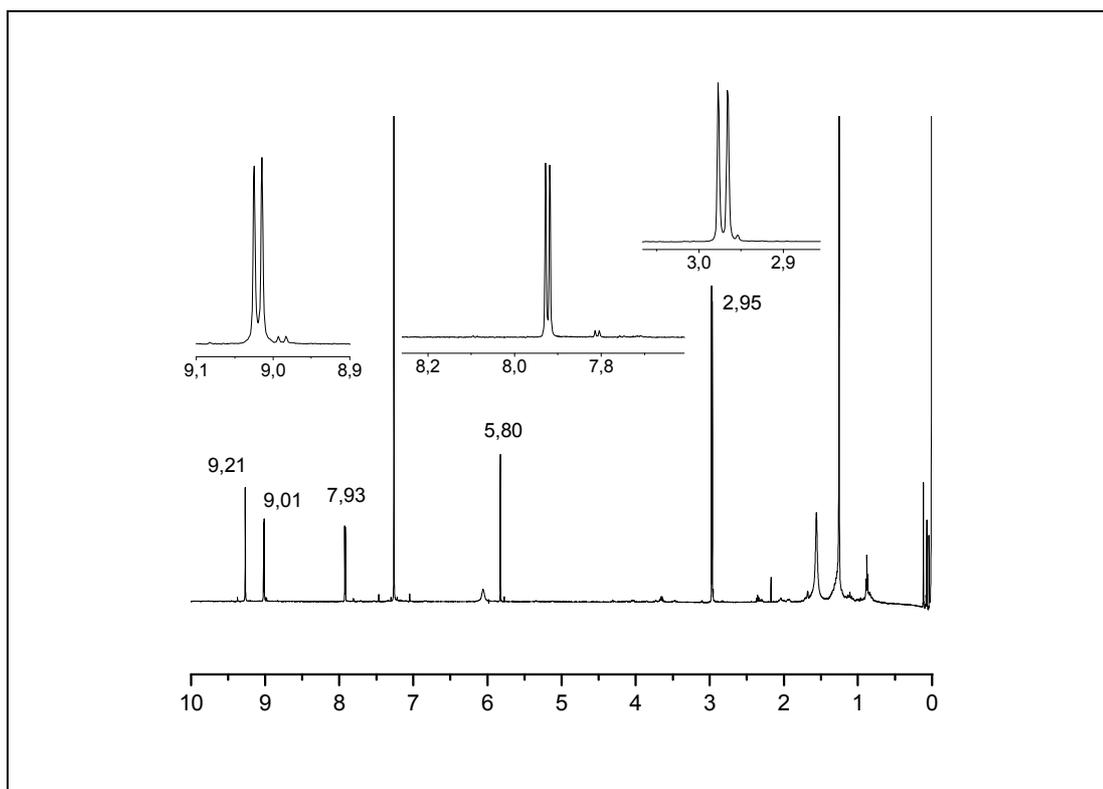
**Figura 22** - Estrutura da caulibugulona A [35].

A obtenção da caulibugulona A [35] foi evidenciada, inicialmente, pela análise do espectro no IV (**Figura 23**), no qual verificou-se o aparecimento de sinais em  $3297\text{ cm}^{-1}$ , atribuído à deformação axial do grupo  $\text{CH}_3$ , e em  $1693\text{ cm}^{-1}$ , referente à absorção da carbonila cetônica de quinona. A presença do anel aromático na molécula do produto é suportada pelos sinais em  $1584$  e  $1556\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento da ligação  $\text{C}=\text{C}$ .



**Figura 23** - Espectro no infravermelho da Caulibugulona A [35].

Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  detectados nos espectros de RMN estão relacionados nas **Tabelas 5** e **6**, respectivamente. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 24**) observam-se os sinais do hidrogênio H1 em  $\delta = 9,21$  sob a forma de um simpleto e em  $\delta = 9,01$  ( $J = 4,4$  Hz) para o hidrogênio H2, sob a forma de um duplete. Os hidrogênios H3 sob a forma de um duplete em  $\delta = 7,93$  ( $J = 4,4$  Hz) e H4 sob a forma de um simpleto em  $\delta = 5,80$ . E, finalmente, os hidrogênios da metila apareceram sob a forma de um simpleto em  $\delta = 2,95$  e o sinal do hidrogênio ligado ao nitrogênio em  $\delta = 6,08$  como um simpleto alargado.

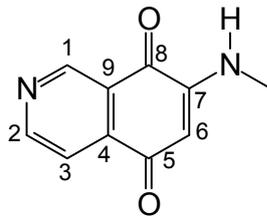


**Figura 24** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da caulibugulona A [35].

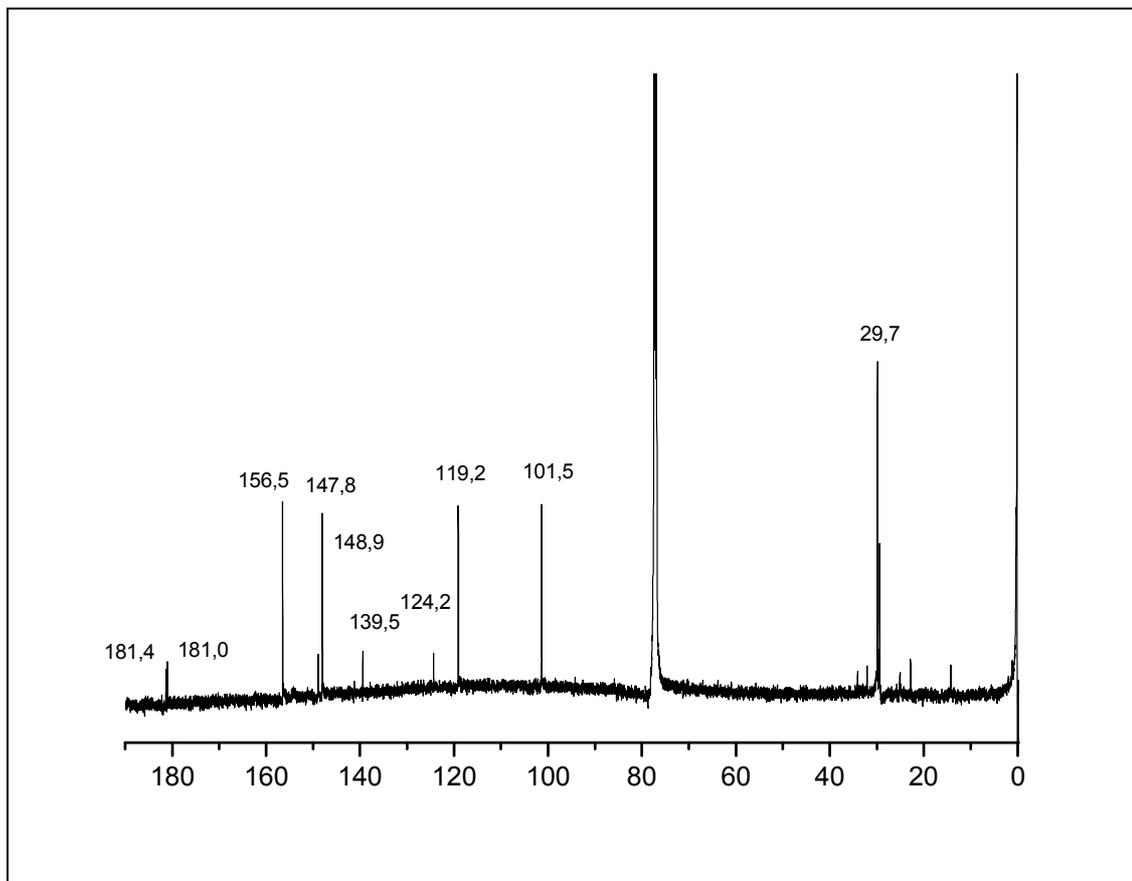
**Tabela 5** – Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da caulibugulona A [35] sintética, comparados com valores citados na literatura.

	Sintética	Literatura
H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	9,21	9,14
2	9,01 ( $J= 4,4$ Hz)	8,92 ( $J= 4,5$ Hz)
3	7,93 ( $J= 4,4$ Hz)	7,91 ( $J= 4,5$ Hz)
4	5,80	5,76
Metila	2,95	2,92

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 26**) verifica-se em  $\delta = 147,8$  o sinal do carbono C1. O sinal do C2 em  $\delta = 156,5$ ; C3 em  $\delta = 119,2$ ; C4 em  $\delta = 139,5$ ; C5 em  $\delta = 181,4$ ; C6 em  $\delta = 101,5$ ; C7 em  $\delta = 148,9$ ; C8 em  $\delta = 181,0$ ; C9 em  $\delta = 124,2$  e a metila em  $\delta = 29,7$ .



**Figura 25** - Estrutura da caulibugulona A [35] com os carbonos numerados.



**Figura 26** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da caulibugulona A [35].

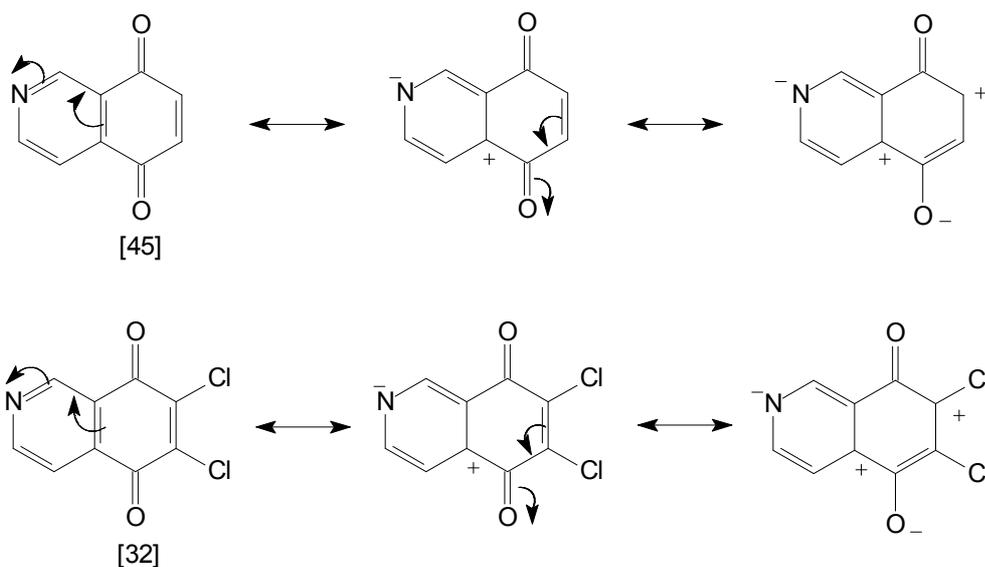
**Tabela 6** – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  da caulibugulona A [35] sintética, comparados com valores citados na literatura.

	Sintética	Literatura
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	147,8	147,8
2	152,5	156,1
3	119,2	120,0
4	139,5	140,7
5	181,4	181,4
6	101,5	100,6
7	148,9	150,7
8	181,0	181,4
9	124,2	125,6
Metila	29,7	29,3

Os valores dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e de RMN  $^{13}\text{C}$  da caulibugulona A [35] sintetizada quando comparados com os registrados na literatura por Wipf e colaboradores (2004) para a caulibugulona A natural isolada da *Caulibugula intermis* serviram para confirmar a formação do composto sintético.

### 3.7. Substituições no carbono 7 de isoquinolino-5,8-dionas.

Nas reações de substituição do hidrogênio ou do cloro nas isoquinolino-5,8-dionas [45] e [32] pelas alquil ou arilaminas (**Esquema 50**) é observado a substituição preferencial no carbono 7. Tal comportamento deve-se, provavelmente, à carbonila que está em *para* em relação ao nitrogênio (C5) possuir menos densidade eletrônica que a carbonila em posição *meta* ao nitrogênio (C8), como mostrado nas estruturas de ressonância a seguir.



**Esquema 50** – Estruturas de ressonância para as isoquinolino-5,8-dionas.

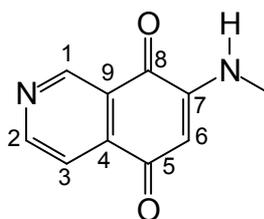
A posição de ataque dos nucleófilos à quinona depende de qual dos dois grupos carbonílicos atrairá mais os elétrons da dupla ligação etilênica. O átomo de carbono carbonílico  $C_5=O$  da isoquinolino-5,8-diona se situa em posição  $\gamma$  ao átomo de nitrogênio de piridina, e por isso é mais deficiente em elétrons. Já o átomo de carbono carbonílico  $C_8=O$  ocupa a posição  $\beta$  do anel de piridina. Esta maior deficiência no átomo de carbono 5 se transfere ao carbono 7 por conjugação e permite um ataque preferencial de nucleófilos a esta posição (SHAIKH *et alii*, 1986).

### 3.8. Estudos de RMN para a caulibugulona A.

No intuito de obter mais informações a respeito da reação de formação de caulibugulonas e análogos a partir de isoquinolino-5,8-dionas com ou sem substituintes nas posições 6 e 7 foram realizados estudos de RMN da caulibugulona A [35]. A análise do espectro de RMN 2D [ $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -HMBC] (correlação carbono-hidrogênio a longa distância) forneceu a correta posição (entre as duas possibilidades) dos grupos amínicos nestas substâncias. Os resultados estão apresentados na **Tabela 7** e nas **Figuras 28** e **29**.

**Tabela 7** – Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no espectro de HMBC da caulibugulona A [35]

Deslocamento (ppm) $^1\text{H}$	Correlações $^{13}\text{C}$ Observadas	Hidrogênio
9,21	C-2, C-4, C-9	H1
9,01	C-1, C-3, C-4	H2
7,93	C-2, C-5, C-9	H3
5,80	C-4, C-5, C-8	H6
2,95	C-7	Metila



**Figura 27** - Estruturas da caulibugulona A [35] com hidrogênios e carbonos numerados.

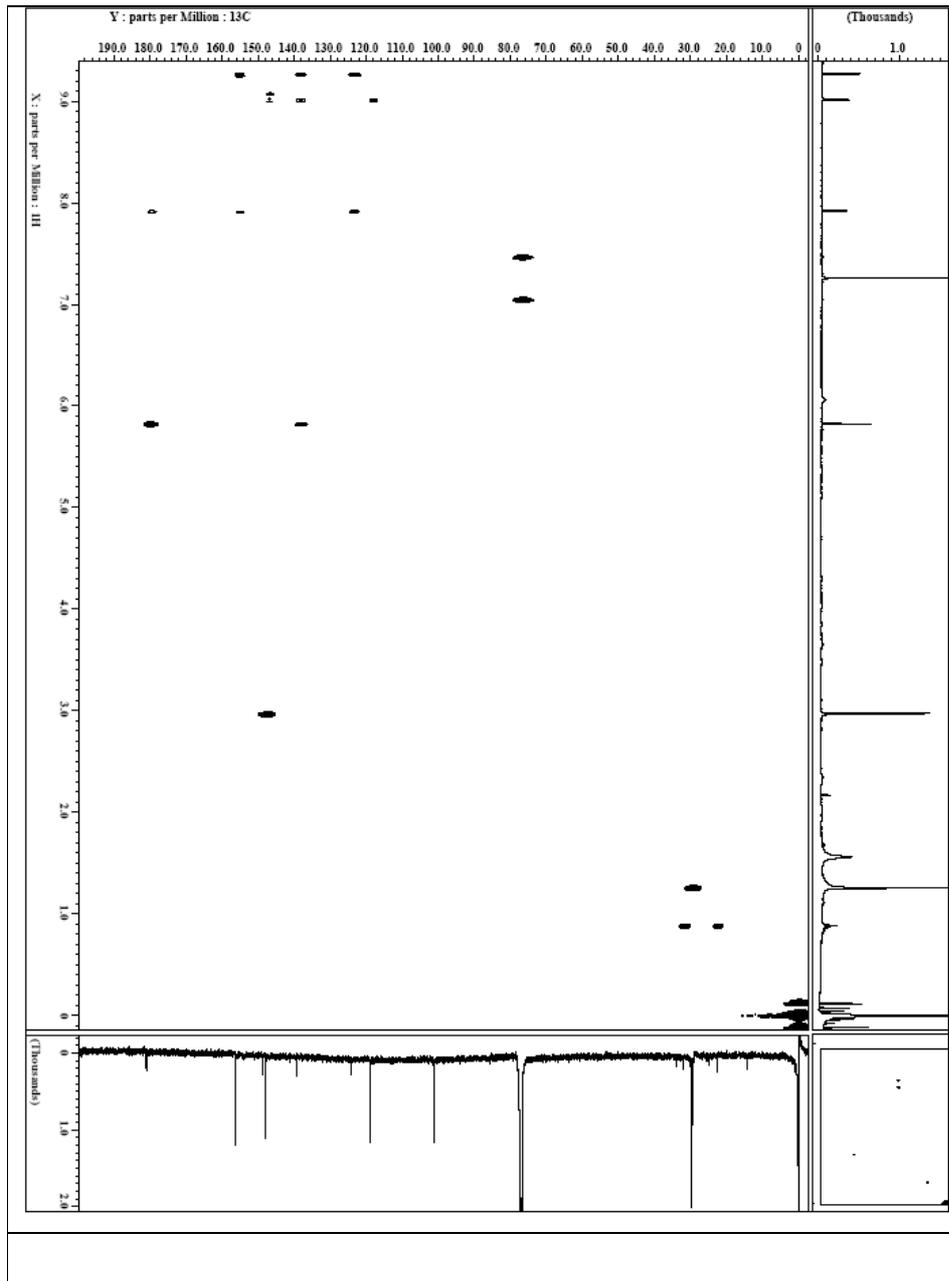


Figura 28 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -HMBC] da caulibugulona A [35].

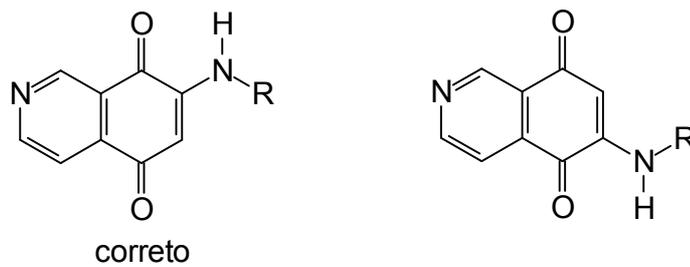


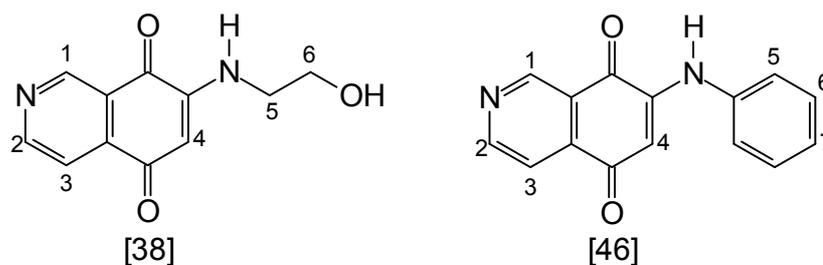
Figura 29 – Posição correta dos grupos amínicos na caulibugulona A e análogos.

### 3.9. Preparação da caulibugulona D [38] e do análogo [46].

Para a obtenção da caulibugulona D [38] e do análogo [46], decidiu-se utilizar etanol 95% da mesma forma que descrito no item 3.6. As misturas reacionais permaneceram sob agitação magnética por aproximadamente duas horas, sendo constantemente monitoradas por meio de análises cromatográficas em camada delgada. Após duas horas de agitação as misturas reacionais foram elaboradas e submetidas a processo cromatográfico em placa preparativa, utilizando-se como eluente diclorometano e metanol (200:1). Obteve-se a caulibugulona D [38] ( $R_f = 0,3$ ) em 20% de rendimento na forma de um sólido vermelho com faixa de fusão observada entre 189 e 191 e o análogo [46] ( $R_f = 0,4$ ) em 55% de rendimento na forma de um sólido vermelho com faixa de fusão observada entre 144 e 145 °C.

Para a identificação da caulibugulona D [38] e do análogo [46] foi utilizado o mesmo processo de análise citado para a caulibugulona A [35]. Os respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  encontram-se no Apêndice **Figuras 14A e 15A**.

Na **Tabela 8** são mostrados os principais dados de RMN de  $^1\text{H}$ , para as isoquinolino-5,8-dionas [38] e [46].



**Figura 30** – Estruturas da caulibugulona D [38] e da isoquinolino-5,8-diona [46].

**Tabela 8** – Principais dados de RMN  $^1\text{H}$  para as isoquinolino-5,8-dionas [38] e [46]

Substância	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H-O
[38]	9,14 (s)	8,96 (d)	7,91 (d)	5,91 (s)	3,41 (t)	3,79 (t)	-	1,28 (s)
[46]	9,34 (s)	9,05 (d)	7,90 (d)	7,65 (s)	7,26 (d)	7,29 (dd)	7,45 (t)	-

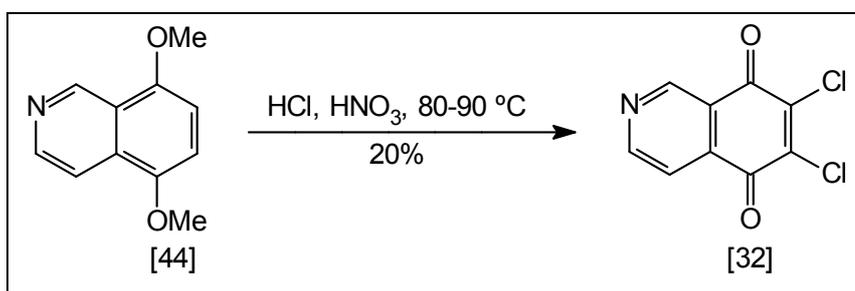
**Tabela 9** – Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da caulibugulona D [38] sintética, comparados com valores citados na literatura.

H	Sintética	Literatura
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	9,14	9,17
2	8,96 ( $J = 5,2$ Hz)	8,94 ( $J = 4,2$ Hz)
3	7,91 ( $J = 5,4$ Hz)	7,92 ( $J = 5,0$ Hz)
4	5,91	5,86
5	3,41 ( $J = 5,3$ Hz)	3,35 ( $J = 5,4$ Hz)
6	3,79 ( $J = 5,3$ Hz)	3,78 ( $J = 5,4$ Hz)

Os valores dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  da caulibugulona D [38] sintetizada quando comparados com os registrados na literatura por Wipf e colaboradores (2004) para a caulibugulona D natural isolada da *Caulibugula intermis* serviram para confirmar a formação da substância sintética.

### 3.10. Preparação da 6,7-dicloroisoquinolino-5,8-diona [32].

A partir da proposta de síntese do esquema 47 foram preparados o derivado clorado [32] e análogos. Considerando que, neste trabalho, substâncias possuindo halogênios na posição 6 ainda não tinham sido preparados, decidiu-se sintetizar também o composto [32], com o intuito de ampliar as possibilidades de sínteses de compostos potencialmente anticancerígenos.

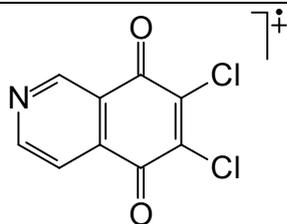
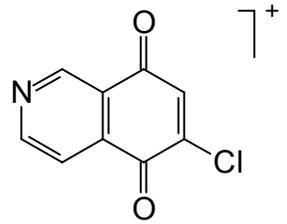
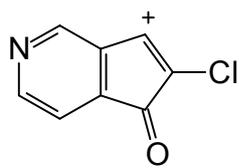
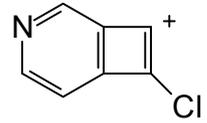


**Esquema 51** - Síntese da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32].

Para o preparo da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] foi adicionado ácido nítrico concentrado, bem lentamente, a uma solução de isoquinolina dimetoxilada [44] em ácido clorídrico, sob agitação magnética e à temperatura de 80-90 °C. A mistura reacional foi elaborada quando se verificou, através de cromatografia em camada delgada, que o material de partida havia sido consumido. Com a elaboração da reação, seguida da separação por cromatografia em coluna de sílica-gel usando-se como eluente hexano e acetato de etila 1:1 ( $R_f = 0,6$ ), o produto diclorado [32] foi obtido com rendimento de 20%, como um sólido amarelo com faixa de fusão observada entre 179 e 181 °C.

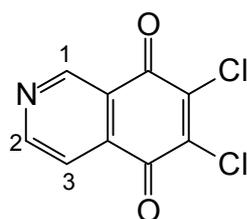
A confirmação estrutural da isoquinolino-5,8-diona [32] foi feita, inicialmente, pela análise do seu espectro de massas. Na **Tabela 10** estão indicados os principais sinais com os possíveis fragmentos iônicos.

**Tabela 10** – Principais sinais do EM para a isoquinolino-5,8-diona diclorada [32].

Íons (m/z)	% do pico base	Fragmento iônico
229	100	
192	68	
164	64	
136	45	

O espectro de massas para a isoquinolino-5,8-diona diclorada [33] (**Figura 16A**, Apêndice) confirmou sua estrutura, primeiramente, com a presença de um pico a (M+4) em  $m/z=231$  além do pico (M+2) em  $m/z=229$ , devido à presença de íons moleculares contendo átomos dos isótopos mais pesados. O modo de fragmentação da diclorada [33] mostra um íon em  $m/z=192$  devido a perda de HCl (M-36). Com a perda CO forneceu o íon em  $m/z=164$ , que por sua vez perdeu novamente CO fornecendo o sinal em  $m/z=136$ .

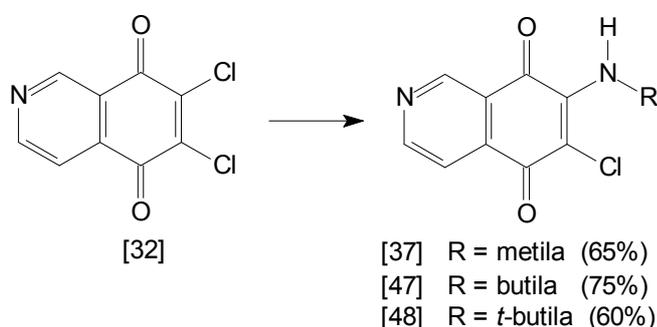
A obtenção da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] também foi evidenciada pela análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 17A**, Apêndice), onde foi observada a ausência dos dupletos em  $\delta = 7,07$  e  $7,14$  referentes aos hidrogênios H4 e H5, e dos sinais das metoxilas em  $\delta = 3,94$  e  $3,97$ . Também foram observados um duplete em  $\delta = 8,02$  ( $J = 4,5$  Hz) para o hidrogênio H3; um duplete em  $\delta = 9,06$  ( $J = 4,5$  Hz) para o hidrogênio H2 e um simpleto para o hidrogênio H1 em  $\delta = 9,43$ , confirmando a estrutura do produto desejado.



**Figura 31** – Estruturas da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32].

### 3.11. Isoquinolino-5,8-dionas derivadas da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32].

A etapa seguinte, da síntese proposta no **Esquema 47**, consistiu na conversão do composto [32] nas alquiloisoquinolino-5,8-dionas [37], [47] e [48], bem como nas arilisoquinolino-5,8-dionas [33], [49], [50], [51] e [52] (**Figura 13**) com o intuito de investigar a necessidade de grupos alifáticos ou aromáticos para a atividade anticancerígena em isoquinolino-5,8-diona contendo cloro.



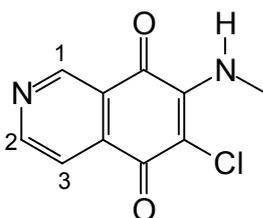
**Esquema 52** - Esquema geral da síntese das alquiloisoquinolino-5,8-dionas cloradas.

### 3.12. Preparação das alquilsisoquinolino-5,8-dionas [37], [47] e [48].

Para obtenção das alquilsisoquinolino-5,8-dionas, mostradas no **Esquema 52**, decidiu-se utilizar metodologia descrita por Ryu e colaboradores (1999).

As misturas reacionais, contendo a isoquinolinadiona diclorada [32], etanol 95% e a metilamina ou a butilamina ou a *t*-butilamina, de aspecto amarelado, permaneceram sob agitação magnética por aproximadamente uma hora, sob refluxo. As misturas foram constantemente monitoradas por meio de análises cromatográficas em camada delgada. Após este intervalo de tempo, as misturas reacionais foram elaboradas e submetidas a processo cromatográfico de separação.

A primeira alquilsisoquinolino-5,8-diona clorada sintetizada foi a caulibugulona C [37], cujo indício da sua formação se deu pelo aparecimento de um ponto que absorve luz UV, em CCD, apresentando valor de  $R_f$  maior que o da dicloroisoquinolino-5,8-diona [32]. Após a elaboração da mistura reacional, seguida da separação por cromatografia preparativa, utilizando-se como eluente DCM e metanol (200:1,  $R_f = 0,3$ ) foi obtida como um sólido vermelho tendo como rendimento 65% com faixa de fusão observada entre 219 e 220 °C.



**Figura 32** – Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [37].

A obtenção da caulibugulona C [37] foi evidenciada pela análise de seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 18A**, Apêndice), com o sinal do hidrogênio H1 em  $\delta$  9,35 sob a forma de um simpleto, o hidrogênio H2 em  $\delta$  9,09 ( $J = 4,9$  Hz) sob a forma de um duplete, o hidrogênio H3 em  $\delta$  8,04 ( $J = 4,9$  Hz) sob a forma de um duplete e a metila

em  $\delta$  3,52 apareceu sob a forma de um simpleto. E, finalmente, o hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio em  $\delta$  6,30 apareceu sob a forma de um simpleto alargado.

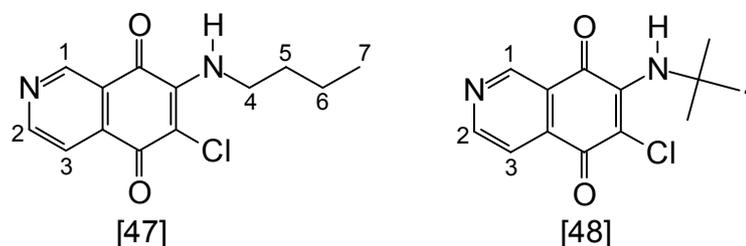
Os valores dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  da caulibugulona C [37] sintetizada quando comparados com os registrados na literatura por Wipf e colaboradores (2004) para a caulibugulona C natural isolada da *Caulibugula intermis* serviram para confirmar a formação da substância sintética (**Tabela 11**).

**Tabela 11** – Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da caulibugulona C [37] sintética, comparados com valores citados na literatura.

	Sintética	Literatura
H	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	9,35	9,35
2	9,09 ( $J = 4,9$ Hz)	9,01 ( $J = 5,0$ Hz)
3	8,04 ( $J = 4,9$ Hz)	7,98 ( $J = 5,0$ Hz)
Metila	3,52	3,38

Para a identificação das isoquinolino-5,8-dionas [47] e [48] foi utilizado o mesmo processo de análise citado para a isoquinolino-5,8-diona [37]. Os respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  encontram-se no Apêndice (**Figuras 19A e 20A**).

Na **Tabela 12** são mostrados os principais dados de RMN de  $^1\text{H}$ , para as isoquinolino-5,8-dionas [47] e [48].



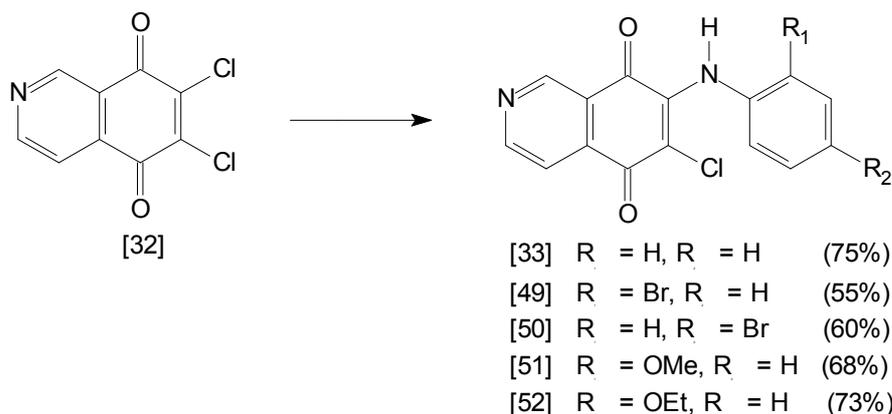
**Figura 33** – Estruturas das isoquinolino-5,8-dionas [47] e [48].

**Tabela 12** - Principais dados de RMN  $^1\text{H}$  para as isoquinolino-5,8-dionas [47] e [48]

Subst.	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H-N
[47]	9,24 (s)	8,99 (d)	7,94 (d)	3,87 (m)	1,68 (m)	1,43 (m)	0,96 (t)	6,20 (s)
[48]	8,90 (d)	8,85 (dd)	7,83 (d)	1,28 (s)	-	-	-	-

### 3.13. Preparação das Arilisoquinolino-5,8-dionas [33], [49], [50], [51] e [52].

Considerando que, neste trabalho, substâncias possuindo grupos aromáticos ligados ao nitrogênio na posição 7 ainda não tinham sido preparadas, decidiu-se sintetizar também as substâncias [33], [49], [50], [51] e [52], com o intuito de ampliar as possibilidades de sínteses de substâncias com atividade anticancerígena.

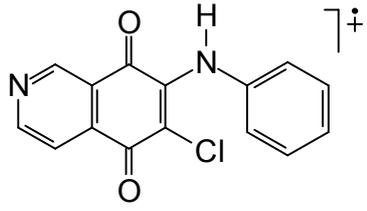
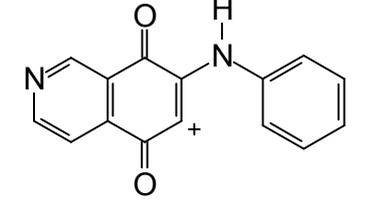
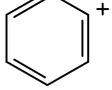
**Esquema 53** - Esquema geral da síntese das arilisoquinolino-5,8-dionas.

A partir da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] foi submetida a reações de substituição de cloro por arilaminas, na presença de etanol. Para isso, foram dissolvidas em etanol 95%, e, sob agitação magnética e temperatura ambiente (25 °C), adicionaram-se as arilaminas. As misturas de coloração amareladas permaneceram reagindo por um período aproximado de uma hora. Após este período, as misturas reagentes foram elaboradas e submetidas à purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel.

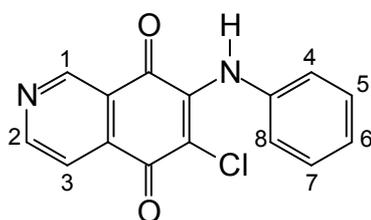
A primeira arilisoquinolino-5,8-diona sintetizada foi a [33], cujo indício da sua formação se deu pelo aparecimento de um ponto que absorve luz UV, em CCD, apresentando valor de  $R_f$  maior que o da isoquinolino-5,8-diona [32]. Após a elaboração da mistura reacional, seguida da separação por cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando-se como eluente diclorometano e metanol (200:1,  $R_f=0,3$ ), foi obtida a arilisoquinolino-5,8-diona [33] em 75% de rendimento como um sólido vermelho com faixa de fusão observada entre 299 e 300 °C.

A obtenção da arilisoquinolino-5,8-diona [33] foi evidenciada, inicialmente, pela análise do espectro de massas (**Figura 21A**, Apêndice) que apresentou o pico referente ao íon molecular em  $m/z=284$  (70%). O espectro de massas apresentou ainda um pico em  $m/z=286$  mostrando a presença de cloro ( $M+2$ ) com aproximadamente um terço da intensidade do pico do íon molecular, confirmando a presença de íons moleculares contendo o isótopo mais pesado. A perda de HCl ( $M-36$ ) forneceu o íon em  $m/z=249$ . O espectro apresentou um sinal em  $m/z=77$  característico de anel aromático. Na **Tabela 13** estão indicados os principais sinais com os possíveis fragmentos iônicos.

**Tabela 13** – Principais sinais do EM para a isoquinolino-5,8-diona clorada [33].

Íon ( $m/z$ )	% do pico base	Fragmento iônico
284	70	
249	100	
77	83	

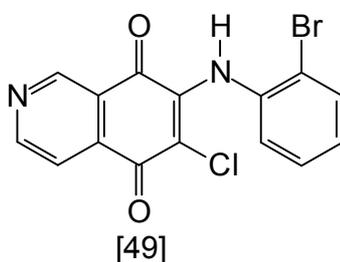
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 22A**, Apêndice) o sinal dos hidrogênios H1 ( $\delta = 9,33$ ) apareceu sob a forma de um simpleto e os hidrogênios H2 e H3 em  $\delta = 9,07$  ( $J = 5,0$  Hz) e  $7,99$  ( $J = 5,0$  Hz), respectivamente, apareceram sob a forma de dois dupletos. Os hidrogênios aromáticos apareceram sob a forma de dupletos em  $\delta = 7,10$  ( $J = 7,6$  Hz) (H4 e H8); de um multipletos em  $7,26$  (H5 e H7) e de um multipletos em  $7,38$  (H6), não observados no material de partida e ainda um simpleto em  $\delta = 7,78$  referente ao NH.



**Figura 34** – Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [33].

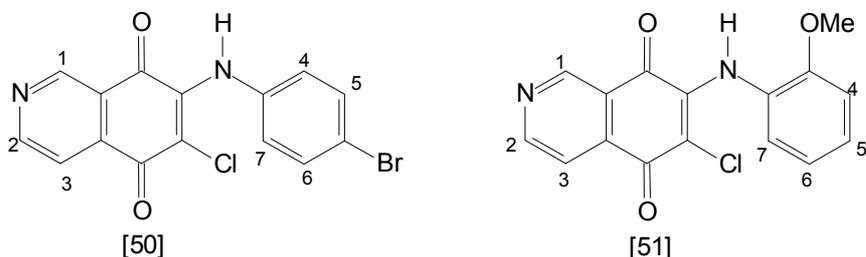
Para a identificação das arilisoquinolino-5,8-dionas [49], [50], [51] e [52] foi utilizado o mesmo processo de análise citado para a substância [33]. Os respectivos espectros de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e massas, encontram-se no Apêndice (**Figuras de 23A a 26A**).

A obtenção da arilisoquinolino-5,8-diona [49] foi evidenciada pela análise do espectro no IV (**Figura 23A**, Apêndice), em que se verificaram o aparecimento do sinal em  $3.248\text{ cm}^{-1}$  atribuído à deformação axial de C-H de aromático e pelo sinal em  $1.593\text{ cm}^{-1}$  e em  $1561\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento da ligação C=C. A presença da carbonila cetônica de quinona na molécula do produto foi caracterizada pelo sinal em  $1.686\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 35** – Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [49].

Na **Tabela 14** são mostrados os principais dados de RMN de  $^1\text{H}$  para as arilisoquinolino-5,8-dionas [50] e [51].



**Figura 36** – Estruturas das isoquinolino-5,8-dionas [50] e [51] com os hidrogênios numerados.

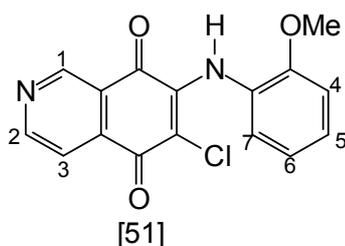
**Tabela 14** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para as arilisoquinolino-5,8-dionas [39], [40] e [41].

Subst.	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H-N	MeO
[50]	9,29 (s)	9,02 (d)	7,97 (d)	7,45 (d)	6,95 (d)	6,95 (d)	7,45 (d)	7,75	-
[51]	9,32 (s)	9,05 (d)	7,99 (d)	7,02 (*)	6,92 (dd)	6,97 (dd)	7,24 (*)	7,67	3,84 (s)

\* A multiplicidade do sinal não ficou bem definida.

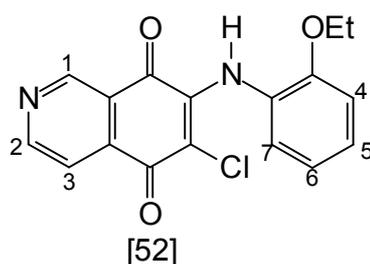
Na análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , mostrados na **Tabela 14** verificou-se que os sinais de hidrogênios na região de  $\delta = 6,97$  a  $7,45$  confirmaram a presença dos anéis aromáticos nas arilisoquinolino-5,8-dionas [50] e [51].

A confirmação da metoxila em C1', na arilisoquinolino-5,8-diona [51] (**Figura 37**), foi evidenciada através da observação de um sinal em  $\delta = 3,84$ , sob a forma de um simpleto para três hidrogênios, como pode ser observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 25A**, Apêndice).



**Figura 37** – Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [51] com os hidrogênios numerados.

A confirmação da etoxila na arilisoquinolino-5,8-diona [52] se deu pela análise de seu espectro de massas onde se verificou, primeiramente, a presença do íon molecular em  $m/z=328$ . A confirmação da presença da etoxila se deu pelo pico em  $m/z=264$  (100%) referente ao sinal do íon molecular menos o cloreto de etila, como pode ser verificado na tabela a seguir e na **Figura 26A** (Apêndice). Na **Tabela 15** estão indicados os principais sinais com os possíveis fragmentos iônicos.



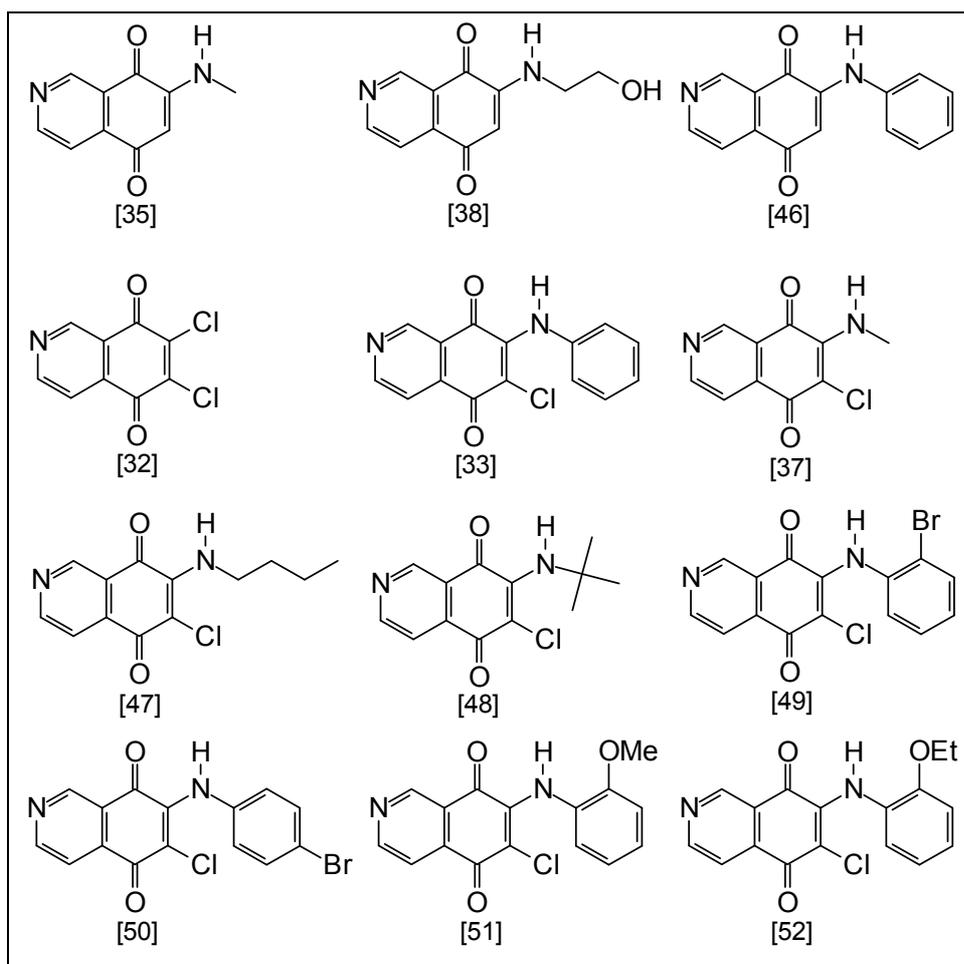
**Figura 38** – Estrutura da isoquinolino-5,8-diona [52] com os hidrogênios numerados.

**Tabela 15** – Principais sinais do EM para a arilisoquinolino-5,8-diona [52].

Íon (m/z)	% do pico base	Fragmento iônico
328	87,9	
264	100	

#### 4. METODOLOGIA

Na primeira etapa deste trabalho, foram sintetizadas as caulibugulonas A [35], C [37] e D [38], já conhecidas na literatura (WIPF *et alii*, 2004) e os análogos [46], [32], [33], [47], [48], [49], [50], [51] e [52], conforme mostrado na figura a seguir:



**Figura 39** – Caulibugulonas A [35], C [37], D [38] e análogos sintetizados.

Na segunda etapa, foram realizados testes com células cancerígenas - U937 (leucemia humana, linhagem monocítica), MOLT4 (leucemia humana, linhagem linfocítica), COLO205 (câncer de colon humano, linhagem epitelioide) e H460 (câncer pulmonar humano, linhagem epitelioide) com as substâncias sintetizadas em várias dosagens (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), sendo avaliada a taxa de apoptose por microscopia de fluorescência e avaliação da taxa metabólica por espectrofotometria.

#### 4.1. Instrumentos para caracterização das substâncias sintetizadas

Como mencionado anteriormente, para devida caracterização dos compostos sintetizados foram utilizadas as seguintes técnicas: **(i)** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), **(ii)** Espectroscopia no infravermelho (IV) e **(iii)** Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de Hidrogênio-1 ( $^1\text{H}$ ), Carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) e HMBC.

Todos os solventes utilizados nas reações e separações foram de grau técnico, tendo sido previamente tratados como é indicado por Perrin e Armarego (1988). Os solventes foram evaporados em um evaporador rotatório FISATOM, operando à pressão reduzida.

**(i)** As análises de CG-EM dos compostos foram feitas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas SHIMADZU modelo QP5050A (LCQUI-UENF) utilizando-se um método com as seguintes especificações:

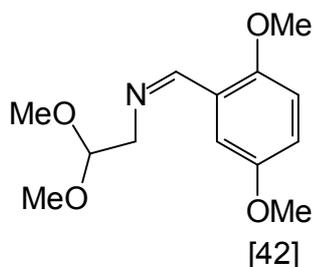
- Coluna: DB-5, 30 metros, DI 0,25 mm.
- Gás de arraste: Hélio.
- Temperatura do injetor: 280 °C.
- Programa de temperatura para a coluna:
  - \* Temperatura inicial: 50 °C (1 min).
  - \* Temperatura final: 280 °C (7 min).
  - \* Gradiente de temperatura: 15 °C/min (12 min).
- Temperatura do detector: 280 °C.
- Programa de pressão:
  - \* Pressão inicial: 111 kPa (1 min).
  - \* Pressão final: 194 kPa (7 min).
  - \* Gradiente de Pressão: 15 kPa/min (12 min).
  - \* Ionização por impacto eletrônico (IE) 70 eV.
  - \* Obtenção do cromatograma de íons totais (TIC)

(ii) Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro SHIMADZU, modelo FTIR 8300 (LCQUI-UENF). As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr, já as amostras líquidas foram analisadas na forma de filme entre pastilhas de NaCl.

(iii) Os espectros de RMN foram obtidos nas frequências de 400 MHz e 100 MHz para em um espectrômetro JEOL Eclipse + 400 (LCQUI-UENF) e 500 MHz e 125,7 MHz em um espectrômetro Varian – INOVA 500 (IQ-UNICAMP), para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente, utilizando como solvente clorofórmio ou metanol deuterados.

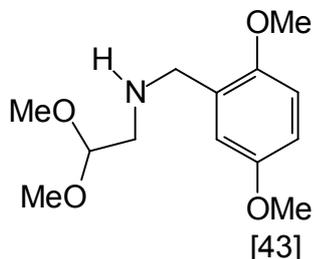
## 5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 5.1. Preparação da N-2,5-dimetoxibenziliden-N-2,2-dimetoxietilamina [42]



Colocaram-se em um balão de fundo redondo (100 mL) amino dimetilacetal (1 mmol; 105 mg; 0,109 mL) e 2,5-dimetoxibenzaldeído (1 mmol, 166,2 mg) em tolueno (30 mL) e manteve-se a solução sob agitação magnética à temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida, a mistura foi refluxada e a água gerada coletada em tubo Dean-Stark. A mistura permaneceu sob refluxo por 8 horas. Após o término da reação, o solvente (tolueno) foi sendo retirado aos poucos através do Dean-Stark até quase à secura. A total retirada do tolueno foi realizada em bomba de vácuo. A imina [42] foi isolada por coluna cromatográfica de sílica-gel, tendo como eluente hexano e acetato de etila (2:1, Rf= 0,6) e obtida como um óleo alaranjado com 95% de rendimento.

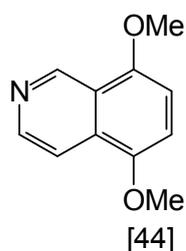
### 5.2. Preparação da N-[2,2-dimetoxietil]-N-[2,5-dimetoxibenzil]amina [43]



Colocaram-se em um balão de fundo redondo (50 mL) a imina [42] (400 mg; 1,58 mmol) e metanol (20 mL). Em seguida, adicionou-se boroidreto de sódio (57 mg; 1,5 mmol), sob agitação magnética, banho de gelo e atmosfera de nitrogênio. A solução permaneceu sob agitação por 2 horas. Após este intervalo de tempo, evaporou-se o

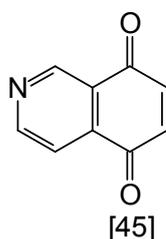
metanol em evaporador rotativo, adicionaram-se água destilada (10 mL) e solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Em seguida, extraiu-se o produto com diclorometano (DCM, 5x20 mL). Os extratos reunidos foram secos sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrados sob pressão reduzida. A amina [43] foi isolada por coluna cromatográfica de sílica-gel, tendo como eluente hexano e acetato de etila (1:2, R<sub>f</sub>= 0,4) e obtida como um óleo amarelo com rendimento de 100%.

### 5.3. Preparação da 5,8-dimetoxiisoquinolina [44]



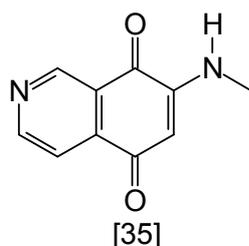
Colocou-se em um balão de fundo redondo (50 mL) a amina [43] (255 mg; 1,0 mmol) e adicionou-se ácido trifluoroacético (20 mL) sob agitação magnética, banho de gelo e atmosfera de nitrogênio. A solução foi aquecida a 50 °C por 2 horas. Após este intervalo de tempo, evaporou-se o ácido trifluoroacético em evaporador rotativo, adicionou-se DCM (5 mL) e carbonato de sódio sólido até pH ligeiramente básico. Em seguida, secou-se sobre MgSO<sub>4</sub> anidro e concentrou-se sob pressão reduzida. A isoquinolina [44] foi isolada por coluna cromatográfica de sílica-gel, tendo como eluente hexano e acetato de etila (3:1, R<sub>f</sub>= 0,4) e obtida como um óleo amarelo com rendimento de 68%.

#### 5.4. Preparação da isoquinolino-5,8-diona [45]



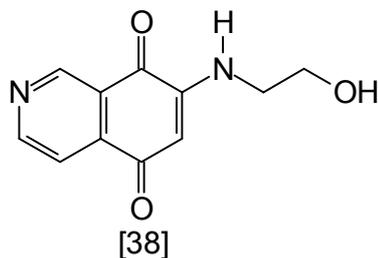
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (50 mL) isoquinolina [44] (100 mg; 0,53 mmol), acetonitrila (12 mL) e sob agitação magnética e banho de gelo (0 °C). Adicionou-se, então, nitrato de cério amoniacal (1161,76 mg; 2,12 mmol) dissolvido em água destilada (5 mL). A solução permaneceu sob agitação por 1 hora a 0 °C. Após este intervalo de tempo adicionou-se água destilada (40 mL) e extraiu-se com DCM (4x50 mL). Adicionou-se novamente água destilada (20 mL), separaram-se as fases e secou-se a fase orgânica sobre MgSO<sub>4</sub> anidro concentrando-a sob pressão reduzida. A isoquinolinodiona [45] foi isolada por coluna cromatográfica de sílica-gel, tendo como eluente hexano e acetato de etila (2:1, R<sub>f</sub>= 0,3) e obtida como um sólido amarelo (PF= 136-137 °C) em 65% de rendimento.

#### 5.5. Preparação da caulibugulona A [35]



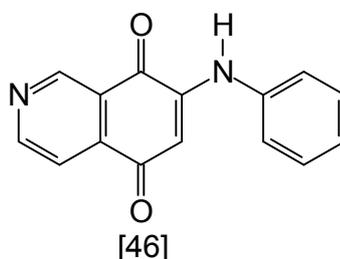
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona [45] (120 mg; 0,754 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se metilamina 40% (0,026 mL; 0,754 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e refluxo por 2 horas. Após este intervalo de tempo retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A caulibugulona A [35] foi isolada por placa preparativa tendo como eluente DCM e metanol (200:1, R<sub>f</sub>= 0,4) e obtida como um sólido vermelho (PF= 228-230 °C) em 45% de rendimento.

### 5.6. Preparação da caulibugulona D [38]



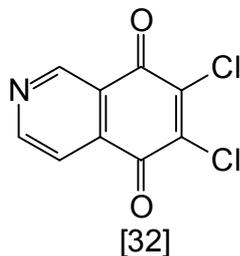
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona [45] (206,9 mg; 1,3 mmol), etanol 95% (15 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se etanolamina (79,3 mg; 1,3 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 2 horas. Após este intervalo de tempo retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A caulibugulona D [38] foi isolada por placa preparativa, tendo como eluente DCM e metanol (200:1, Rf= 0,3) e obtida como um sólido vermelho (PF= 228-230 °C) com rendimento de 20%.

### 5.7. Preparação da 7-(N-fenilamino)isoquinolino-5,8-diona [46]



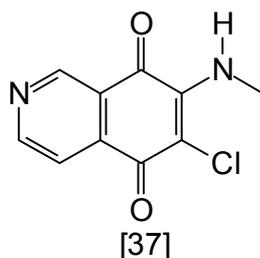
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona [45] (180 mg; 1,13 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se anilina (0,13 mL; 1,13 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 2 horas. Após este intervalo de tempo, retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A arilaminoisoquinolinodiona [46] foi isolada por placa preparativa tendo como eluente DCM e metanol (200:1, Rf= 0,4) e obtida como um sólido vermelho (PF= 316-318 °C) em 55% de rendimento.

### 5.8. Preparação da 6,7-dicloroisoquinolino-5,8-diona [32]



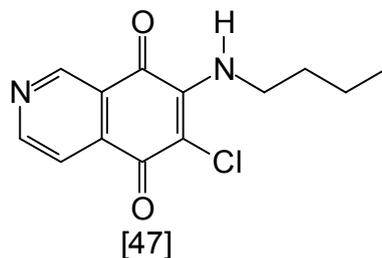
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) 5,8-dimetoxiisoquinolina [44] (300 mg; 1,6 mmol), ácido clorídrico concentrado (10 mL) e sob agitação magnética, à temperatura de 80-90 °C, adicionou-se, bem lentamente, ácido nítrico concentrado (1 mL). Em seguida, adicionou-se água destilada (200 mL), e extraiu-se com éter etílico (6x100 mL). Adicionou-se novamente água destilada (20 mL), secou-se a fase orgânica sobre MgSO<sub>4</sub> anidro e concentrou-se sob pressão reduzida. A isoquinolina diclorada [32] foi isolada por coluna cromatográfica de sílica-gel, tendo como eluente hexano e acetato de etila (1:1, R<sub>f</sub>= 0,6) e obtida como um sólido amarelo (PF= 179-181 °C) em 20% de rendimento.

### 5.9. Preparação da 6-cloro-7-(N-metilamino)isoquinolino-5,8-diona [37]



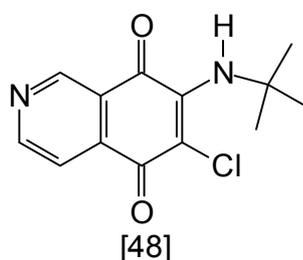
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] (110 mg; 0,48 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se metilamina 40% (0,016 mL; 0,48 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e refluxo por 1 hora. Após este intervalo de tempo retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A aminoisoquinolinodiona [37] foi isolada por placa preparativa, tendo como eluente DCM e metanol (200:1, R<sub>f</sub>= 0,3) e obtida como um sólido vermelho (PF= 219-220 °C) com rendimento de 65%.

### 5.10. Preparação da 6-cloro-7-(N-butilamino)isoquinolino-5,8-diona [47]



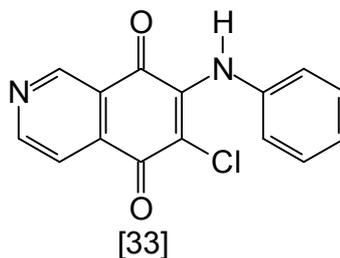
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] (60 mg; 0,26 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se butilamina (0,03 mL; 0,26 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e refluxo por 1 hora. Após este intervalo de tempo, retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A aminoisoquinolinodiona [47] foi isolada por placa preparativa, tendo como eluente DCM e metanol (200:1;  $R_f = 0,45$ ) e obtida como um sólido alaranjado (PF= 207-209 °C) em 75% de rendimento.

### 5.11. Preparação da 6-cloro-7-(N-terc-butilamino)isoquinolino-5,8-diona [48]



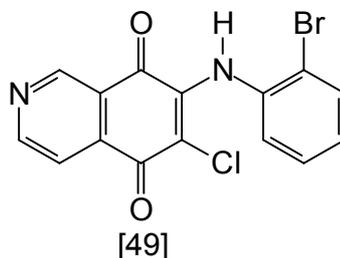
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] (60 mg; 0,26 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se t-butilamina (0,03 mL; 0,26 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e refluxo por 1 hora. Após este intervalo de tempo, retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A aminoisoquinolinodiona [48] foi isolada por placa preparativa tendo como eluente DCM e metanol (200:1;  $R_f = 0,45$ ) e obtida como um sólido alaranjado (PF= 189-191 °C) tendo como rendimento 60%.

### 5.12. Preparação da 6-cloro-7-(N-fenilamino)isoquinolino-5,8-diona [33]



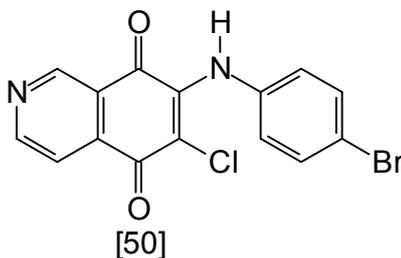
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolina-5,8-diona diclorada [32] (110 mg; 0,48 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se anilina (0,5 mL; 0,48 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 2 horas. Após este intervalo de tempo, retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A arilaminoisoquinolinodiona [33] foi isolada por placa preparativa, tendo como eluente DCM e metanol (200:1, Rf= 0,3) e obtida como um sólido vermelho (PF= 299-300 °C) com 75% de rendimento.

### 5.13. Preparação da 6-cloro-7-(N-2-bromofenilamino)isoquinolino-5,8-diona [49]



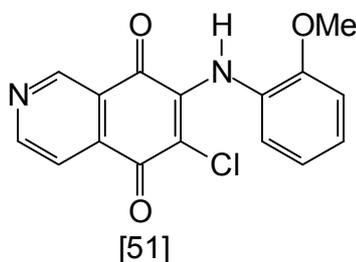
Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] (80 mg; 0,35 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se 2-bromoanilina (60,17 mg; 0,15 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 3 horas. Após este intervalo de tempo retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A arilaminoisoquinolinodiona [49] foi isolada por placa preparativa, tendo como eluente DCM e acetato de etila (3:1, Rf= 0,5) e obtida como um sólido vermelho (PF= 264-267 °C) com rendimento de 55%.

#### 5.14. Preparação da 6-cloro-7-(N-4-bromofenilamino)isoquinolino-5,8-diona [50]

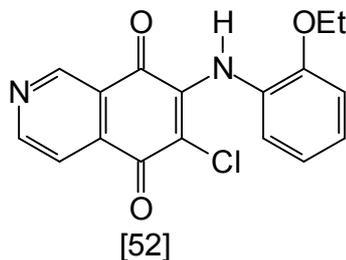


Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] (120 mg; 0,52 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se 4-bromoanilina (89,4 mg; 0,52 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 3 horas. Após este intervalo de tempo retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A arilaminoisoquinolinodiona [50] foi isolada por placa preparativa, tendo como eluente DCM e acetato de etila (2:1, R<sub>f</sub>= 0,6) e obtida como um sólido vermelho (PF= 300-301 °C) com rendimento de 60%.

#### 5.15. Preparação da 6-cloro-7-(N-2-metoxifenilamino)isoquinolino-5,8-diona [51]



Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] (70 mg; 0,30 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se 2-metoxianilina (36,9 mg; 0,30 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e refluxo 1 hora. Após este intervalo de tempo retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A arilaminoisoquinolinodiona [51] foi isolada por placa preparativa, tendo como eluente hexano e acetato de etila (3:1, R<sub>f</sub>= 0,5) e obtida como um sólido vermelho (PF= 311-312 °C) com rendimento de 68%.

**5.16. Preparação da 6-cloro-7-(N-2-etoxifenilamino)isoquinolino-5,8-diona [52]**

Colocaram-se em um balão de fundo redondo (25 mL) isoquinolino-5,8-diona diclorada [32] (85 mg; 0,37 mmol), etanol 95% (10 mL) e sob agitação magnética, adicionou-se 2-etoxianilina (0,4 mL; 0,37 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética e refluxo por 1 hora. Após este intervalo de tempo, retirou-se todo o metanol em evaporador rotativo. A arilaminoisoquinolinodiona [52] foi isolada por placa preparativa, tendo como eluente hexano e acetato de etila (4:1,  $R_f = 0,4$ ) e obtida como um sólido vermelho (PF= 395-397 °C) com rendimento de 73%.

## **CAPÍTULO 2**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE CAULIBUGULONAS E ANÁLOGOS**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Segundo Oliveira e colaboradores (2001), o câncer é uma doença que consiste num descontrole no crescimento celular, causada por mutações no DNA que bloqueiam as “instruções normais” que comandam a vida, resultando em crescimento celular desordenado. De qualquer modo, com divisões sucessivas, as células cancerígenas perdem cada vez mais o seu controle. O câncer progressivamente resulta em uma diferenciação do tumor devido um rápido crescimento, onde a malignidade das células é sinalizada por genes mutados, que ora perderam sua função, ora tiveram um ganho de função, acelerando assim, a replicação.

O câncer é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo: mais de 7 milhões de pessoas morrem da doença anualmente. Como a expectativa de vida tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer está em 11 milhões de casos novos, estimativa de 2002, alcançando quase 20 milhões em 2020 segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC) (BRASIL, 2007).

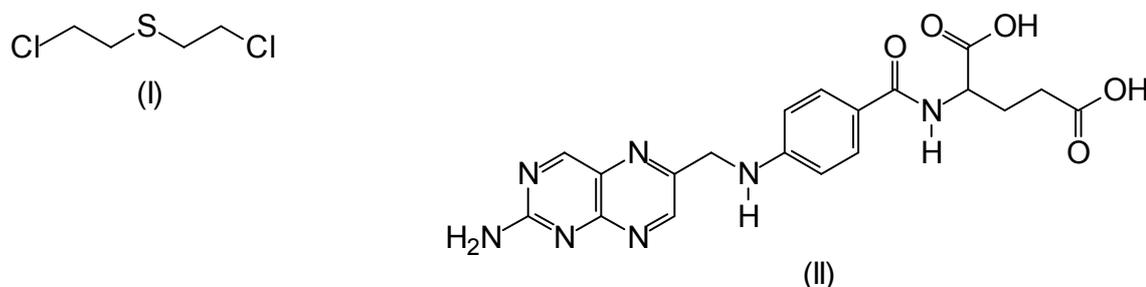
No importante setor de combate ao câncer, os produtos químicos constituem uma fonte permanente de trabalhos de pesquisa em razão do progresso alcançado pela química que constantemente está oferecendo novas substâncias para serem testadas. No entanto, poucos chegam a ser comercializados, pois mostram deficiência em uma ou outra propriedade que os caracterizam. A primeira delas em importância é a toxicidade, seguida da seletividade, do baixo custo e da formulação conveniente para a aplicação.

Para o estudo de compostos antitumorais a indução de apoptose é o tipo de morte celular mais apropriada, por não promover a liberação de moléculas intracelulares e mediadores pró-inflamatórios, evitando processos inflamatórios indesejáveis advindos da necrose. A premissa deste sucesso parte do princípio de que a grande maioria das células tumorais apresenta danos em seu DNA que as tornam mais sensíveis a agentes externos como a radioterapia e a quimioterapia. Na radioterapia um feixe de radiação ionizante é regulado para incidir sobre uma região pré-estabelecida em que se encontram as células cancerígenas. A quantidade de radiação a ser empregada depende do tipo tumoral e do tecido em que irá incidir, pois as células do organismo apresentam sensibilidades diferentes à radiação. O sucesso desta terapia é obtido quando todas as células tumorais são erradicadas (VERMEULEN *et alii*, 2003).

A radioterapia pode ser utilizada também como suporte à quimioterapia ou à cirurgia para remoção da massa tumoral. O princípio de ação da radioterapia parte de que as ondas eletromagnéticas com grande quantidade de energia aplicadas aos tecidos promovem a ionização de moléculas intracelulares como a água e as cadeias de DNA. Um importante efeito da radiação, de relevância clínica para a radioterapia, é a indução da morte celular por falência reprodutiva ou morte clonogênica, que se caracteriza pela perda da capacidade de divisão celular. Neste caso, a célula irradiada permanece morfolologicamente íntegra, por vez conseguindo até processar algumas divisões, mas perde a capacidade de dividir-se inúmeras vezes ao longo da vida. Considerando o ciclo celular, a fase de divisão celular ou mitose (M), é extremamente sensível à radiação, pois existe grande possibilidade de que os danos provocados pela radiação fiquem permanentemente no DNA, provocando aberrações cromossômicas e morte celular. Quando os danos sofridos pelo DNA são percebidos e o sistema de reparo não os consegue recuperar é deflagrado um sinal de morte celular que culmina na célula em apoptose pela ativação de caspases (ABE *et alii*, 1995).

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda (I), usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente observou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que

levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. A partir da publicação, em 1946, dos estudos clínicos feitos com o gás mostarda, e das observações sobre os efeitos do ácido fólico (II) em crianças com leucemias, verificou-se um avanço crescente no combate ao câncer (LEEN *et alii*, 2005 e MAKIN & HICKMAN, 2000).



**Figura 1** – Estruturas do gás mostarda (I) e do ácido fólico (II).

O conhecimento acerca do funcionamento das estruturas celulares abriu o leque de opções a serem exploradas para a busca de novas drogas antineoplásicas. Os agentes utilizados atualmente no tratamento do câncer afetam diretamente o DNA celular, promovendo danos tanto às células normais como às neoplásicas. Porém eles acarretam maior dano às células malignas do que às dos tecidos normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares e ao ciclo de divisões celulares. Por este motivo a quimioterapia obtém sucesso no tratamento do câncer. A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo nesse mecanismo celular, e a melhor compreensão do ciclo celular normal levou à definição clara dos mecanismos de ação da maioria das drogas (LEEN *et alii*, 2005 e MAKIN & HICKMAN, 2000).

Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos e outros. Novas drogas estão sendo permanentemente isoladas e aplicadas experimentalmente em modelos animais antes de serem usadas no homem (BRUCE & LIN, 1969).

Os compostos alquilantes são compostos capazes de substituir em outra molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Eles se ligam ao DNA de modo a impedir a

separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice espiralar, fenômeno este indispensável para a replicação. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico. Apesar de efetivos como agentes isolados para inúmeras formas de câncer, eles raramente produzem efeito clínico ótimo sem a combinação com outros agentes fase-específicos do ciclo celular (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

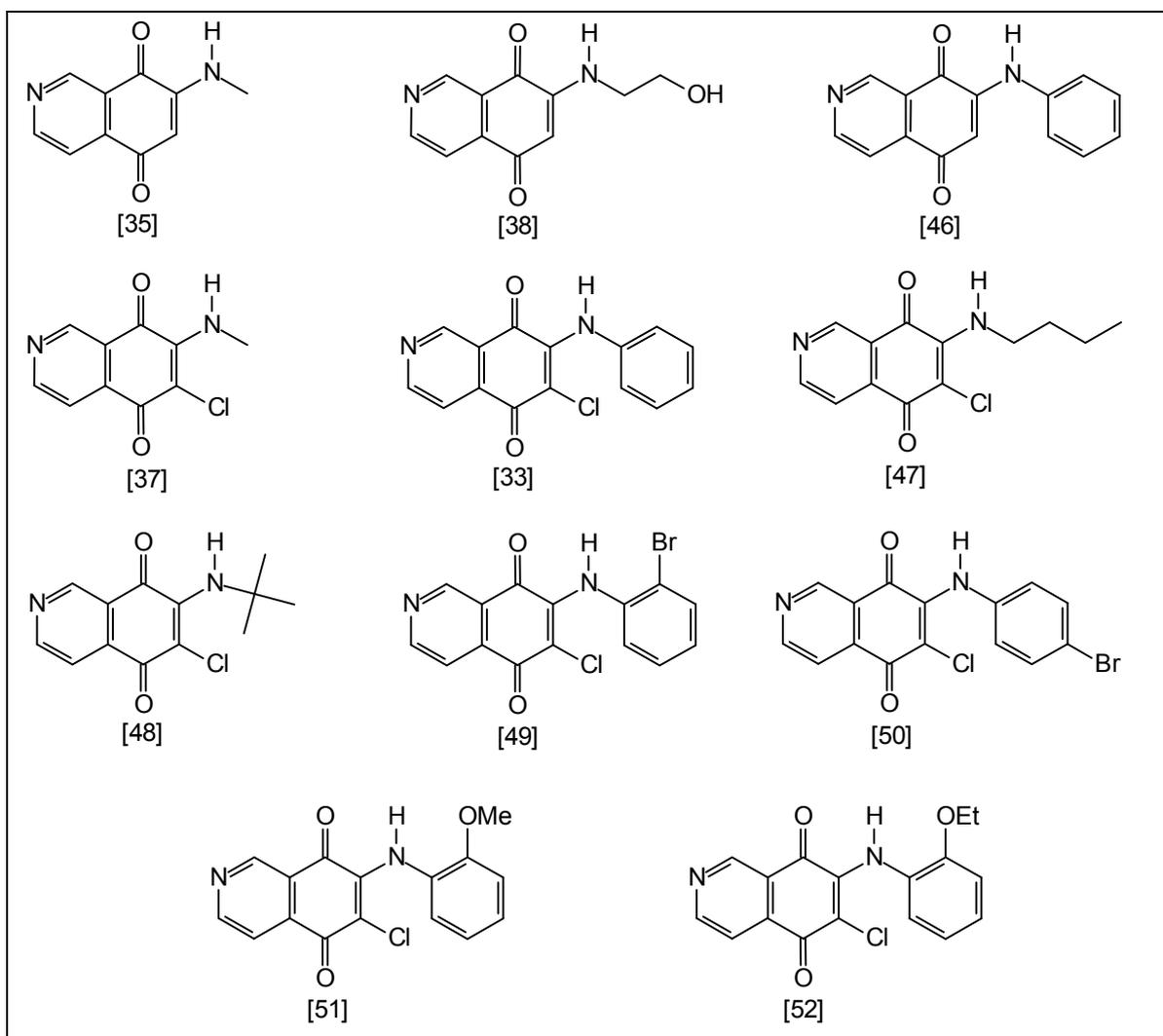
Segundo Oliveira e Alves (2002), os antimetabólitos afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA. Deste modo, impedem a multiplicação e função normais da célula. Esta inibição da biossíntese pode ser dirigida às purinas e a outras etapas da síntese de ácidos nucleicos. Estas drogas são particularmente ativas contra células que se encontram na fase de síntese do ciclo celular (fase S). A duração da vida das células tumorais suscetíveis determina a média de destruição destas células, as quais são impedidas de entrar em mitose pela ação dos agentes metabólicos que atuam na fase S.

Os antibióticos antitumorais são um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o DNA e inibam a síntese deste ácido ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular. Apesar de apresentarem tal variação possuem em comum anéis insaturados e podem apresentar outro grupo funcional que lhes acrescentam novos mecanismos de ação, como alquilação, inibição enzimática ou inibição da função do DNA por intercalação. Como todos os quimioterápicos, os antibióticos atuam tanto sobre as células normais como sobre as malignas. Por isso, também apresentam efeitos colaterais indesejáveis (BRUCE & LIN, 1969).

Na busca para minimizar os danos provocados ao material genético e os efeitos colaterais que os fármacos antineoplásicos de rotina promovem, diversas linhas de pesquisas baseadas, principalmente nas vias de apoptose, buscam em moléculas indutoras de tal morte celular protótipos que possam ser aprimorados para o uso em rotina de tratamento contra o câncer (MARSIK *et alii*, 2005).

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez escolhida a melhor formulação para ser utilizada nos ensaios, as caulibugulonas e análogos (**Figura 2**), sintetizadas no capítulo 1, após pesagem, foram diluídos em 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido e, então, iniciada a avaliação da atividade anticancerígena.



**Figura 2** – Isoquinolino-5,8-dionas utilizadas na avaliação da atividade anticancerígena.

## **2.1. Ensaio de Viabilidade Celular, Morte Celular por Necrose e Morte Celular por Apoptose.**

Segundo Anazetti e Melo (2007), o termo apoptose descreve um processo ativo de colapso celular que difere morfologicamente da morte por necrose. É um tipo de morte celular que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual. A morte celular por apoptose é um fenômeno complexo caracterizado por alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas, sendo que a morte e proliferação celular estão intimamente conectadas. A necrose é caracterizada pela perda de integridade de membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas.

A morte celular programada participa de vários processos fisiológicos vitais, como o desenvolvimento embrionário, a involução da glândula mamária após o período de amamentação, o controle da proliferação de tumores e a regulação de populações celulares do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pelo desencadeamento do processo apoptótico podem ocasionar diversas patologias. Por ser indispensável à vida, a morte das células deve seguir um programa meticuloso. Qualquer distúrbio em sua regulação, ou seja, tanto o excesso quanto à deficiência, podem provocar uma variedade de doenças (ANAZETTI & MELO, 2007).

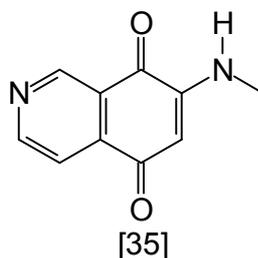
Segundo Freitas (2009), as taxas de viabilidade celular podem ser medidas através da atividade enzimática da redutase mitocondrial. Neste ensaio, o corante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico - MTT (de coloração amarela) é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Os cristais são solubilizados com uma solução de isopropanol com ácido

clorídrico e então a solução colorida (púrpura) é quantificada por espectrofotometria óptica (570 nm).

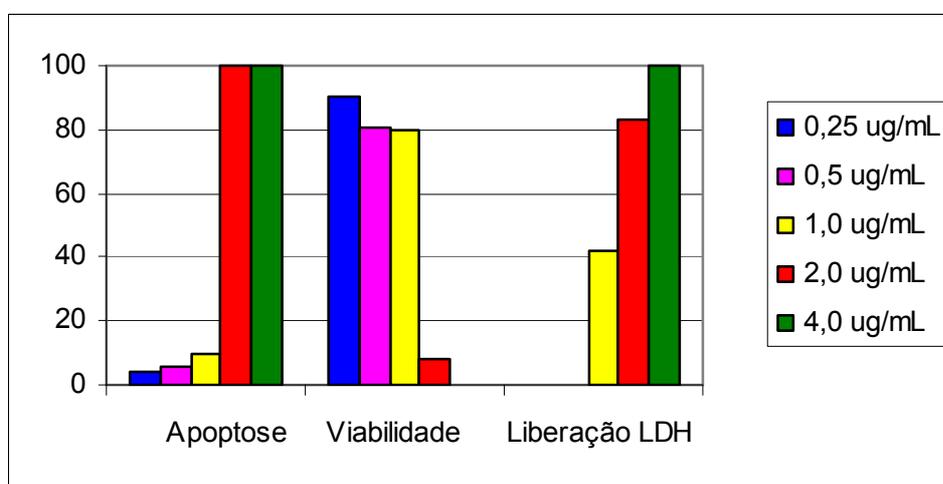
O ensaio do LDH é baseado na liberação da Lactato Dehidrogenase, uma enzima citosólica, de células que tiveram a integridade da membrana plasmática rompida. O ensaio consiste em retirar o sobrenadante das células e medir a atividade da enzima liberada oferecendo seu substrato. Nas condições do ensaio, a LDH catalisa a conversão do piruvato para lactato, enquanto o NADH é oxidado para  $\text{NAD}^+$ . A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, medido em 340 nm. Determina-se o decréscimo da absorbância em 340 nm, que é proporcional à atividade de LDH na amostra analisada.

Os resultados das mortes por apoptose, da viabilidade celular, e das mortes por necrose (liberação de LDH) causadas pelas caulibugulonas e análogos (**Figura 2**), estão apresentados e discutidos a seguir.

### 2.1.1. Isoquinolino-5,8-diona [35] (Caulibugulona A)



Ensaio sobre as células cancerígenas U937 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



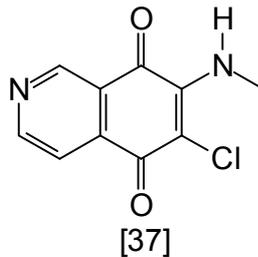
**Figura 3** - Efeitos citotóxicos da caulibugulona A [35], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Analisando no primeiro ensaio (**Figura 3**) os resultados da aplicação da caulibugulona A [35] sobre a viabilidade das células U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas, verifica-se um pequeno efeito apoptótico nas concentrações  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e grande viabilidade nestas concentrações. Na concentração de  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a viabilidade comparada com o controle foi muito baixa, e na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  não foi possível detectar células vivas no intervalo de 48 horas, não sendo evidenciada a redução de MTT e formação de cristais de coloração púrpura.

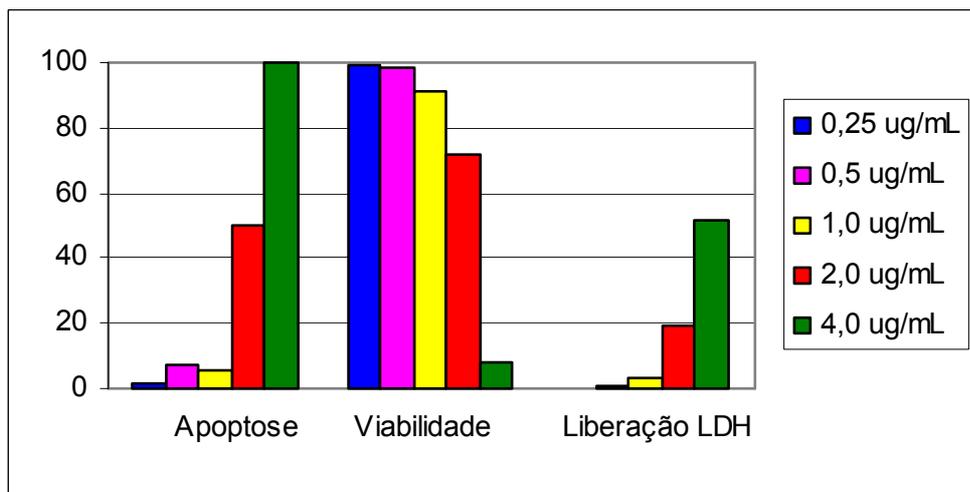
Os ensaios de liberação de LDH demonstraram que nas culturas submetidas à maior concentração da caulibugulona A [35],  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , todas as células estavam rompidas, com total liberação de LDH.

Os experimentos conduzidos na microscopia de fluorescência demonstraram que todas as células submetidas às duas maiores concentrações do tratamento,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , num período de 48 horas, estavam em necrose secundária, o que justifica a taxa de necrose de 100%, com a total liberação de LDH e a reduzida viabilidade apresentada pelos ensaios.

### 2.1.2. Isoquinolino-5,8-diona [37] (Caulibugulona C)



Ensaio sobre as células cancerígenas U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

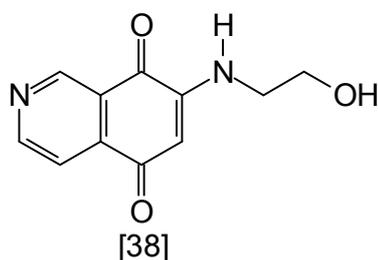


**Figura 4** - Efeitos citotóxicos da caulibugulona C [37], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

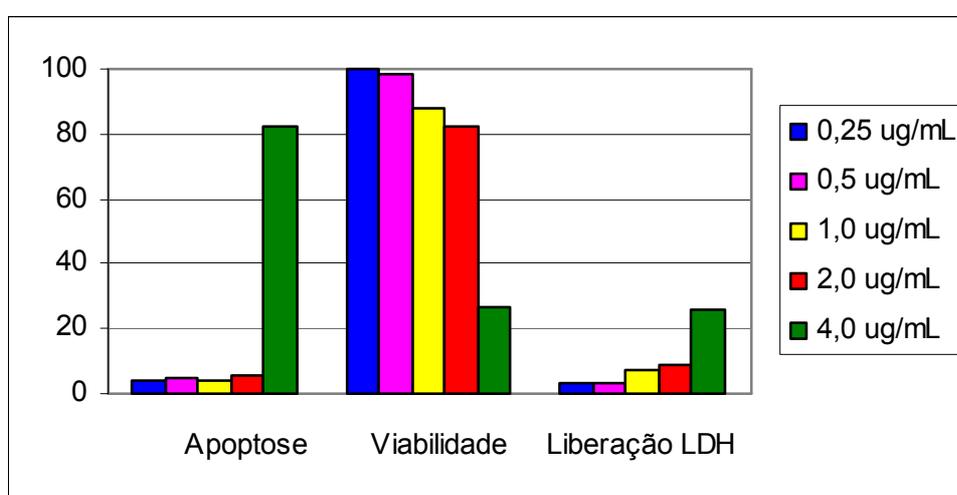
Analisando no segundo ensaio (**Figura 4**) os resultados da aplicação da caulibugulona [37] sobre a viabilidade das células U937 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas, verifica-se uma considerável atividade sobre as células U937 nos ensaios realizados. Nos ensaios de viabilidade, houve uma redução drástica na quantidade de células vivas na maior concentração testada ( $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Quando foi quantificada a liberação de LDH para o meio de cultura, obteve-se um efeito concentração-dependente, sendo que na maior concentração, a taxa de liberação superou os 50%.

Na microscopia de fluorescência, a taxa de apoptose foi pronunciada a partir da concentração de  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (50%) e foi de 100% na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Estes dados indicam que parte das células na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  já estava em necrose secundária o que levou à liberação de LDH no tempo de 48 horas de experimentação, como pode ser verificado na **Figura 4**.

### 2.1.3. Isoquinolino-5,8-diona [38] (Caulibugulona D)



Ensaio sobre as células cancerígenas U937 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



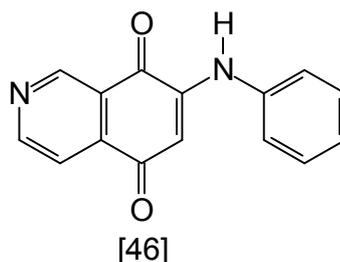
**Figura 5** - Efeitos citotóxicos da caulibugulona D [38], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Analisando no terceiro ensaio (**Figura 5**) os resultados da aplicação da caulibugulona D [38] sobre a viabilidade das células U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas verifica-se que nos testes feitos de viabilidade na concentração de  $4,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ , houve uma redução de quase 75% na quantidade de células vivas.

Quanto à avaliação da liberação de LDH, na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a liberação foi de 25%, indicando que nem todas as células mortas haviam entrado em necrose e conseqüentemente, liberado LDH no meio de cultura. Estes dados foram confirmados pela microscopia de fluorescência, onde mais de 80% das células estavam em

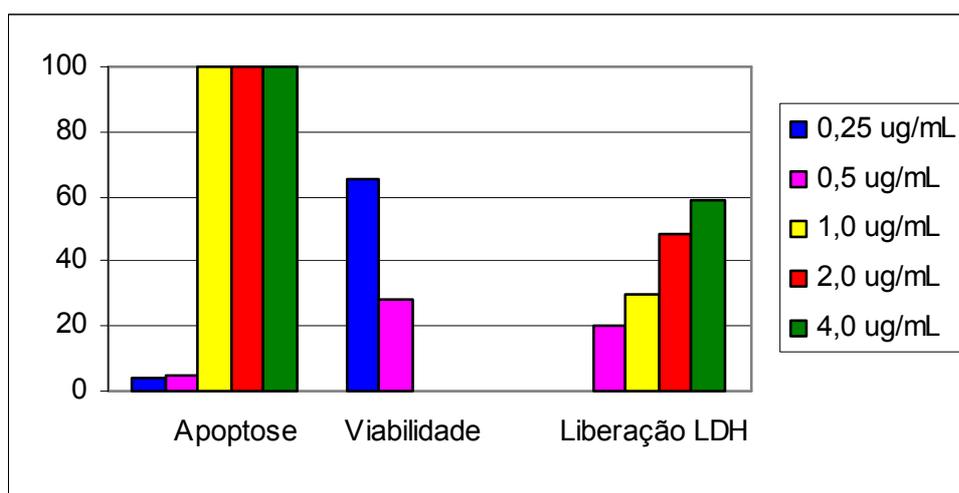
apoptose, e algumas já em necrose secundária e, portanto, liberaram LDH no meio. Não foram visualizadas necroses primárias, sendo a apoptose a única forma de indução de morte.

#### 2.1.4. Isoquinolino-5,8-diona [46]



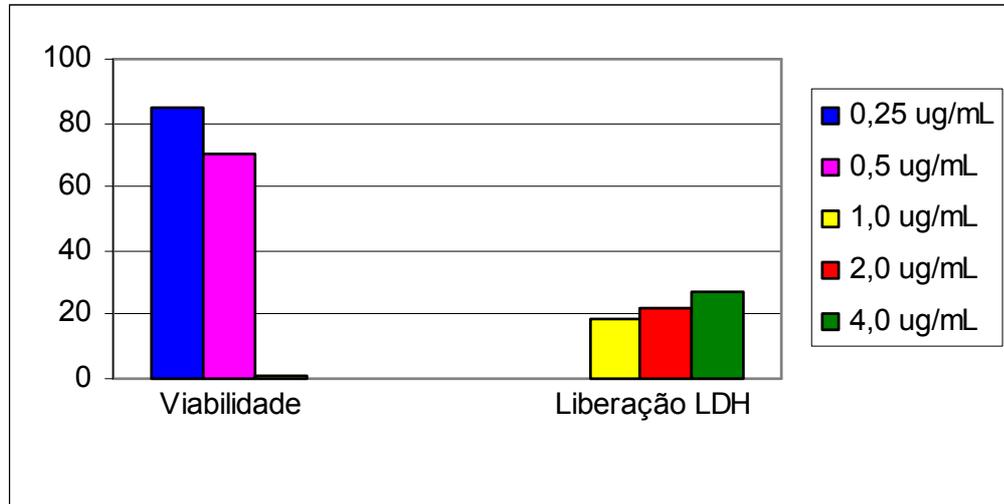
As substâncias análogas às caulibugulonas foram testadas frente às células U937, MOLT4, COLO205 e H460 para os ensaios de viabilidade, liberação de LDH e microscopia de fluorescência.

**Ensaio sobre as células cancerígenas U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .**



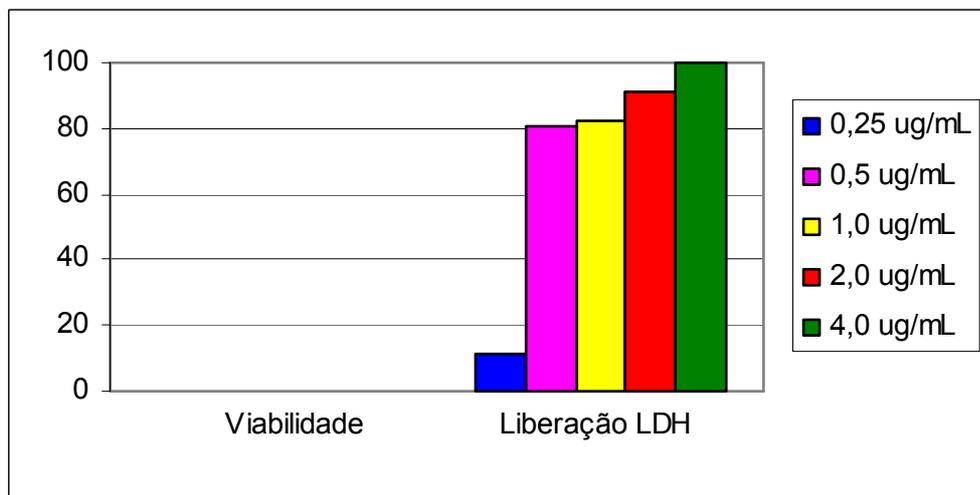
**Figura 6** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [46], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas COLO205, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



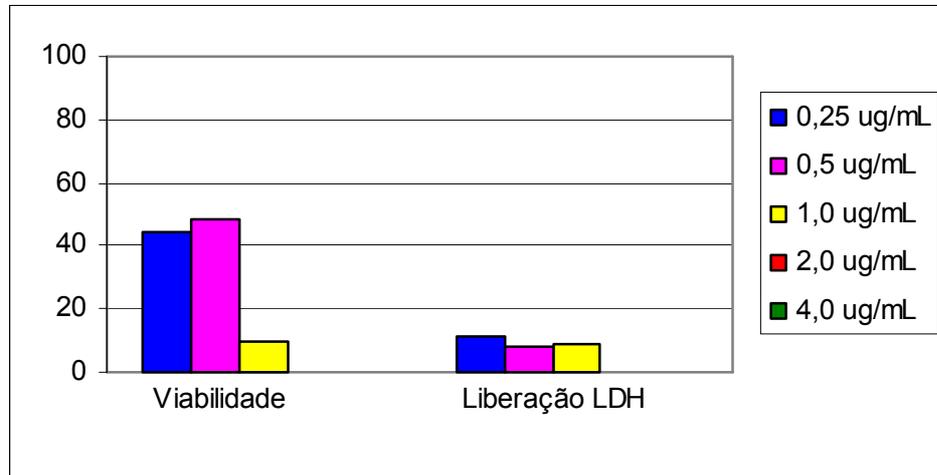
**Figura 7** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [46], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas MOLT4, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 8** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [46], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação.

**Ensaio sobre as células cancerígenas H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .**



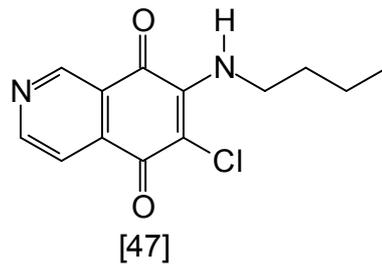
**Figura 9** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [46], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação.

Analisando nas **Figuras 6, 7, 8 e 9** os resultados da aplicação da isoquinolino-5,8-diona [46] sobre a viabilidade das células U937, COLO205, MOLT4 e H460 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas, verifica-se que a isoquinolino-5,8-diona [46] foi a mais ativa dentre todas as testadas. As culturas de U937 apresentaram todas as células mortas nas concentrações de  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Quando foi analisada a liberação de LDH, o gráfico concentração-dependente obtido indicou que quanto maior a concentração, mais rápido é a indução de apoptose e consequentemente, mais células apresentam-se rompidas com 48 horas de experimento.

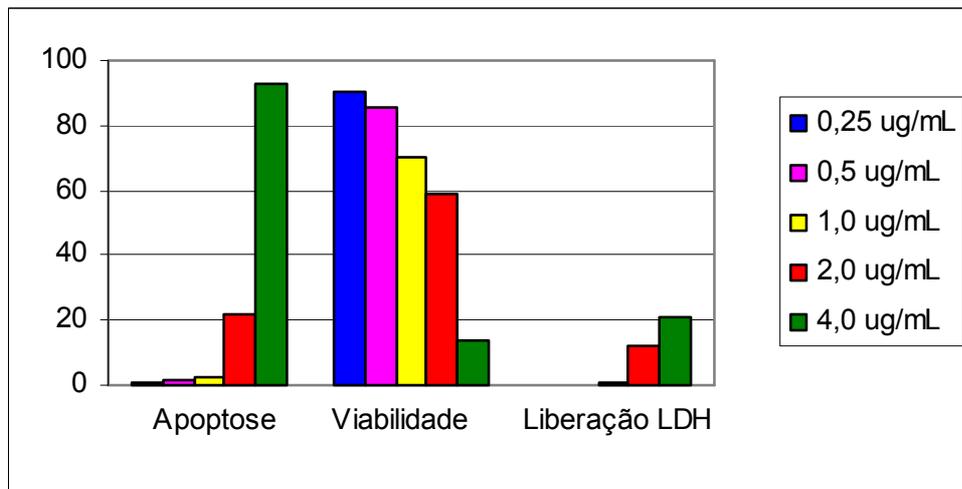
Este resultado foi confirmado na microscopia de fluorescência, onde 100% das células em apoptose foram encontradas nas culturas com concentrações iguais e (ou) superiores a  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As células MOLT4 não resistiram sequer à menor concentração testada ( $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), com ausência de células vivas e uma liberação de LDH expressivamente alta. As células epitelióides também foram sensíveis aos tratamentos. As células H460 apresentaram viabilidade inferior a 50% do controle mesmo na concentração de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , mas todas as células estavam mortas apenas

nas concentrações iguais e superiores a  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Já as culturas de COLO205 apesar de exibirem ausência de células vivas já na concentração de  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , na concentração de  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  aproximadamente 70% das células estavam vivas com 48 horas de experimento.

### 2.1.5. Isoquinolino-5,8-diona [47]

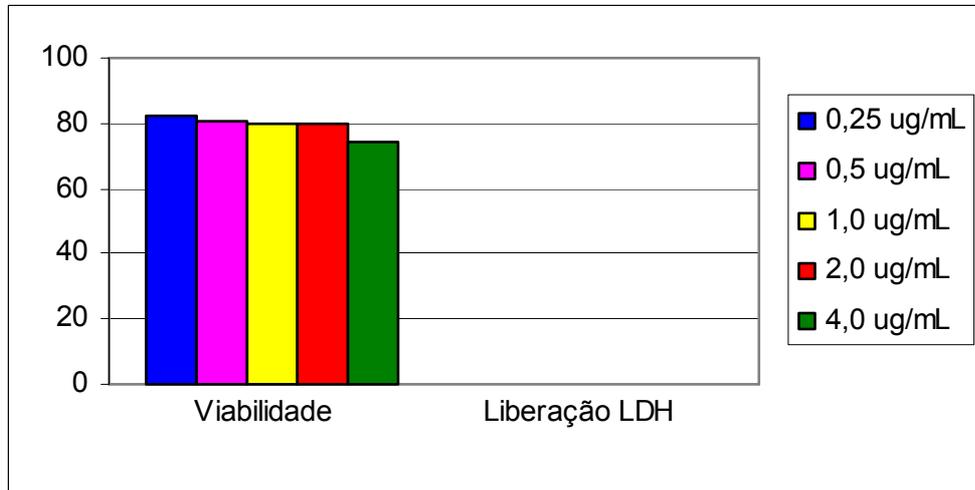


Ensaio sobre as células cancerígenas U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



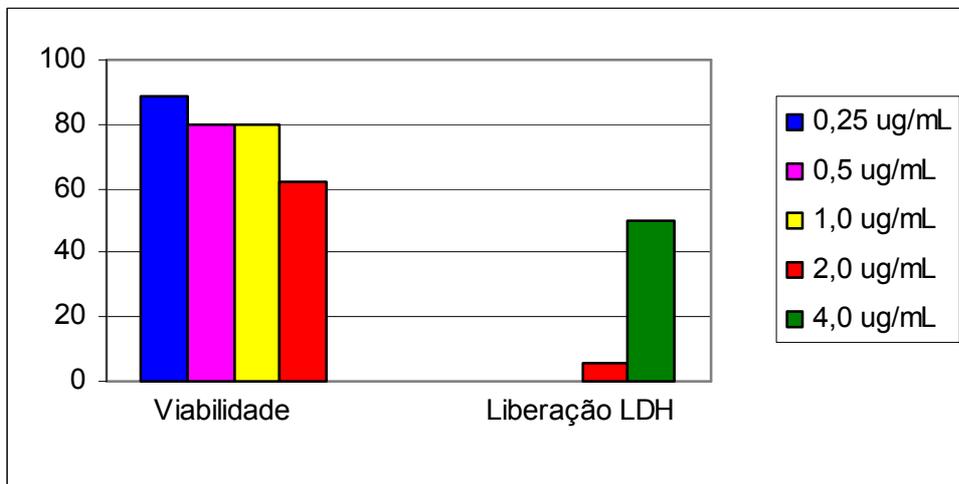
**Figura 10** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [47], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas COLO205, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



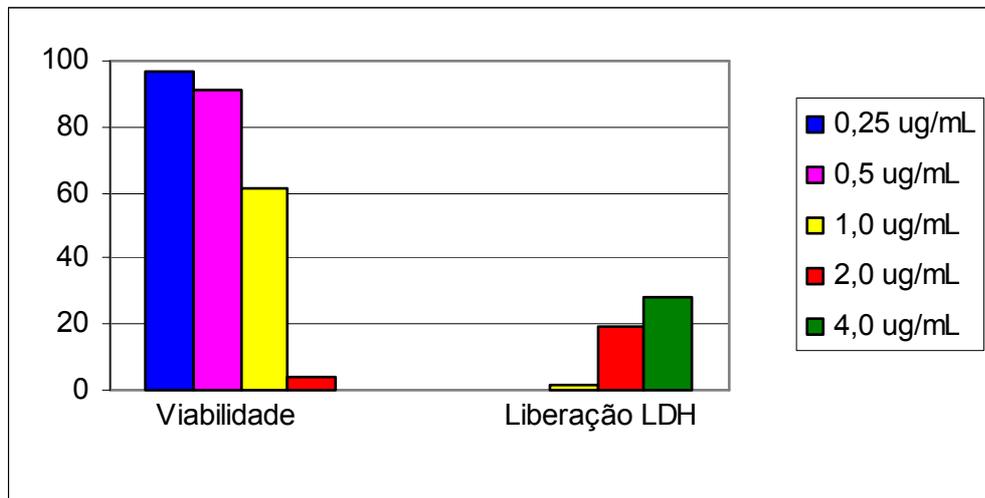
**Figura 11** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [47], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas MOLT4, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 12** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [47], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação.

**Ensaio sobre as células cancerígenas H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .**



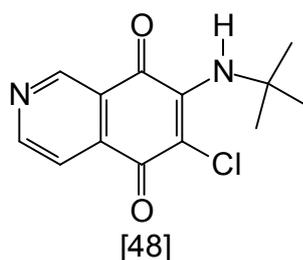
**Figura 13** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [47], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação.

Analisando nas **Figuras 10, 11, 12 e 13** os resultados da aplicação da isoquinolino-5,8-diona [47] sobre a viabilidade das células U937, COLO205, MOLT4 e H460 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas, verifica-se que a isoquinolino-5,8-diona [47] apresentou elevada atividade no tratamento das células U937, H460 e MOLT4. Quanto à viabilidade, obteve-se uma boa relação concentração-dependente para as células U937. Percebeu-se que quanto maior a concentração do composto, menor a viabilidade das culturas.

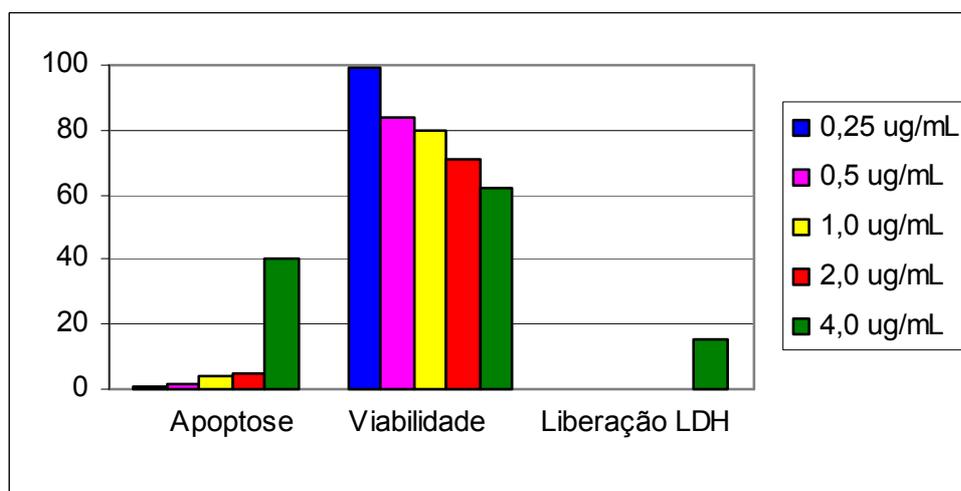
A liberação de LDH foi discreta, mesmo que na microscopia de fluorescência mostrando que na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mais de 90% das células estavam em apoptose, menos de 30% das células estavam liberando LDH, ou seja, não haviam entrado em necrose secundária. As células da linhagem MOLT4 não resistiram ao tratamento com  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do composto, estando todas mortas nesta concentração. A liberação de LDH também foi alta, alcançando os 50%. As células epitelióides H460 também não resistiram a concentrações superiores a  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , apesar da taxa de liberação de

LDH ser discreta. No entanto, as culturas de COLO205 foram resistentes a todas as concentrações da substância [47], apresentando uma redução na viabilidade. Porém, sem nenhum sinal de liberação de LDH que pudesse indicar morte celular, fazendo-se suspeitar de um efeito citostático (**Figura 11**).

### 2.1.6. Isoquinolino-5,8-diona [48]



Ensaio sobre as células cancerígenas U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 14** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [48], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas COLO205, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

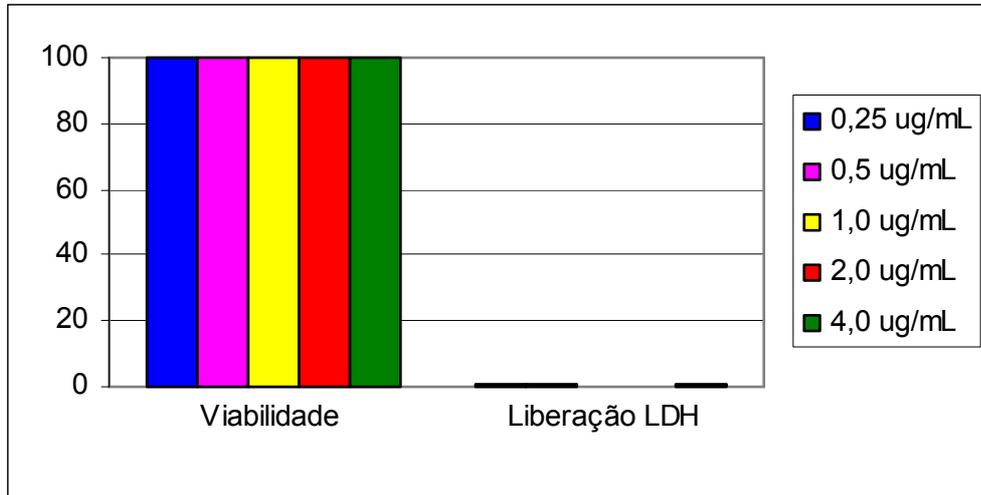


Figura 15 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [48], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas MOLT4, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

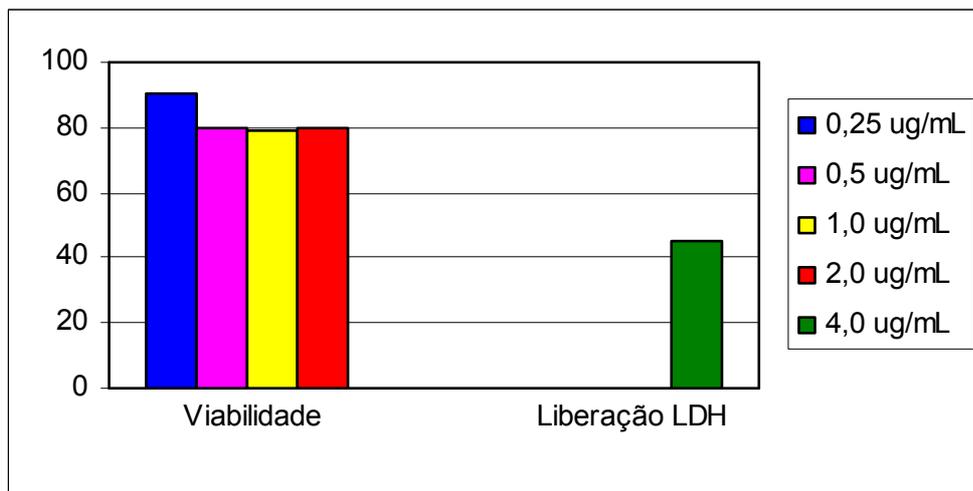
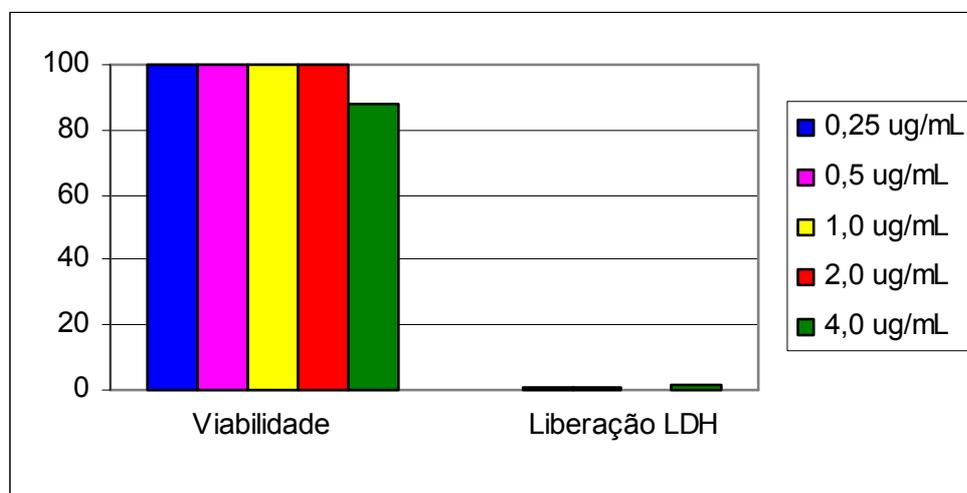


Figura 16 - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [48], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação.

**Ensaio sobre as células cancerígenas H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .**



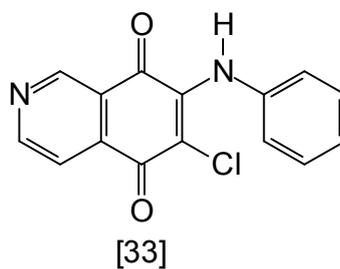
**Figura 17** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [48], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação.

Analisando nas **Figuras 14, 15, 16 e 17** os resultados da aplicação da isoquinolino-5,8-diona [48] sobre a viabilidade das células U937, COLO205, MOLT4 e H460 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas, verifica-se que a isoquinolino-5,8-diona [48] apresentou um reduzido efeito indutor de morte celular sobre as células da linhagem U937, forma mais resistente que as MOLT4.

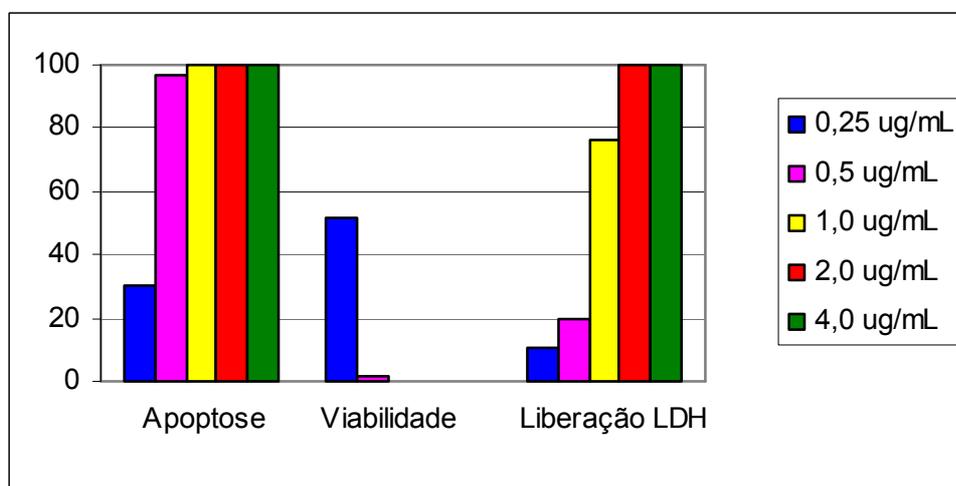
Na maior concentração testada ( $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), foi observada uma redução da viabilidade de mais de 30% nas culturas de U937. Nas culturas da linhagem MOLT4 apresentou uma redução da viabilidade acima de 80%. A microscopia de fluorescência para as culturas de U937, demonstrou apenas na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  uma taxa significativa de apoptose (40%).

A liberação de LDH foi alta apenas nas culturas de MOLT4 e na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo obtida uma liberação de LDH maior que 40%. As células das linhagens epitelíóides H460 e COLO205 foram resistentes aos tratamentos com a substância [48], conforme apresentam as **Figuras 15 e 17**.

### 2.1.7. Isoquinolino-5,8-diona [33]

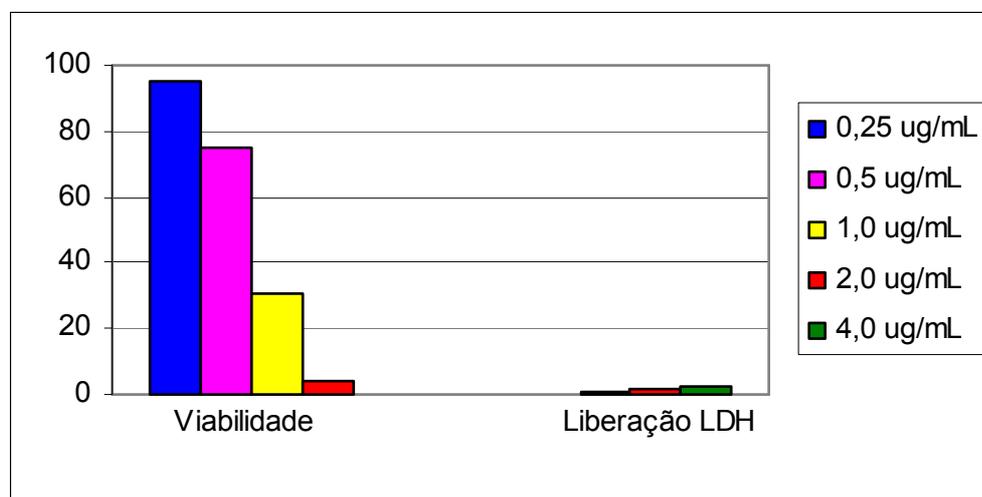


Ensaio sobre as células cancerígenas U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



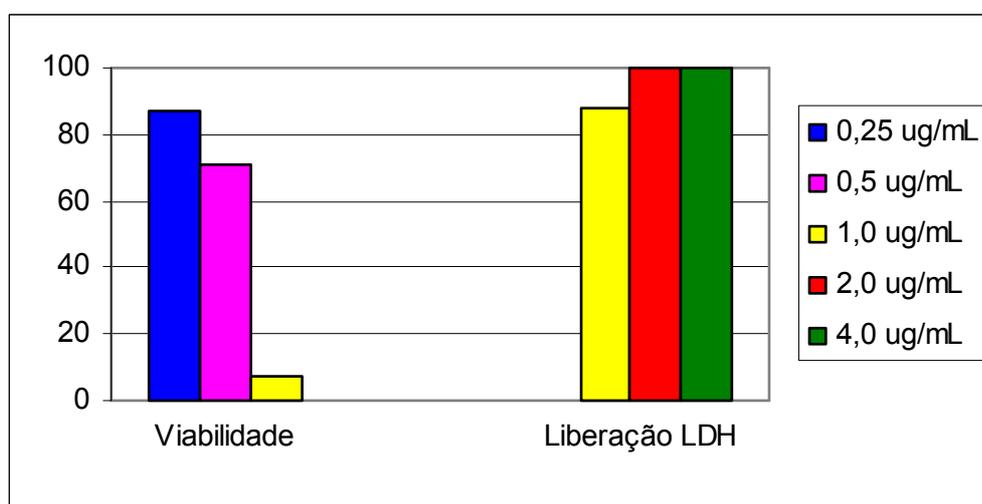
**Figura 18** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [33], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas COLO205, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



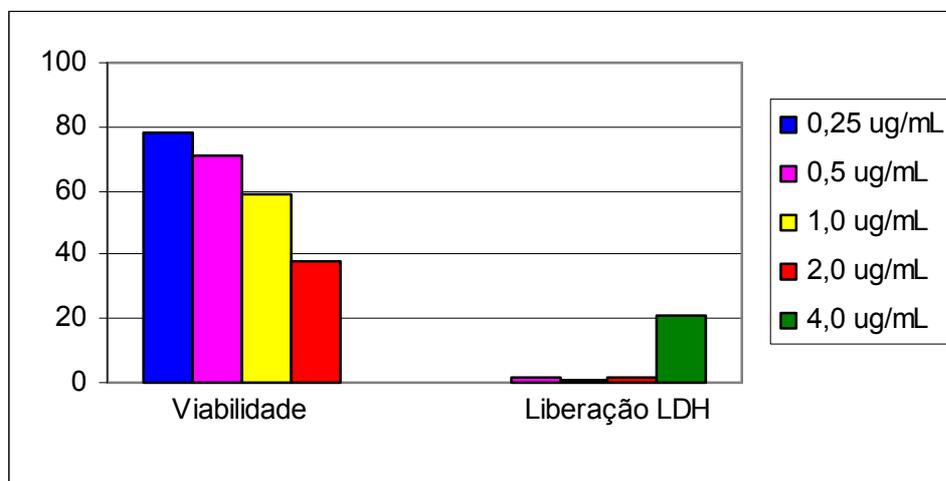
**Figura 19** - Efeitos citotóxicos da isoquinolono-5,8-diona [33], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas MOLT4, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 20** - Efeitos citotóxicos da isoquinolono-5,8-diona [33], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação.

**Ensaio sobre as células cancerígenas H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .**

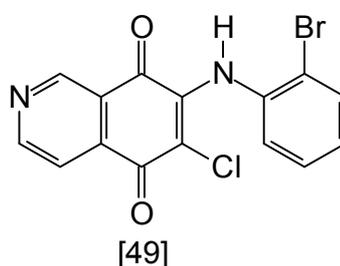


**Figura 21** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [33], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação.

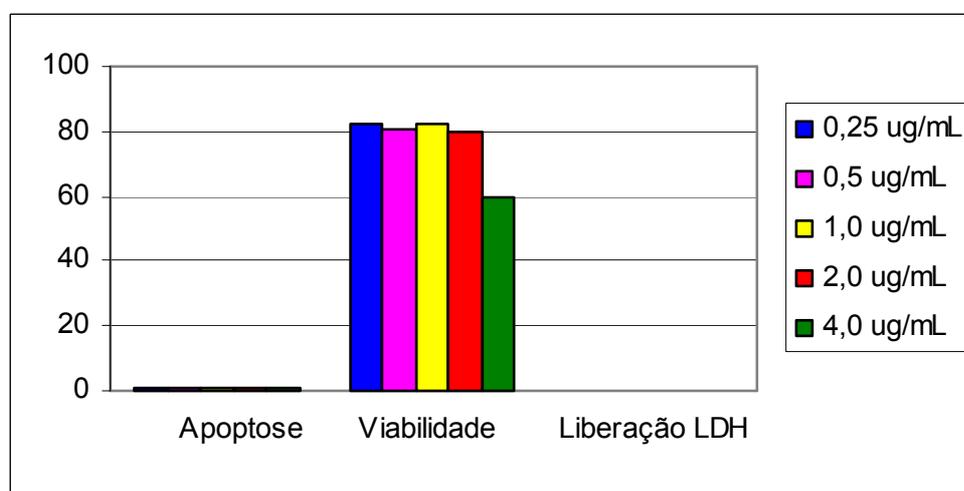
Analisando nas **Figuras 18, 19, 20 e 21** os resultados da aplicação da isoquinolino-5,8-diona [33] sobre a viabilidade das células U937, COLO205, MOLT4 e H460 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas, verifica-se que a isoquinolino-5,8-diona [33] foi a segunda mais ativa sendo capaz de promover a morte de todas as células da linhagem U937 em concentrações acima de  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo que todas as células estavam liberando LDH a partir da concentração de  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Estas células estavam em necrose secundária, resultados estes obtidos pela microscopia de fluorescência, em que mais de 90% das células já estavam em apoptose nas concentrações acima de  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os testes feitos com as demais linhagens celulares demonstraram que a linhagem H460 foi a mais resistente, pois havia aproximadamente 40% de células viáveis na concentração de  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e uma pequena liberação de LDH na máxima concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os dados de LDH e viabilidade indicam que as células tratadas com  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do composto [33] após 48 horas estavam mortas, porém apenas 20% tinham sofrido lise e liberado LDH para o meio.

As células da linhagem COLO205 também foram resistentes ao tratamento com a substância [33], sendo que na concentração de  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  menos de 5% das células estavam vivas. A insignificante liberação de LDH indica que as células morreram, porém foram resistentes à lise, liberando pouco LDH no meio. Já as células MOLT4 foram resistentes nas concentrações inferiores a  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , porém, morreram em massa e com intensa taxa de liberação de LDH a partir da concentração de  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 2.1.8. Isoquinolino-5,8-diona [49]

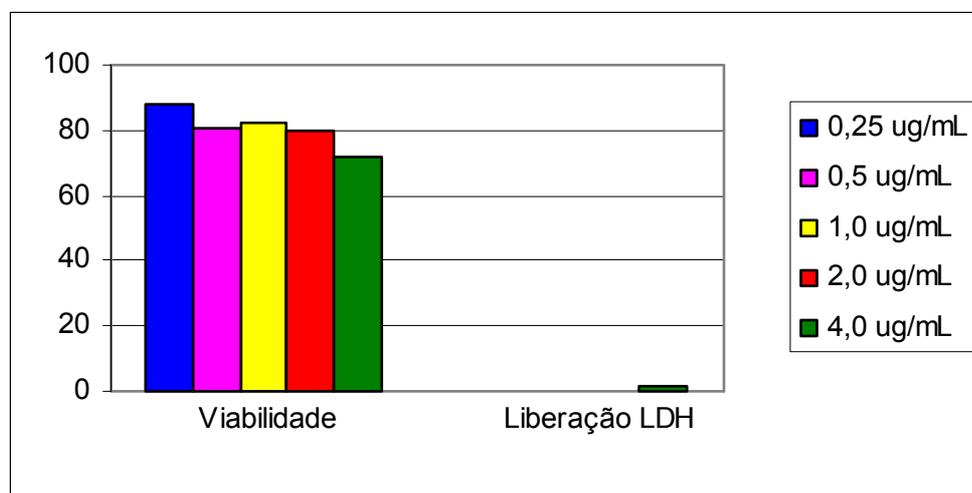


Ensaio sobre as células cancerígenas U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



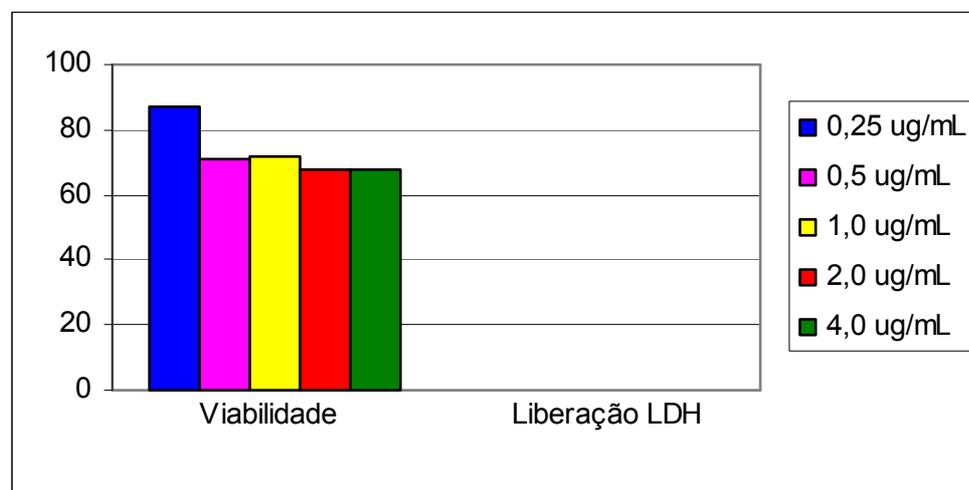
**Figura 22** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [49], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas COLO205, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



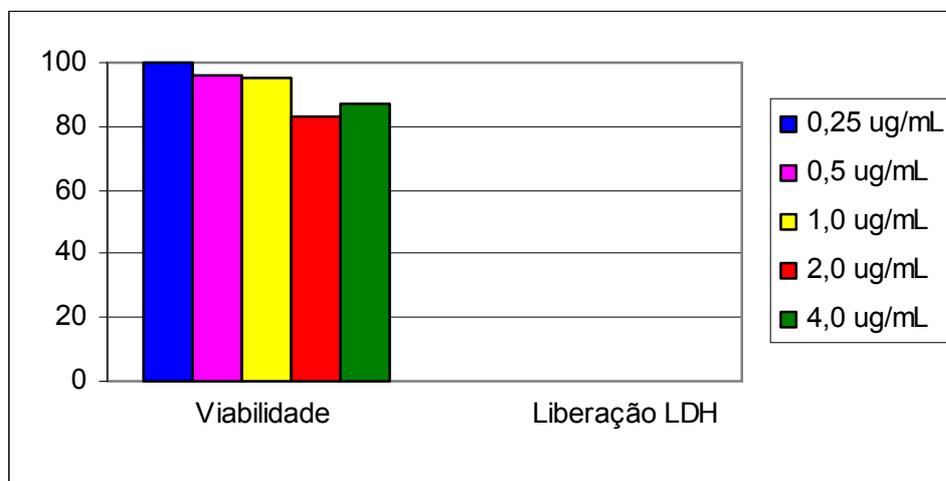
**Figura 23** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [49], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas MOLT4, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 24** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [49], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação.

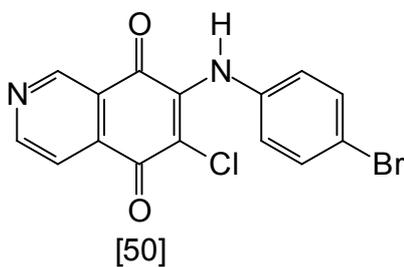
**Ensaio sobre as células cancerígenas H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .**



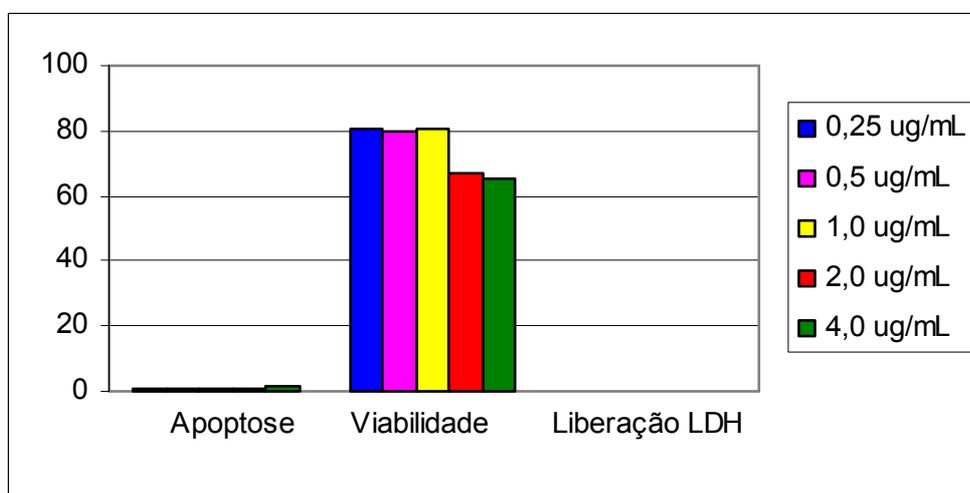
**Figura 25** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [49], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação.

Analisando nas **Figuras 22, 23, 24 e 25** os resultados da aplicação da isoquinolino-5,8-diona [49] sobre a viabilidade das células U937, COLO205, MOLT4 e H460 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas, verifica-se que a isoquinolino-5,8-diona [49] não causou morte às células testadas. Porém observou-se uma redução considerável na viabilidade das culturas U937, MOLT4, COLO205 e H460, sugerindo efeito citostático. A ausência de apoptose na microscopia de fluorescência e baixíssimos níveis de liberação de LDH indicam que não ocorreu morte das células, mas apenas uma redução na proliferação, quando comparado com a viabilidade obtida para as culturas controles.

### 2.1.9. Isoquinolino-5,8-diona [50]

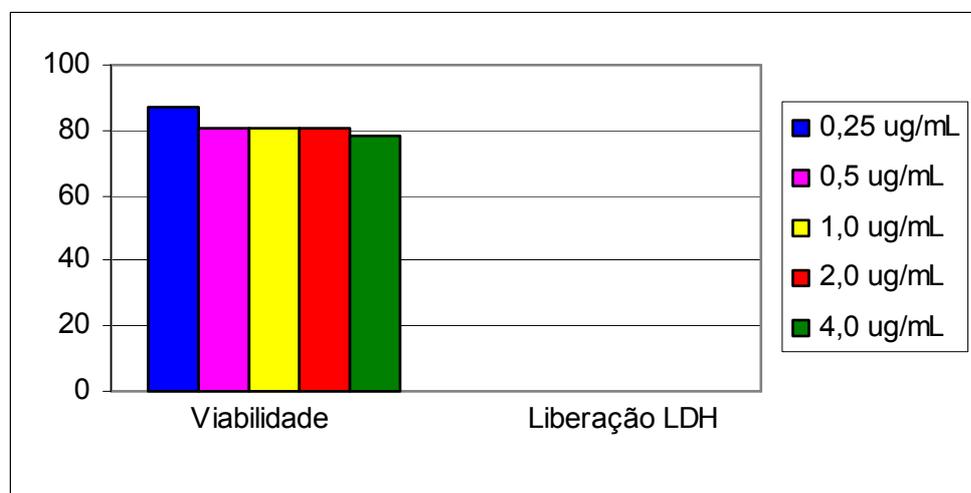


Ensaio sobre as células cancerígenas U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



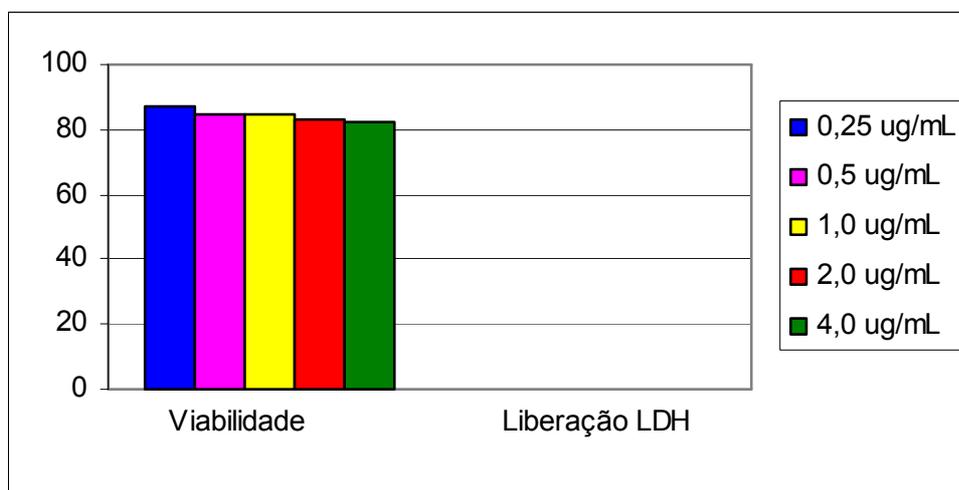
**Figura 26** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [50], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas COLO205, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



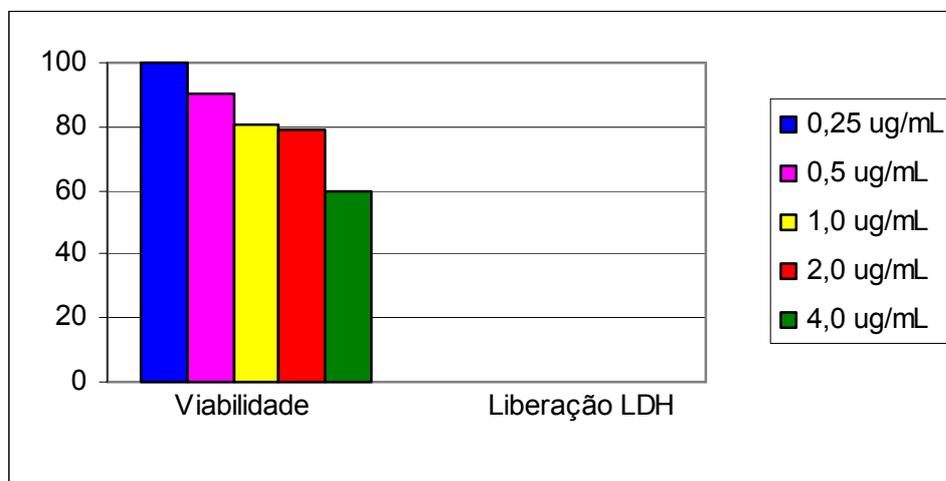
**Figura 27** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [50], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas MOLT4, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 28** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [50], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

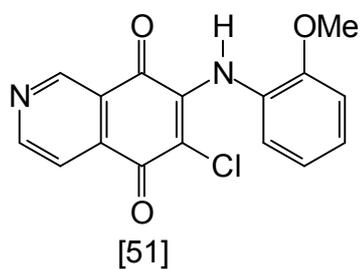


**Figura 29** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [50], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação.

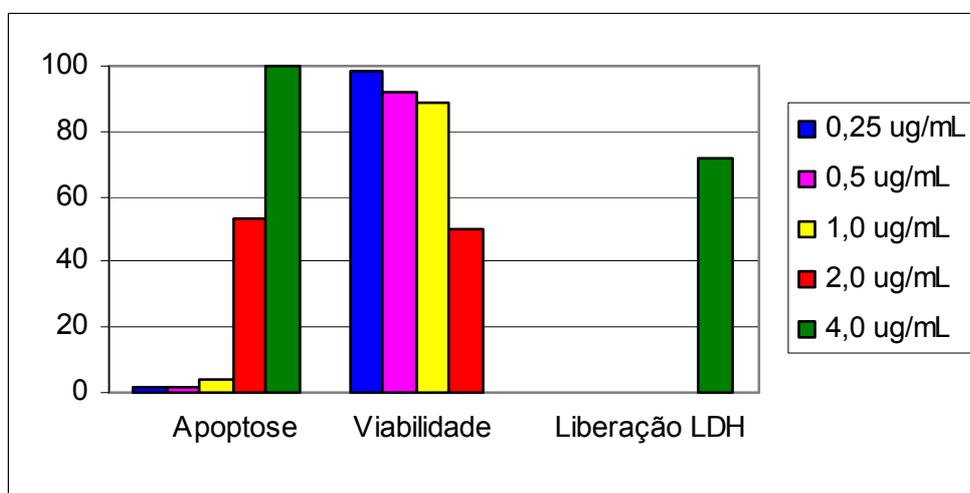
Analisando nas **Figuras 26, 27, 28 e 29** os resultados da aplicação da isoquinolino-5,8-diona [50] sobre a viabilidade das células U937, COLO205, MOLT4 e H460 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após um período de 48 horas, verifica-se que a isoquinolino-5,8-diona [50] não apresentou nenhum efeito citotóxico. Nas condições utilizadas, foi observado, no entanto, uma redução de 30% e 40% da viabilidade das células U937 e H460 e de 20% nas culturas de COLO205 e MOLT4 na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figuras 27 e 28).

Os resultados indicam um efeito citostático, reduzindo a proliferação das células, o que levou a uma baixa viabilidade da cultura. Também foi possível observar baixíssimos níveis de liberação de LDH nas linhagens celulares testadas.

### 2.1.10. Isoquinolino-5,8-diona [51]

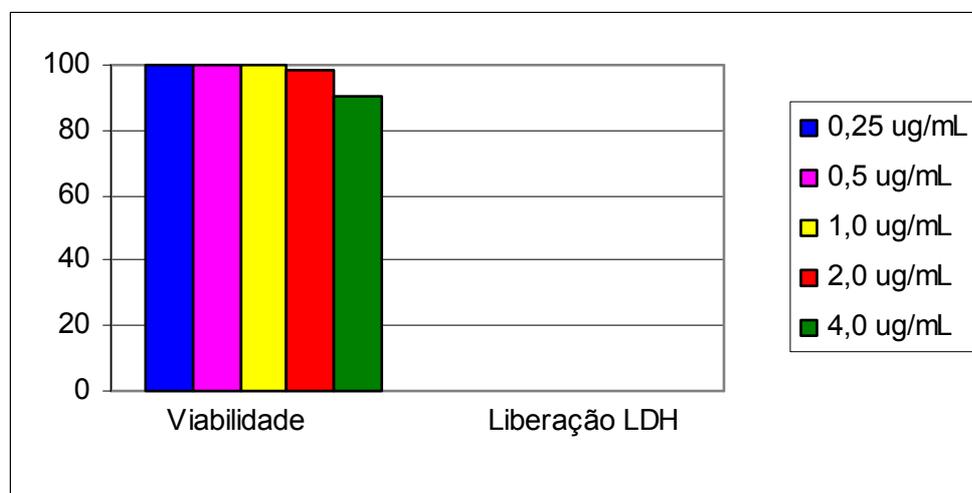


Ensaio sobre as células cancerígenas U937 nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



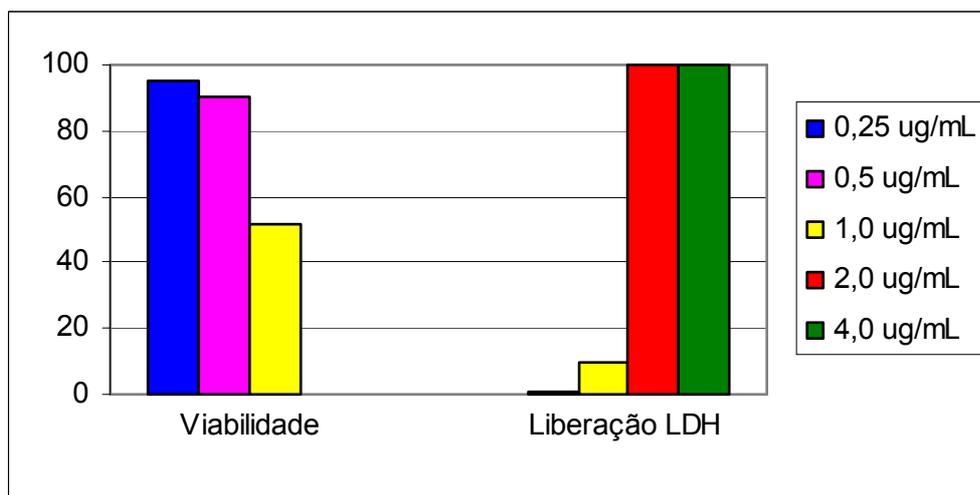
**Figura 30** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [51], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas COLO205, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



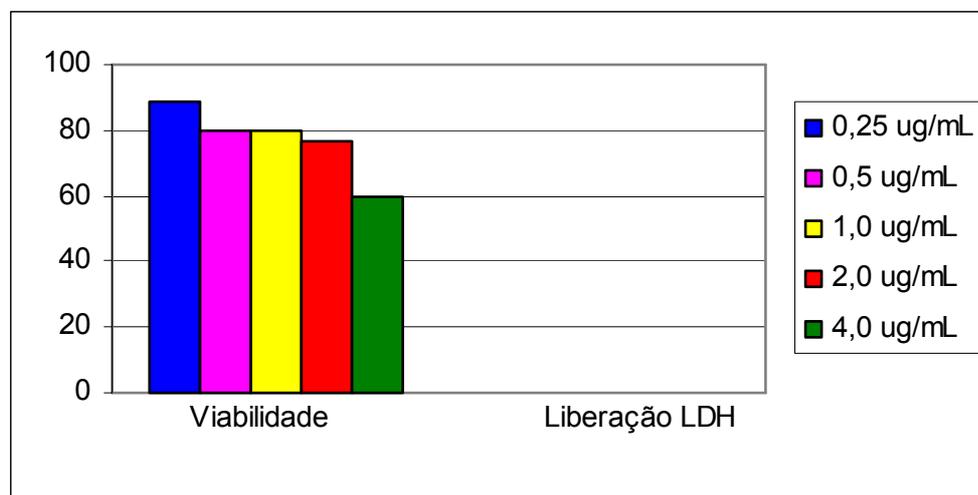
**Figura 31** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [51], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas MOLT4, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 32** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [51], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

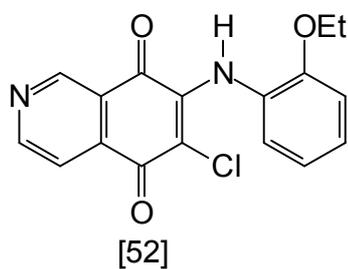


**Figura 33** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [51], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação.

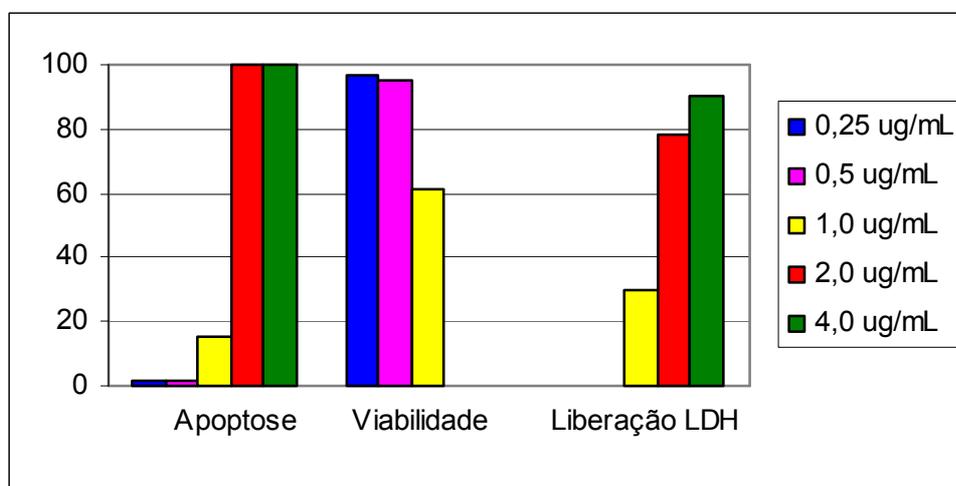
Quando são avaliados os resultados obtidos nos ensaios com a isoquinolino-5,8-diona [51] sobre as células da linhagem U937 (**Figura 30**), observa-se uma redução da viabilidade de 50% na concentração de  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 100% na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Nestas condições, a enzima LDH foi liberada em grande quantidade apenas na maior concentração ( $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A microscopia de fluorescência indicou que todas as células encontravam-se em apoptose na maior concentração testada. As células de linhagem epitelíóides, COLO205 e H460 não apresentaram liberação de LDH e a redução da viabilidade foi observada apenas nas células H460, onde houve uma redução de 40% na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (**Figuras 31 e 33**). Estes dados não são suficientes para indicar que as células morreram durante a experimentação, podendo apenas não ter proliferado. Já as células MOLT4 foram sensíveis à substância [51], inclusive com uma redução de viabilidade maior que a obtida para as células U937. Houve também um aumento concentração-dependente de liberação da enzima LDH (**Figura 32**).

### 2.1.11. Isoquinolino-5,8-diona [52]

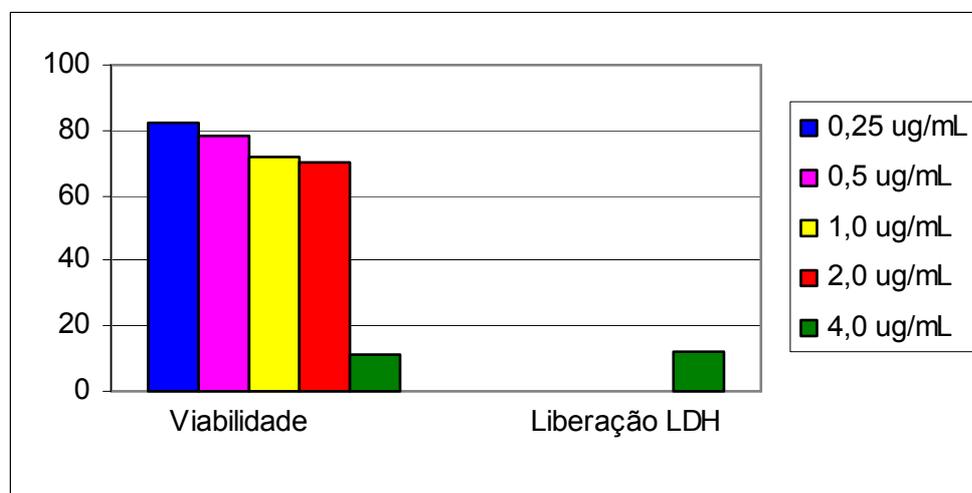


Ensaio sobre as células cancerígenas U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



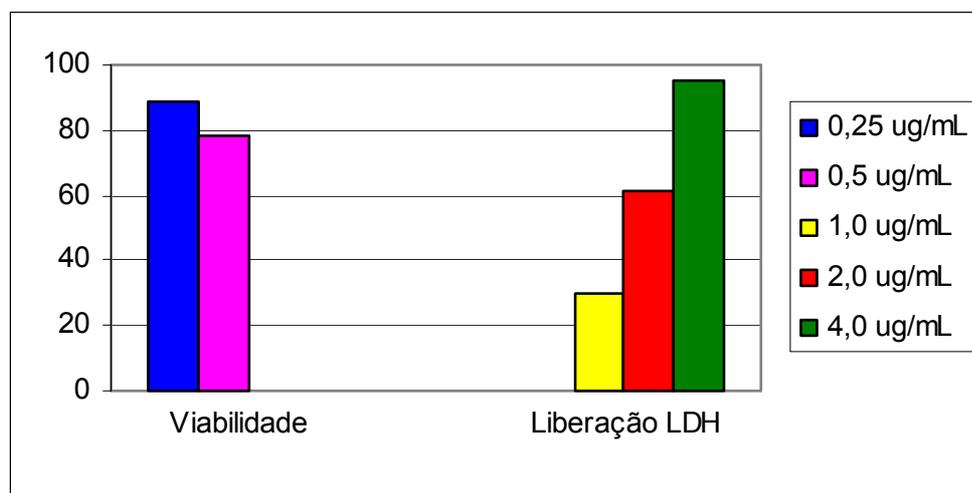
**Figura 34** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [52], sobre a viabilidade das células U937, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas COLO205, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



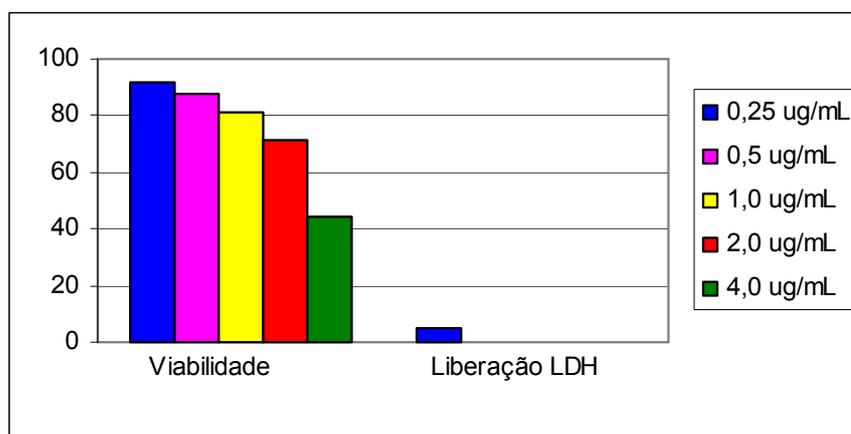
**Figura 35** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [52], sobre a viabilidade das células COLO205, 48 horas após a incubação.

Ensaio sobre as células cancerígenas MOLT4, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 36** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [52], sobre a viabilidade das células MOLT4, 48 horas após a incubação.

**Ensaio sobre as células cancerígenas H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .**



**Figura 37** - Efeitos citotóxicos da isoquinolino-5,8-diona [52], sobre a viabilidade das células H460, 48 horas após a incubação.

Os resultados dos ensaios indicam que a isoquinolino-5,8-diona [52] se mostrou bastante eficiente sobre as células testadas. Com as células U937, já na concentração de  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  não haviam mais células vivas, após 48 horas de tratamento (**Figura 34**).

Uma liberação concentração-dependente de LDH também foi verificada, e os dados da microscopia de fluorescência indicaram que nas duas maiores concentrações testadas ( $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) todas as células estavam em apoptose, sendo muitas em apoptose tardia e liberando LDH para o meio de cultura. As células da linhagem MOLT4 foram mais sensíveis, morrendo todas já na concentração de  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e a taxa de liberação de LDH também foi concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração da isoquinolino-5,8-diona [52], mais rápido as células entravam em apoptose e não resistiam intactas às 48 horas de experimentação, levando à lise (**Figura 36**). As células das linhagens epitelióides H460 e COLO205 mostraram-se sensíveis ao tratamento, principalmente na concentração de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo a primeira mais resistente que a segunda. As células COLO205 tiveram a viabilidade muito reduzida na concentração de  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , com uma discreta liberação de LDH, ao passo que as células H460 mantinham-se mais de 40% viáveis na maior concentração testada, sem liberação de LDH (**Figuras 35 e 37**).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Culturas de células

As células de origem leucêmica humana U937 (linhagem pré-monocítica) e MOLT4 (linhagem pré-linfocítica), foram cultivadas em meio de cultura DMEN/F12 (Gibco, BRL) suplementado com  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As células COLO205 de câncer de colon humano (linhagem epitelióide) e H460 de câncer pulmonar humano de células pequenas (linhagem epitelióide), foram cultivadas em meio RPMI (Gibco, BRL) também suplementado com  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada 2 dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a  $37^\circ\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$  e umidade controlada.

#### 3.2. Quantificação e ajuste das culturas

A quantificação celular foi feita em câmara de Neubauer (Boeco) sendo utilizada a coloração vital por Trypan Blue (Sigma T6146). Uma alíquota da cultura era quantificada e as células ressuspendidas em meio de cultura DMEM/F12 (Gibco, BRL) suplementado de modo a obter-se a concentração final de  $1 \times 10^6$  células $\cdot\text{mL}^{-1}$  de cultura.

#### 3.3. Diluição e armazenamento das isoquinolino-5,8-dionas

As isoquinolino-5,8-dionas, após pesagem, foram diluídas em  $100 \mu\text{L}$  de DMSO (Sigma D2650) e armazenadas a temperatura de  $-70^\circ\text{C}$  (Freezer Forma Scientific) até o momento de montagem dos experimentos. Para a realização dos testes as substâncias eram rediluídas, desta vez em meio de cultura DMEM/F12 (Gibco, BRL) suplementado, de modo a obter as seguintes concentrações finais:  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 3.4. Determinação da citotoxicidade celular

O volume de 100  $\mu\text{L}$ /poço das células U937 na concentração de  $1 \times 10^6$  células·mL<sup>-1</sup> foi distribuídas em placas de cultura celular de 96 poços (TPP 92096), seguida de mais 100  $\mu\text{L}$  das isoquinolino-5,8-dionas, diluídas no meio de cultura DMEM/F12 (Gibco, BRL) suplementado, nas concentrações finais de 0,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 4,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Como controles negativos e positivos, as células foram incubadas somente no meio de cultura. Após 48 horas de incubação, foram acrescentados 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de Triton 10X (Vetec 777) aos poços do controle positivo e, em seguida, 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de todas as culturas foram transferidos para outra placa. Os 150  $\mu\text{L}$  restantes foram reservados para o ensaio metabólico do MTT. A quantidade da enzima Deidrogenase Láctica foi mensurada pelo Kit Deidrogenase Láctica Colorimétrico Doles. A densidade óptica das amostras foi medida em espectrofotômetro multicanal (Labsystems Multiskan) com comprimento de onda ajustado para 492 nm. A taxa de células necróticas foi calculada pela fórmula a seguir:

$$\text{TNR} = (\text{MDOT} - \text{MDOCN}) \times 100 / (\text{MDOCP} - \text{MDOCN})$$

Onde:

TNR = Taxa de Necrose Celular

MDOT = Média das Densidades Ópticas de Cada Teste

MDOCN = Média das Densidades Ópticas do Controle Negativo

MDOCP = Média das Densidades Ópticas do Controle Positivo

### 3.5. Ensaio Metabólico do MTT

Aos 150  $\mu\text{L}$  das culturas celulares reservados dos ensaios para a integridade das membranas celulares acrescentou-se 15  $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico) (Sigma M2128) em PBS (*Phosphate buffered saline*) na concentração de 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As culturas incubadas apenas em meio de cultura suplementado foram consideradas como controle positivo, e as culturas que tiveram as células lisadas com Triton (Vetec 777) foram consideradas como controles negativos de viabilidade. Após 4 horas de incubação, foram retirados 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das culturas e os cristais precipitados de MTT foram solubilizados em 100  $\mu\text{L}$  de solução isopropanol (Merck 1009781000) com 0,0014% de HCl fumegante. Para separar do precipitado, as placas foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm (Centrífuga Sorval RT7) e 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para outra placa e lido em seguida em espectrofotômetro multicanal (Labsystems Multiskan) com comprimento de onda ajustado para 570 nm. A taxa de viabilidade celular foi calculada pela fórmula a seguir:

$$\text{TVC} = (\text{MDOT} - \text{MDOCN}) \times 100 / (\text{MDOCP} - \text{MDOCN})$$

Onde:

TVC = Taxa de Viabilidade Celular

MDOT = Média das Densidades Ópticas de Cada Teste

MDOCN = Média das Densidades Ópticas do Controle Negativo

MDOCP = Média das Densidades Ópticas do Controle Positivo

### 3.6. Microscopia de fluorescência

Para a avaliação da morte celular induzida pelas isoquinolino-5,8-dionas avaliaram-se as células U937 (leucemia humana, linhagem monocítica), MOLT4 (leucemia humana, linhagem linfocítica), COLO 205 (câncer de colon humano, linhagem epitelioide) e H460 (câncer pulmonar humano, linhagem epitelioide). Estas foram submetidas a tratamentos nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e avaliadas por microscopia de fluorescência com coloração de laranja de acridina (Sigma A6529) e brometo de etídio (Sigma E8751), nos tempos de 12, 24 e 48 horas de incubação. Uma gota da suspensão celular foi colocada entre lâmina e lamínula e contadas 300 células por lâmina em campos aleatórios, com diferenciação entre células normais, apoptóticas e necróticas de acordo com as características morfológicas observadas ao microscópio de fluorescência (Nikon Labophot). Foram obtidas micrografias das células, sendo capturadas no microscópio Zeiss Axioplan através do software Axiovision 4.6. As taxas de apoptose para cada experimento foram obtidas de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{TA} = \text{NCA} \times 100 / \text{NCA} + \text{NCN} + \text{NCNM}$$

Onde:

TA= Taxa de apoptoses

NCA= Número de células em apoptose

NCN=Número de células em necrose

NCNM=Número de células normais

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram sintetizadas dezesseis substâncias, uma imina [42], uma amina [43], uma isoquinolina dimetoxilada [44], três isoquinolino-5,8-dionas [35], [38] e [46] derivadas da isoquinolino-5,8-diona [45] e oito isoquinolino-5,8-dionas cloradas [33], [37], [47], [48], [49], [50], [51] e [52] derivadas da 6,7-dicloroisoquinolino-5,8-diona [32].

Todas as isoquinolino-5,8-dionas foram obtidas em cinco etapas, sendo as caulibugulonas A [35], C [37] e D [38] com rendimento total de 18,9%, 8,4% e 8,5%, respectivamente e as demais isoquinolino-5,8-dionas com rendimento total médio de 10,7%.

É importante salientar que a rota sintética proposta neste trabalho é inédita e que atualmente existem apenas duas sínteses de caulibugulonas descritas na literatura, a de Wipf (2004) e a de Tamagnan (2004) e seus respectivos colaboradores.

Das dezesseis substâncias sintetizadas, onze foram submetidas à avaliação de atividade anticancerígena sobre as células U937, COLO205, MOLT4 e H460, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sob condições de laboratório.

Com esses bioensaios, verificou-se que das substâncias que apresentaram atividade anticancerígena, as isoquinolino-5,8-dionas [33] e [46] foram as que mostraram as mais significativas influências sobre o desenvolvimento das células cancerígenas nas concentrações de  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , confirmado no teste de fluorescência.

Esses resultados mostram-se promissores, uma vez que, ao analisar os efeitos apresentados por estas substâncias, nas culturas de U937, MOLT4, COLO205 e H460, todas as células se encontravam mortas a partir da concentração de  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 48 horas após a montagem do experimento, apresentando-se bastante superiores aos obtidos com as outras substâncias testadas. Outro aspecto importante, ao se

analisarem os efeitos provocados por estas substâncias, é que as isoquinolino-5,8-dionas que apresentam grupos eletronegativos substituindo hidrogênio no anel aromático, substâncias [49], [50], [51] e [52], apresentaram, nas mesmas condições experimentais, efeito anticancerígeno bem inferior que as isoquinolino-5,8-dionas [33] e [46], sugerindo, assim, que a atividade está diretamente ligada à sua estrutura química, estando de acordo com os resultados dos trabalhos realizados por Kim e colaboradores (2007).

Nos ensaios referentes às atividades citotóxica e citostática, das onze substâncias submetidas às avaliações (isoquinolino-5,8-dionas [35], [38], [46], [37], [47], [48], [33], [49], [50], [51] e [52]), sobre as células U937, nas concentrações de  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sob condições de laboratório, num período de incubação de 48 horas, somente a isoquinolino-5,8-dionas [33] apresentou apenas atividade citotóxica. As isoquinolino-5,8-dionas [49] e [50] apresentaram apenas atividade citostática e as demais isoquinolino-5,8-dionas apresentaram, simultaneamente, atividades citostática e citotóxica. Estes resultados são extremamente interessantes uma vez que sugerem que dependendo da concentração utilizada as células cancerígenas não entram em processo de apoptose, nem tão pouco de necrose, mas é observada uma redução da viabilidade celular.

Os resultados deste trabalho sugerem a realização de novos ensaios, com outras espécies de células e também com alguns tipos de enzimas, testando outras formulações e doses, a fim de se obter conclusão definitiva sobre o potencial anticancerígeno das substâncias sintetizadas.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABE, R; ASAISHI, K.; ENOMOTO, K; HATTORI, T; LINO, Y; KIKUCHI, K; KOYAMA, H; SAWA, K; UCHINO, J; YOSHIDA, M. (1995) Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 333(22):1444-1455.

ANAZETTI, C. M. e MELO, P. S. (2007) *Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular*. Disponível em <http://www.metrocamp.edu.br/pesquisa/pdf/02.pdf>. Acesso em: 20 de out. 2009, 23:30:45.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. (2007) Integração de informações dos registros de câncer brasileiros / Information integration of Brazilian cancer registries. *Revista de Saúde Pública*, 41(5):865-868.

BRUCE, W. R. e LIN, H. (1969) An Empirical Cellular Approach to the Improvement of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, 29:2308-2310.

CARRIJO, R. M. e ROMERO, J. R. (2000) Oxidações catalíticas e eletrocatalíticas de substratos orgânicos. O cério como oxidante. *Química Nova*, 23(3):331-337.

FIESER, L. F. e HARTWELL, J. L. (1935) The reaction of hydrazoic acid with the naphthoquinones. *Journal of the American Chemical Society*, 57(8):1482-1484.

FREITAS, W. R. (2009) *Efeitos citostático e citotóxico induzidos in vitro por isoquinolinas sintéticas*. Monografia – Ilhéus-BA, Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, 36p.

JIMENEZ, J. T.; STURDÍKOVÁ, M.; STURDÍKA, E. (2009) Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer rugs. *Acta Chimica Slovaca*, 2(2):63-74.

KIM, J. S.; RHEE, H.; PARK, H. J.; LEE, I.; LEE, S. K.; SUH, M.; LEE, H. J.; RYU, C. e CHOO, H. P. (2007) Synthesis of 6-chloroisoquinoline-5,8-diones and pyrido[3,4-*b*]-phenazine-5,12-diones and evaluation of their cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 15:451-457.

KOUZNETSOV, V. V.; VARGAS-MÉNDEZ, L. Y. e MELÉNDEZ-GÓMES, C. M. (2005) Recent progress in the synthesis of quinolines. *Current Organic Chemistry*, 9:141-161.

LAATSCH, H. (2006) Marine bacterial metabolites. *In*: PROKSCH P.; HEINE, H.; MÜLLER, W. E. G. *Frontiers in marine biotechnology*. Germany, Cap.6, 350p.

LEEN, W.; LOCKHRAT, A. C.; KIN, R. B. e ROTHEMBERG, M. L. (2005) *Cancer Pharmacogenomics: Powerful Tools in Cancer Chemotherapy and Drug Development*. *The Oncologist*, 10:104-111.

LE HYARIC, M.; ALMEIDA, M. V. e SOUZA, M. V. N. (2002) Síntese e reatividade de azaindóis: aplicações na preparação de moléculas de interesse biológico. *Química Nova*, 25(6b):1165-1171.

LLORENTE, A. M. (1995) *Reactividad de aminoquinonas frente a electrofilos. Sintesis de analogos de diazaquinomicina A*. Tesis Doctoral – Madrid –Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid - UCM, 310p.

MAKIN, G. e HICKMAN, J. A. (2000) *Apoptosis and cancer chemotherapy*. *Cell Tissue Research*, 301:143–152.

MARSIK, P.; KOKOSKA, L.; LANDA, P.; NEPOVIM, A.; SOUDEK, P. e VANEK, T. (2005) *In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of Nigella sativa seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses*. *Planta Medica*, 71(8):739-42.

MELÉNDEZ-GOMEZ, C. e KOUZNETSOV, V. (2005) Alcalóides quinolínicos: importância biológica y esfuerzos sintéticos. *Universitas Scientiarum*, 10(2):5-18.

MILANOWSKI *apud* MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. (2006) (Review) Marine pharmacology in 2003-2004: anti-tumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer*, 42:2241-2270.

MIN, M. H.; LIU, Z. Z. e CHEN, S. Z. (2004) Bischler-Napieralski reaction of 2-(3,4-dimethoxy-2-nitrophenyl)- N -[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]- N - [(S)-1-phenylethyl] acetamide accompanied by elimination of chiral auxiliary. *Chinese Chemical Letters*, 15(3):253-256.

NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P. e ARAÚJO, H. C. (1999) Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. *Química Nova*, 22(1):05-10.

OLIVEIRA, R. B. e ALVES, R. J. (2002) Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Química Nova*, 25(6):976-984.

OLIVEIRA, A. J. B. e KOIKE, (2003) Luzia. Uma síntese alternativa para o ( $\pm$ )-1,2,3,4-tetraidro-[9H-pirido-[3,4-b]]-indol. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(3):259-264.

OLIVEIRA, C. F.; NASCIMENTO, J. L. M.; MÜLLER, A. H. e ARRUDA, M. S. P. (2001) Avaliação in vitro do efeito anti-proliferativo das drogas BSA-1 e 32/26/2-B em linhagens cancerígenas de retinoblastomaY79. *Revistaic*, 1(1):01-09.

OWTON, W. M. (1999) The synthesis of quinones. *Journal Chemical Society, Perkin Transactions*, 1:2409-2420.

OZORIO, E. J. D.; MONTOYA, G. L. P.; ARANGO, A. (2006) Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. *Revista de la Faculdade de Química Farmacêutica*, 13(1):61-84.

PEDERSEN, J. M.; BOWMAN, W. R.; ELSEGOOD, M. R. J.; FLETCHER, A. J. e LOVELL, P. J. (2005) Synthesis of ellipticine: a radical cascade protocol to aryl- and heteroaryl-annulated[b]carbazoles. *Journal Organic Chemistry*, 70:10615-10618.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. (1998) *Purification of laboratory chemicals*, Oxford, England: Pergamon Press. 3 ed., 1-391.

ROUSSEAU, J. F.; DODD, R. H. *apud* LE HYARIC, M.; ALMEIDA, M. V. e SOUZA, M. V. N. (2002) Síntese e reatividade de azaindóis: aplicações na preparação de moléculas de interesse biológico. *Química Nova*, 25(6b):1165-1171.

RYU, C. K.; JUNG, S. H.; LEE, J. A.; KIM, H. J.; LEE, S. H. e CHUNG, J. H. (1999) 6-arylamino-5,8-quinolinediones 7-arylamino-5,8-isoquinolinediones as inhibitors of endothelium-dependent vasorelaxation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9:2469-2472.

SEIYAKU, T. (1966) *Heterociclos Pi-deficientes: quinolina e isoquinolina*. [http://www2.uah.es/quimica\\_organica/docencia/profesores/julioalvarez/2009-10-H/H03.pdf](http://www2.uah.es/quimica_organica/docencia/profesores/julioalvarez/2009-10-H/H03.pdf). Acesso em: 15 de jul. 2009, 22:14:31.

SHAIKH, I. A.; JOHNSON, F. e GROLLMAN, A. (1986) Streptonigrin. Structure-activity relationships among simple bicyclic analogues. Rate dependence of DNA degradation on quinone reduction potential. *Journal of Medicinal Chemistry*, 29(8):1329-1340.

SHKLYAEV, Y. V. (2002) (Review) Synthesis of alkaloids of isoquinoline class. *Butlerov Communications*, 2(7):21-34.

SPEICH, R.; FENNI, R.; OPRAVIL, M. e FACCARD, R. (2002) Papaverine, a vasodilator with antiviral activity. *Swiss Medical Weekly*, 132:115-118.

TAMAGNAN, G. D.; BALDWIN, R. M. e ALAGILLE, D. (2004) Total synthesis of the marine cytotoxic caulibugulones A–D. *Tetrahedron Letters*, 45(32):6179-6181.

VERMEULEN, K; VAN BOCKSTAELE, D. R. e BERNEMAN, Z. N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. [\*Cell Proliferation\*](#), 36(3):131-149.

YSHIKURA, M.; HINO, A.; YAGINUMA, T.; AGATA, I. e KATAGIRI, N. (2000) A novel entry to pyrido[4,3-*b*]carbazoles: an efficient synthesis of ellipticine. *Tetrahedron*, 56:193-200.

WIPF, P.; JOO, B.; NGUYEN, T. e LAZO, J. S. (2004) Synthesis and biological evaluation of caulibugulones A-E. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2:2173-2174.

## **APÊNDICE**

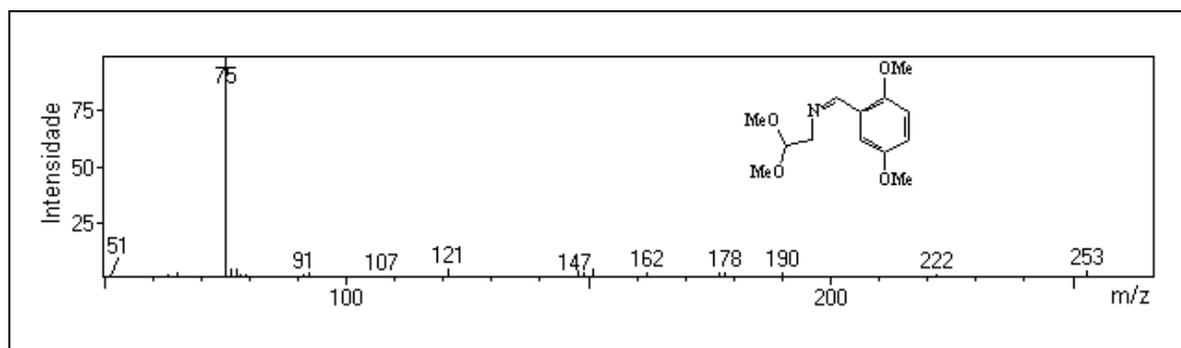


Figura 1A - Espectro de massas da imina [42].

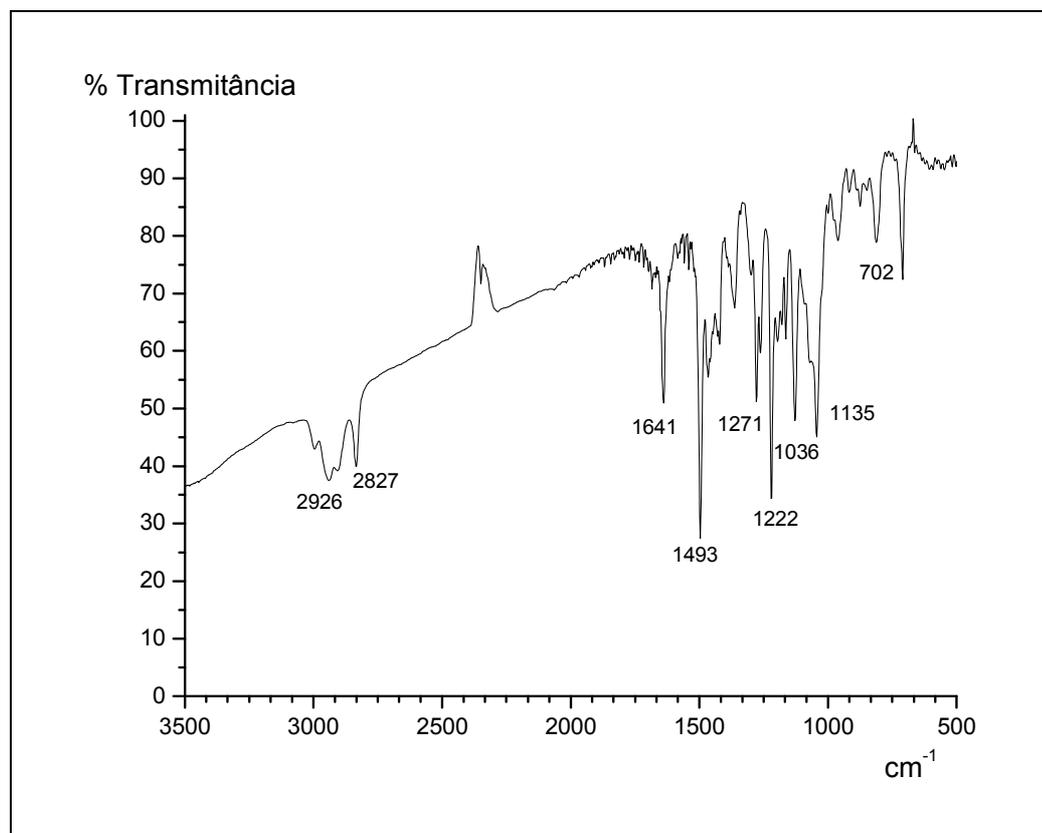
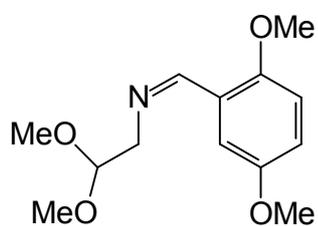
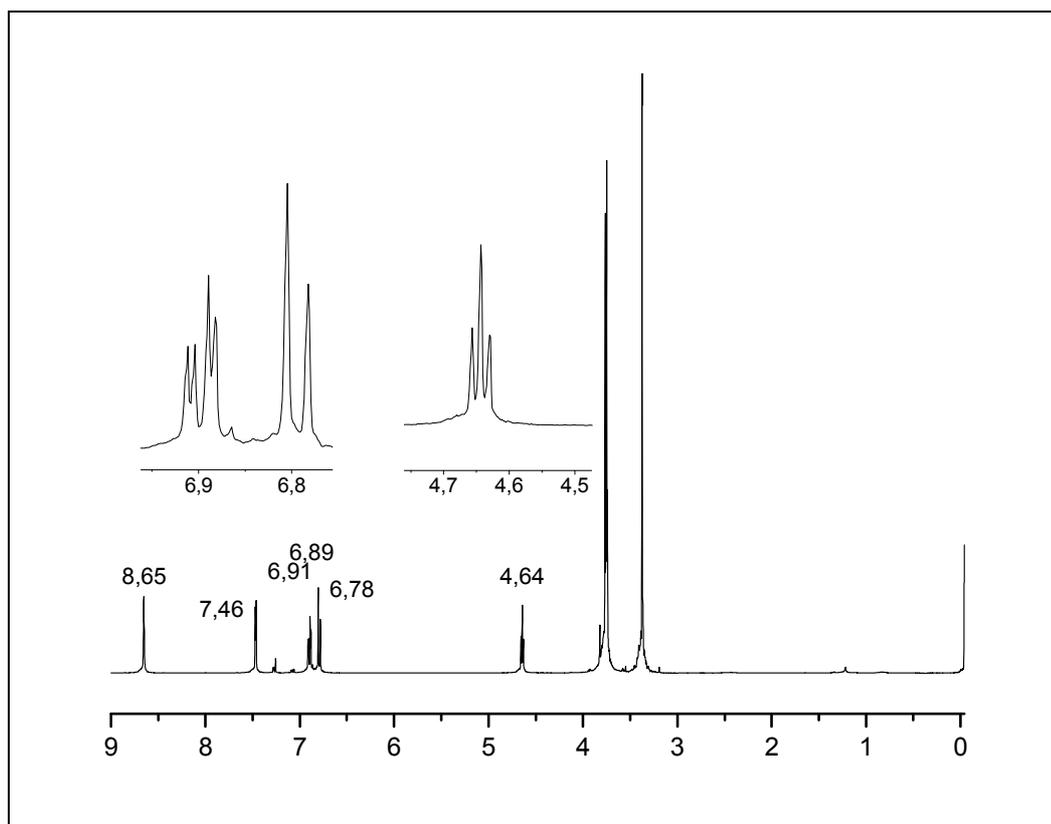
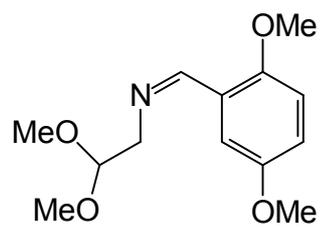
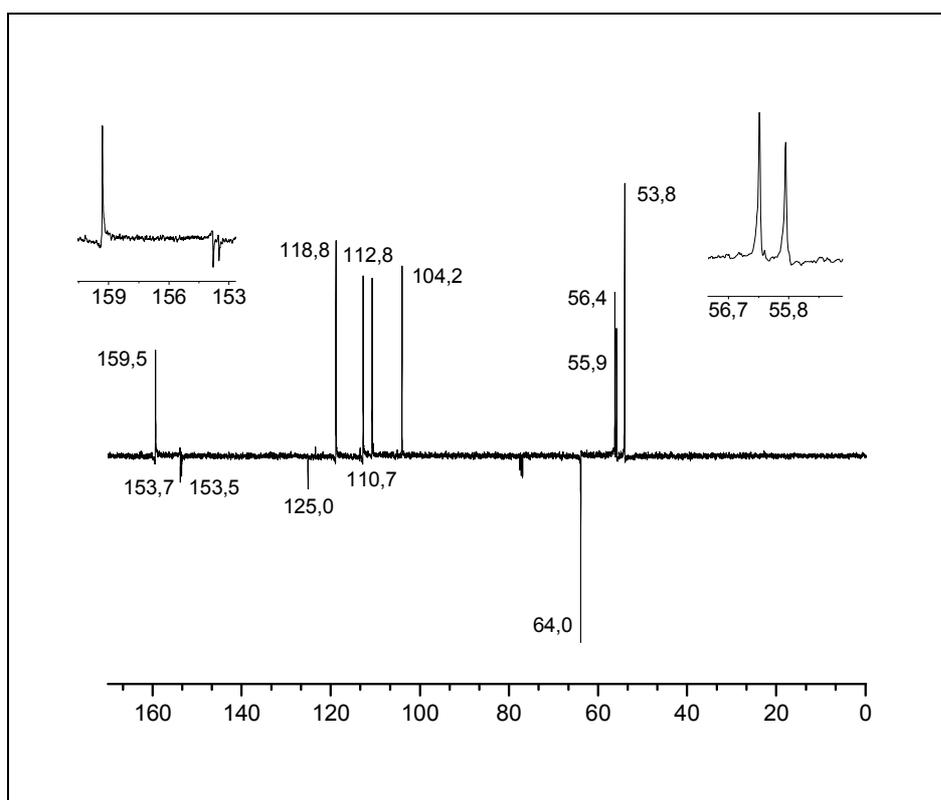
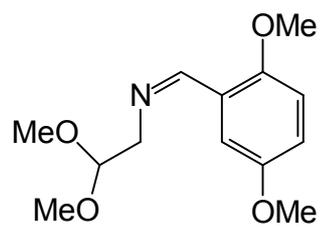


Figura 2A - Espectro no infravermelho da imina [42].



**Figura 3A** - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da imina [42].



**Figura 4A** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da imina [42].

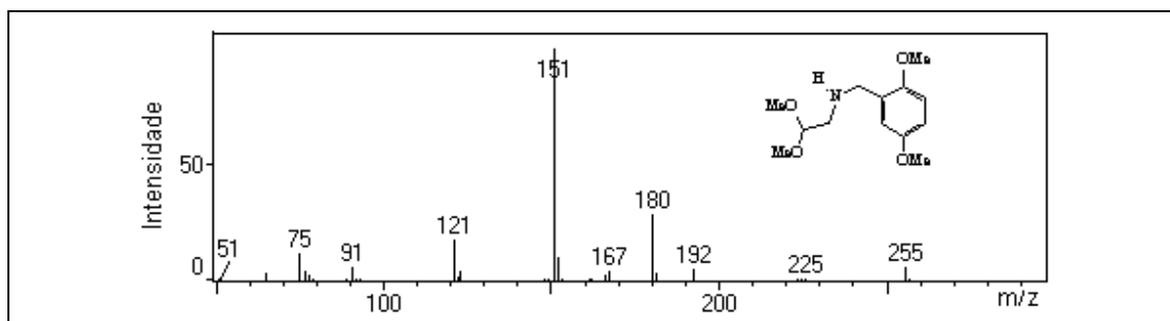


Figura 5A - Espectro de massas da amina [43].

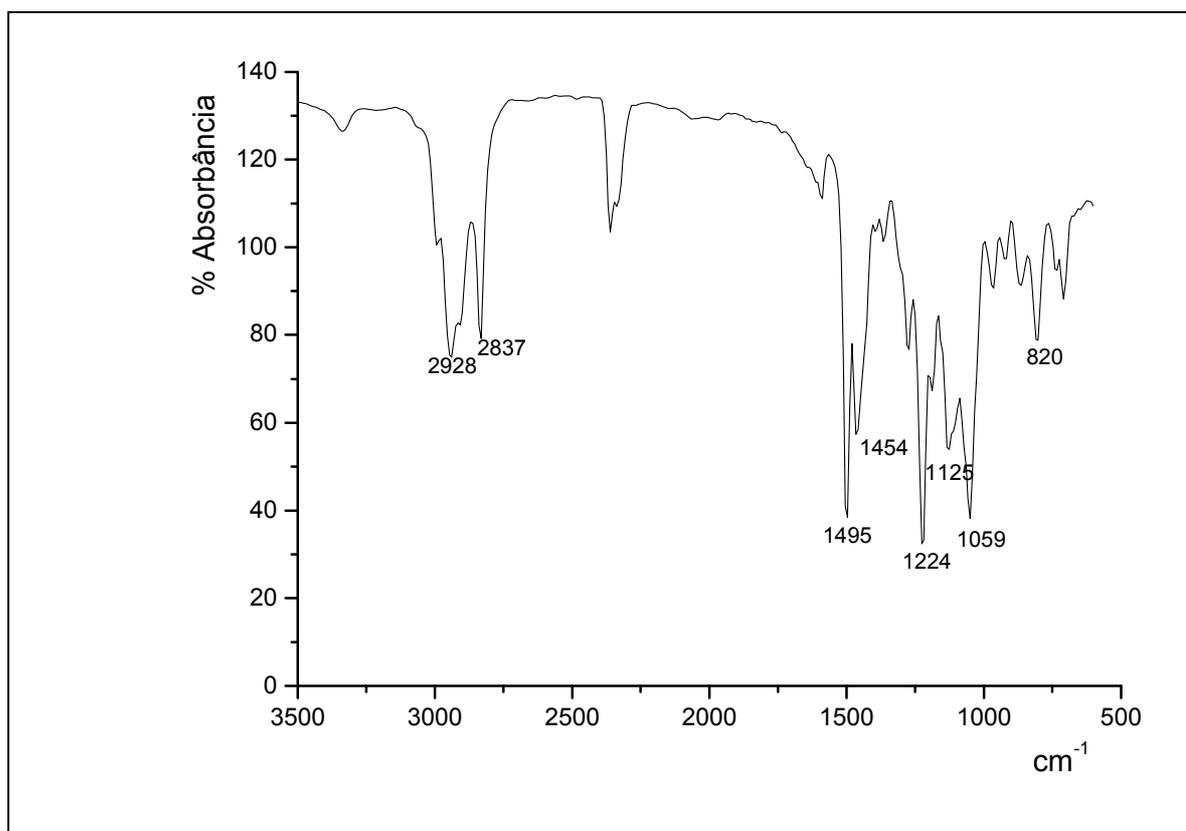
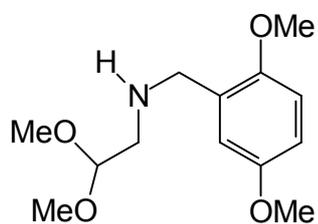


Figura 6A - Espectro no infravermelho da amina [43].

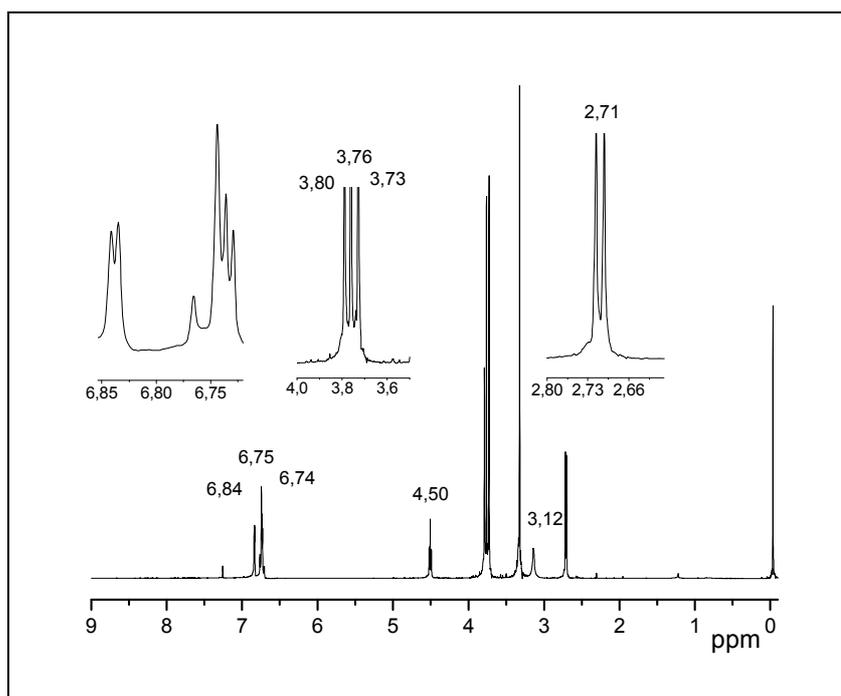
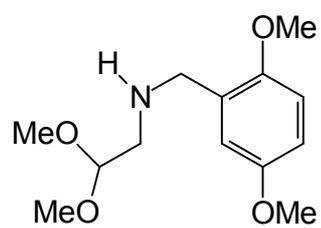


Figura 7A - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amina [43].

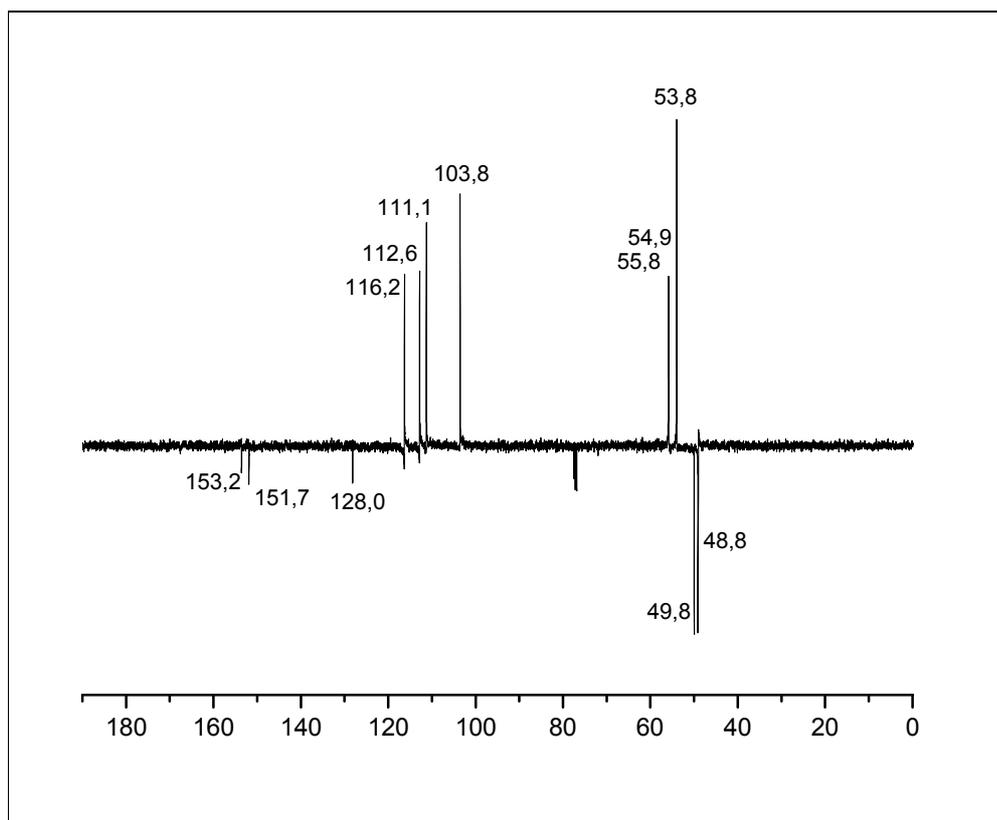
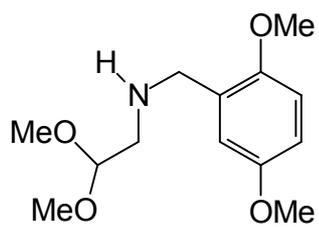


Figura 8A - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amina [43].

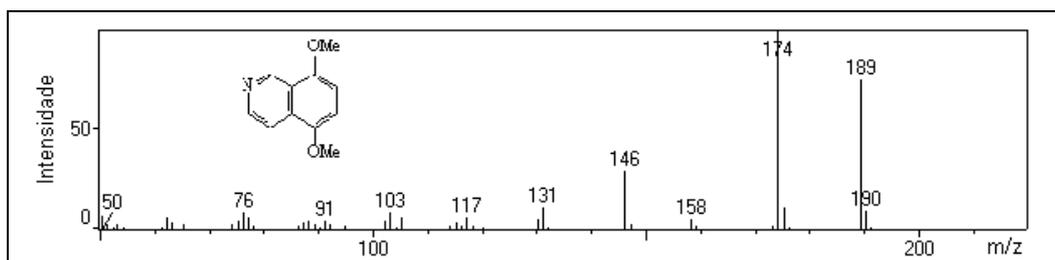


Figura 9A - Espectro de massas da isoquinolina [44].

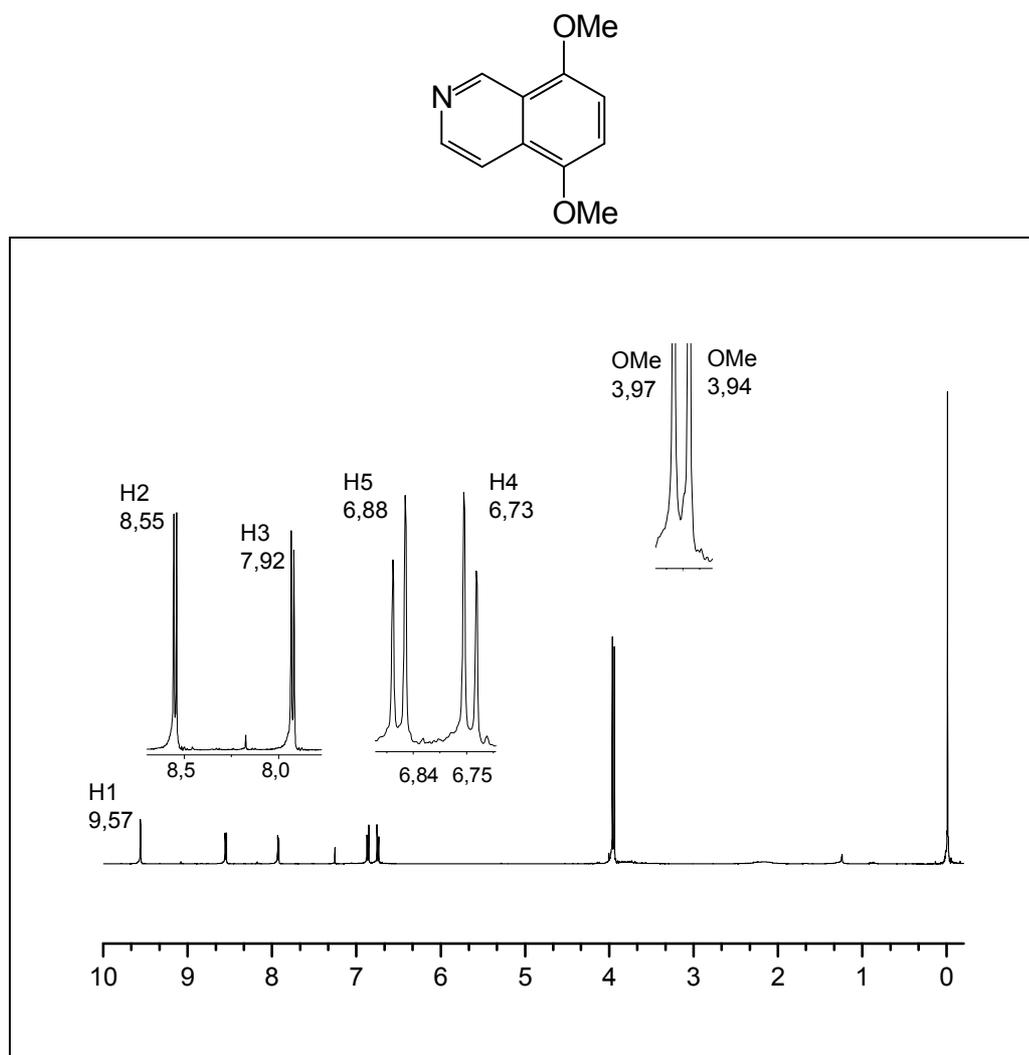


Figura 10A - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amina [44].

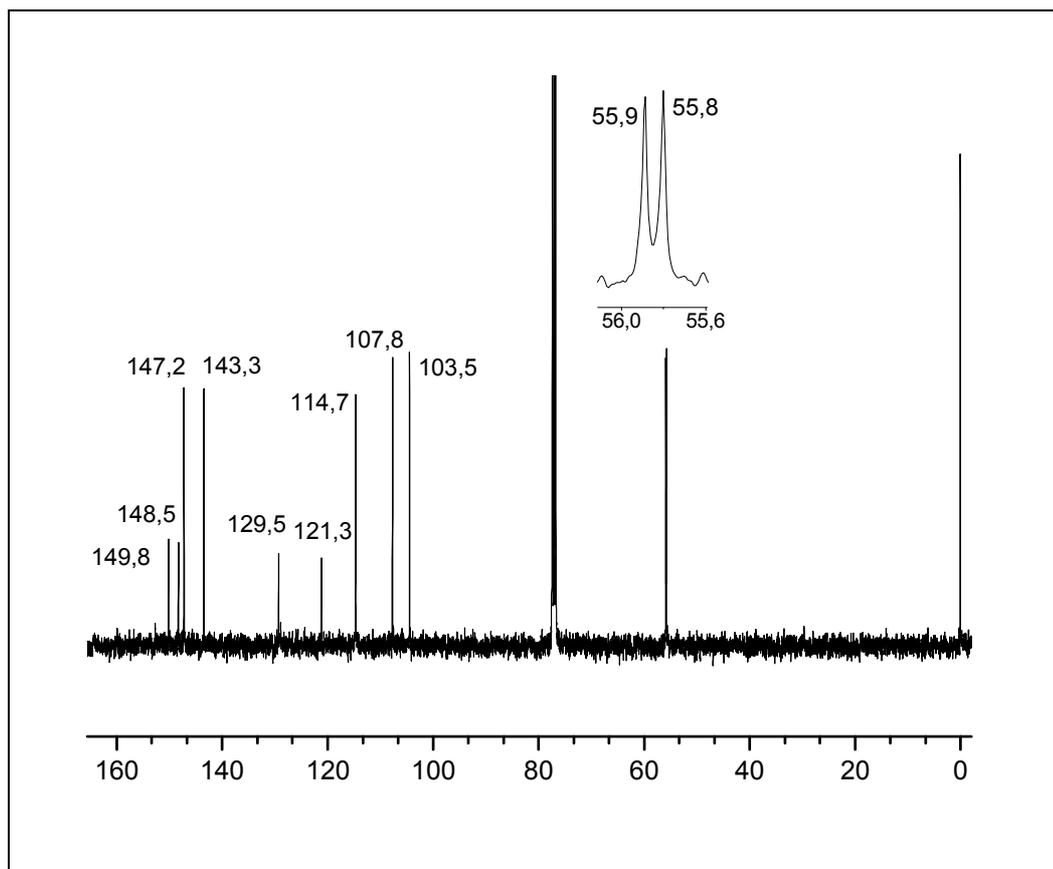
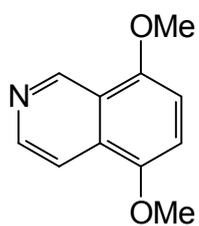


Figura 11A - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da isoquinolina [44].

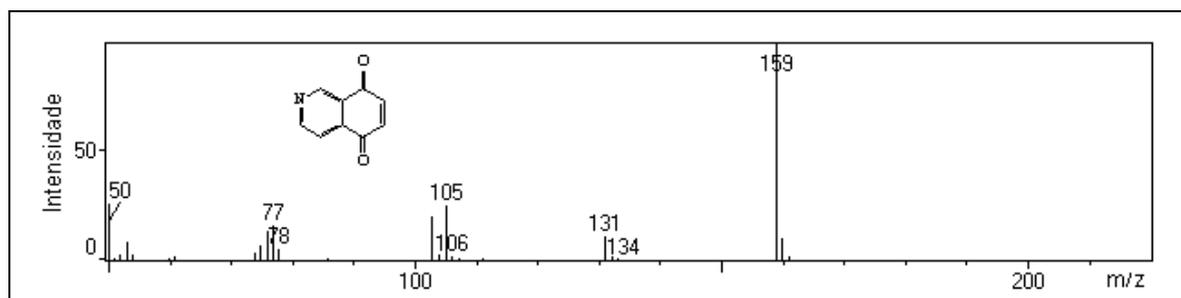


Figura 12A - Espectro de massas da isoquinolino-5,8-diona [45].

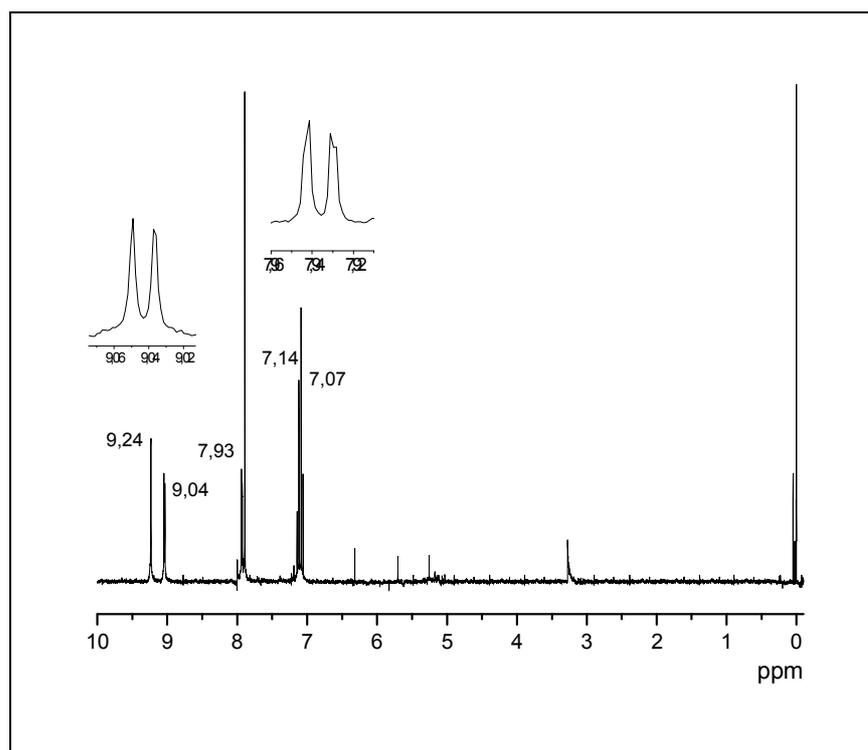
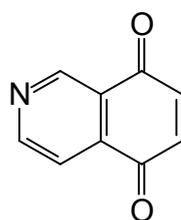


Figura 13A - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da isoquinolino-5,8-diona [45].

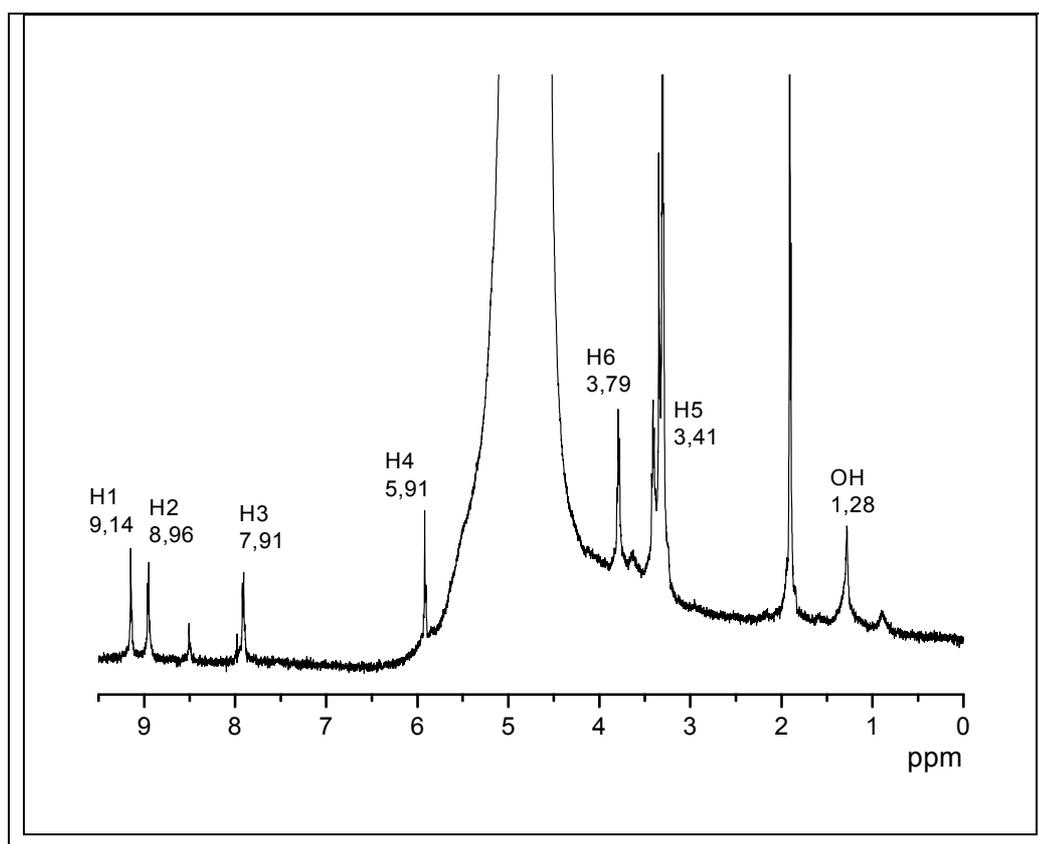
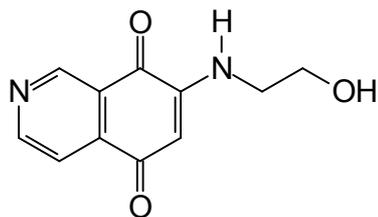


Figura 14A - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Caulibugulona D [38].

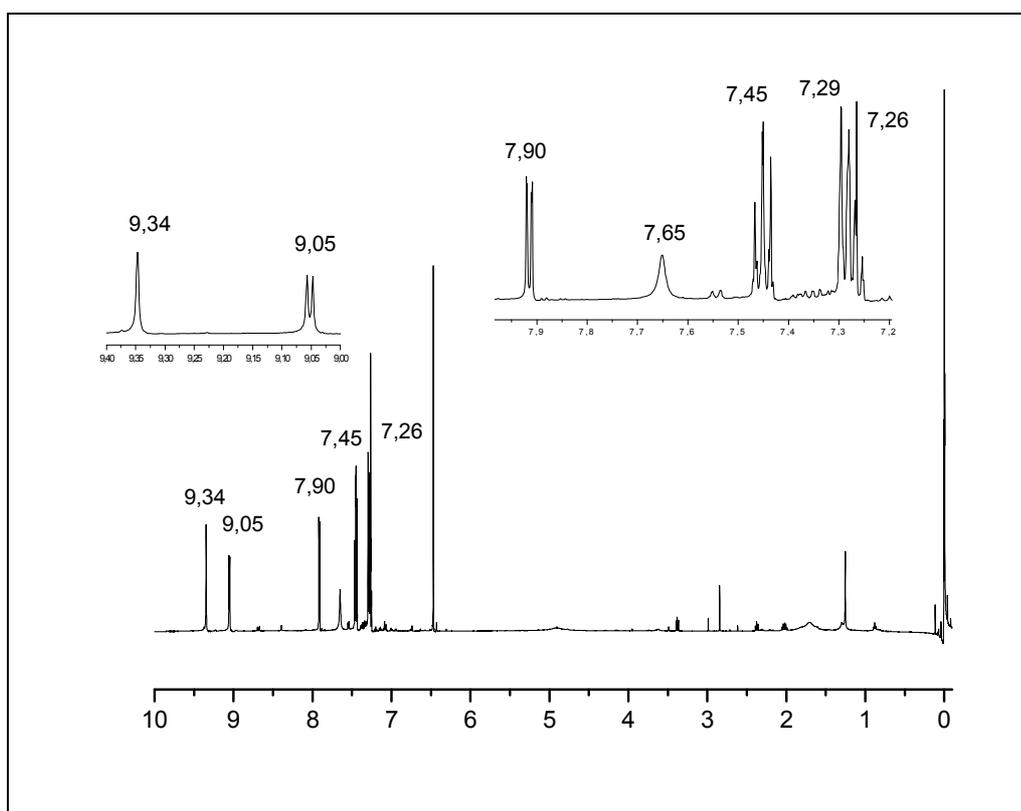
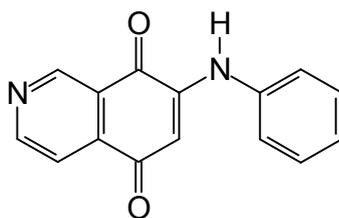


Figura 15A - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Isoquinolino-5,8-diona [46].

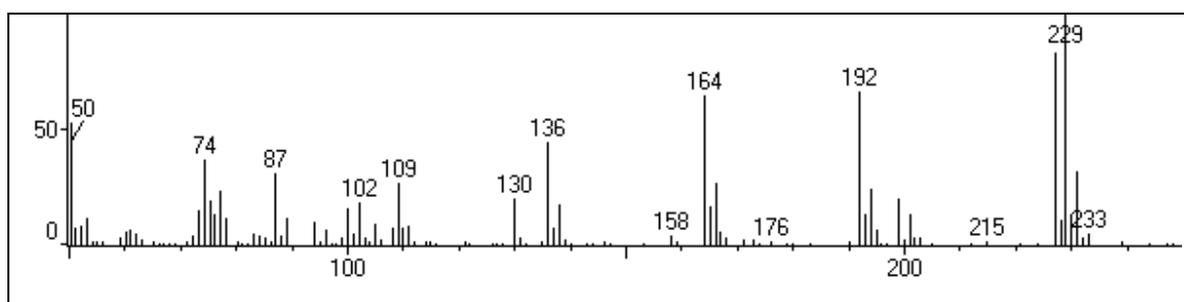
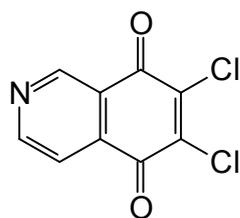


Figura 16A - Espectro de massas da isoquinolino-5,8-diona diclorada [32].

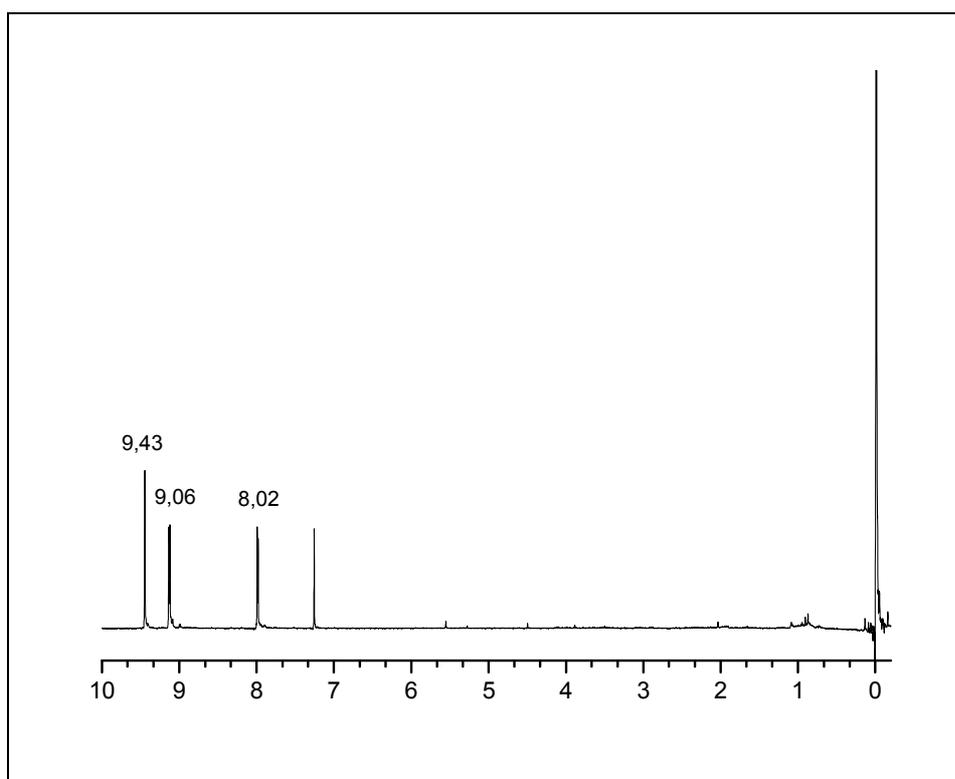
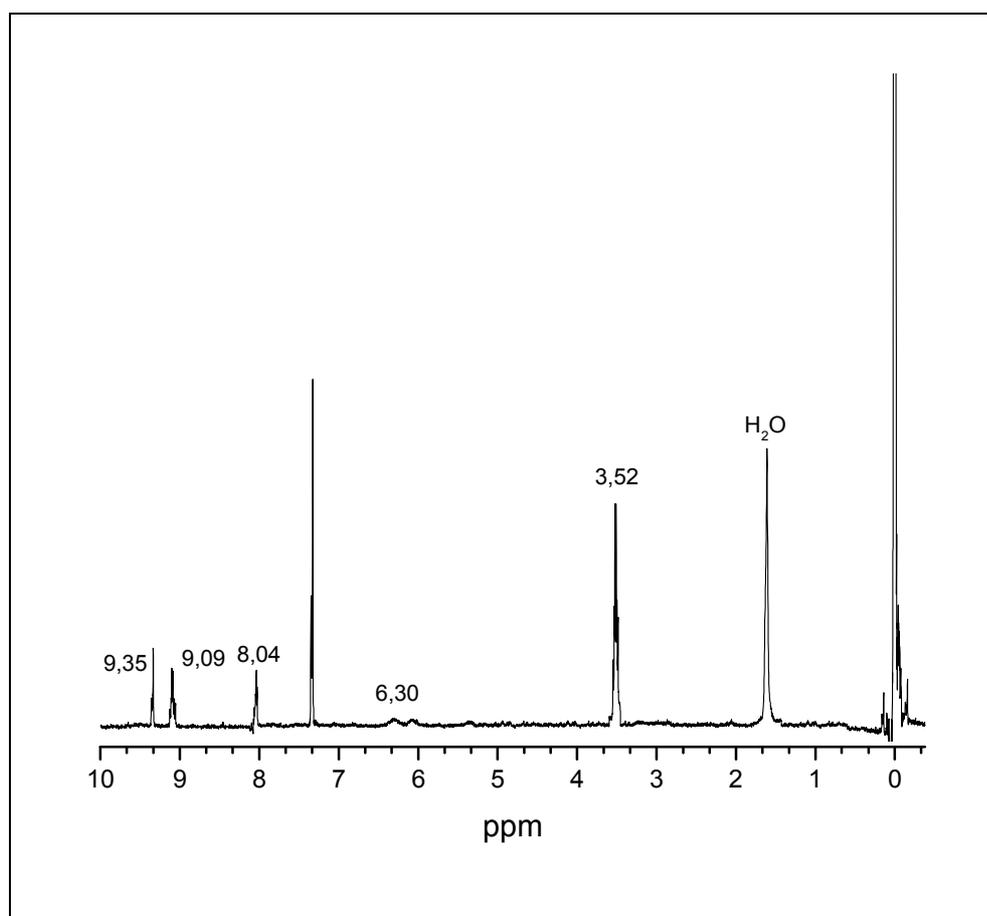
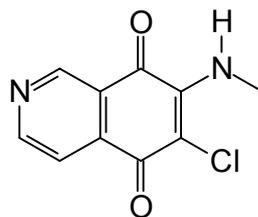
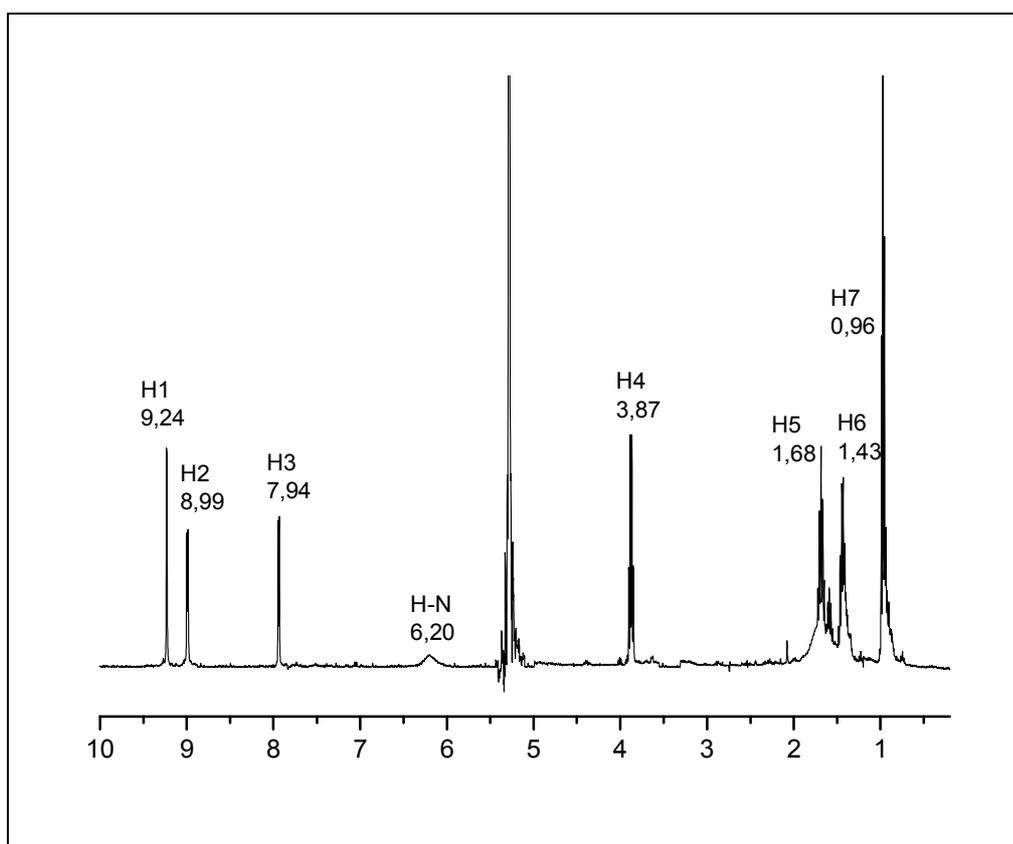
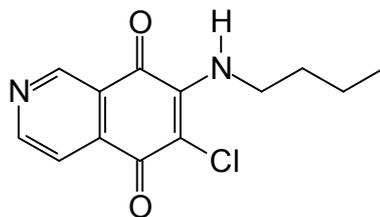


Figura 17A - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Isoquinolino-5,8-diona diclorada [32]



**Figura 18A** - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Caulibugulona C [37].



**Figura 19A** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Isoquinolino-5,8-diona [47]

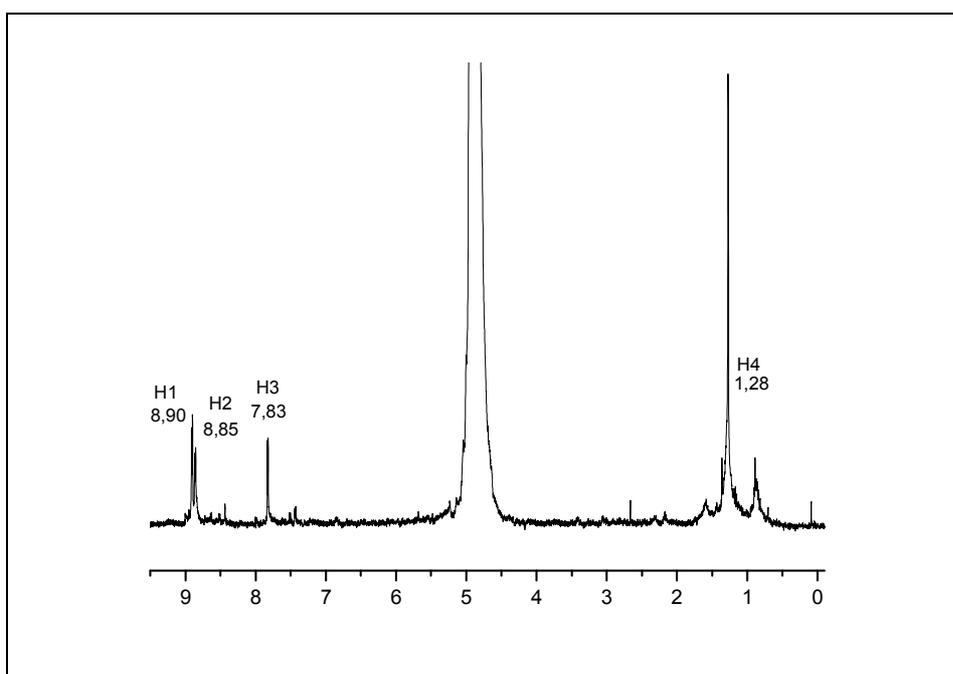
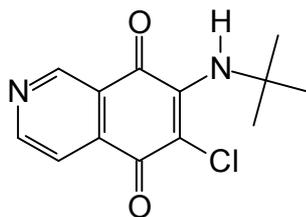


Figura 20A - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Isoquinolino-5,8-diona [48]

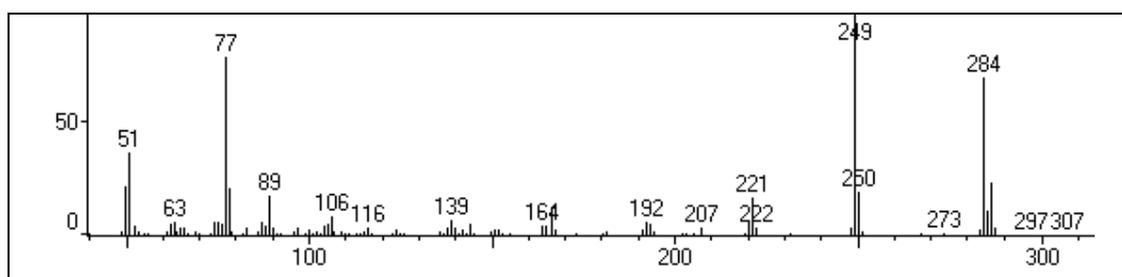
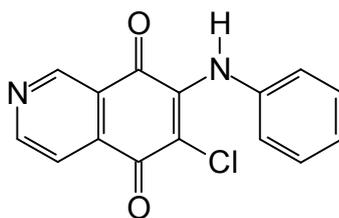


Figura 21A - Espectro de massas da isoquinolino-5,8-diona [33].

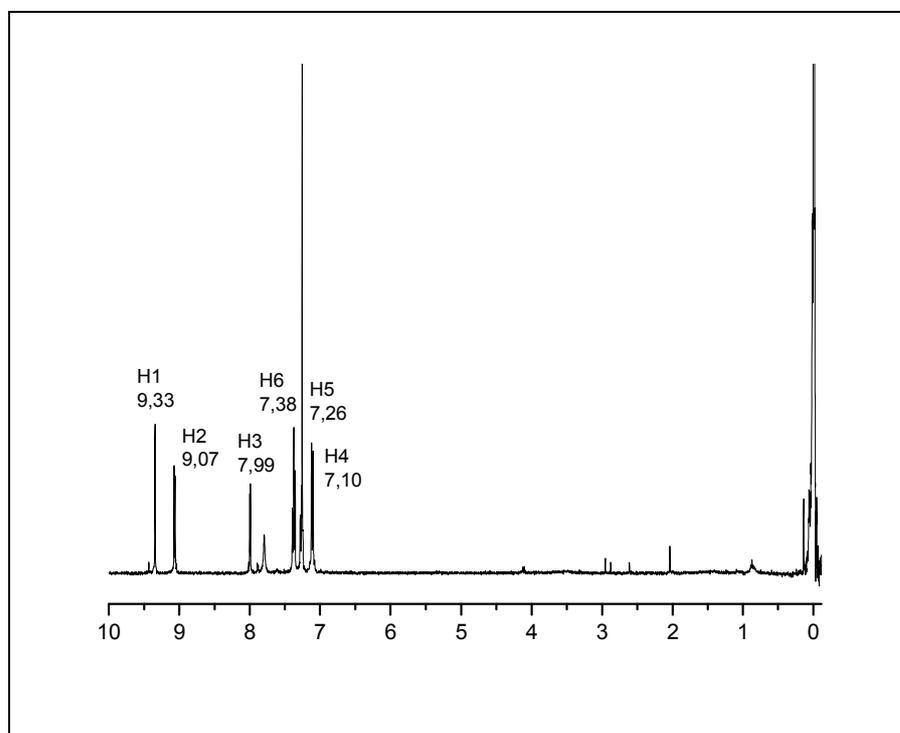
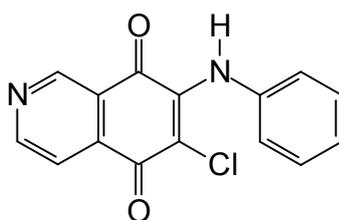
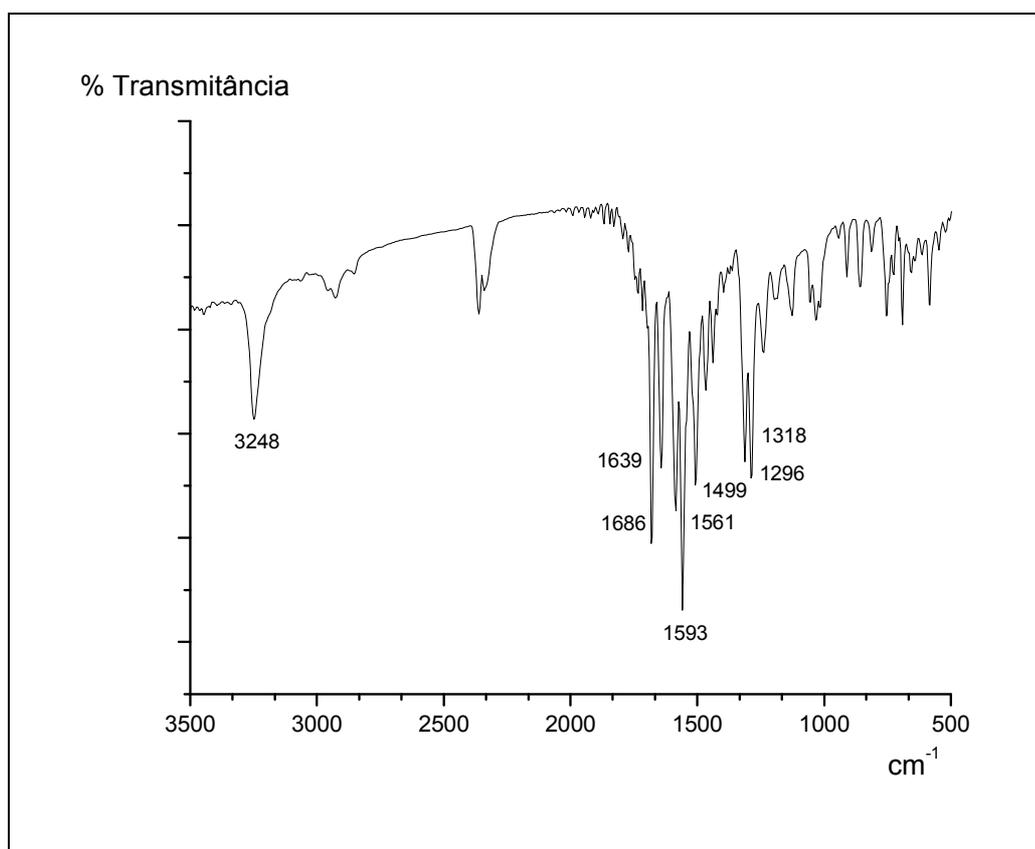
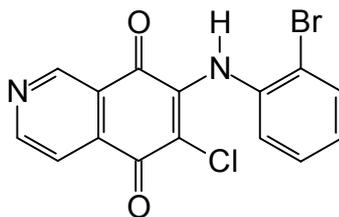


Figura 22A - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Isoquinolino-5,8-diona [33].



**Figura 23A** - Espectro no infravermelho da Isoquinolino-5,8-diona [49].

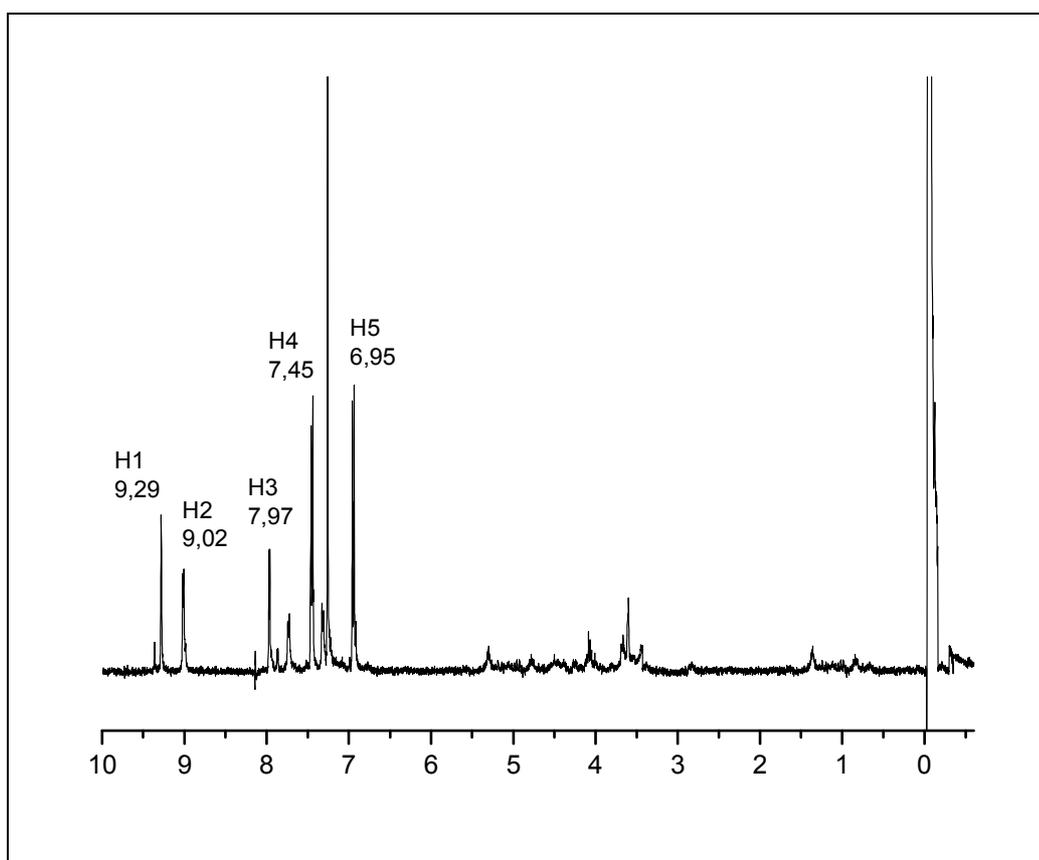
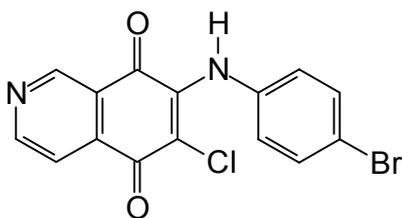


Figura 24A - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Isoquinolino-5,8-diona [50].

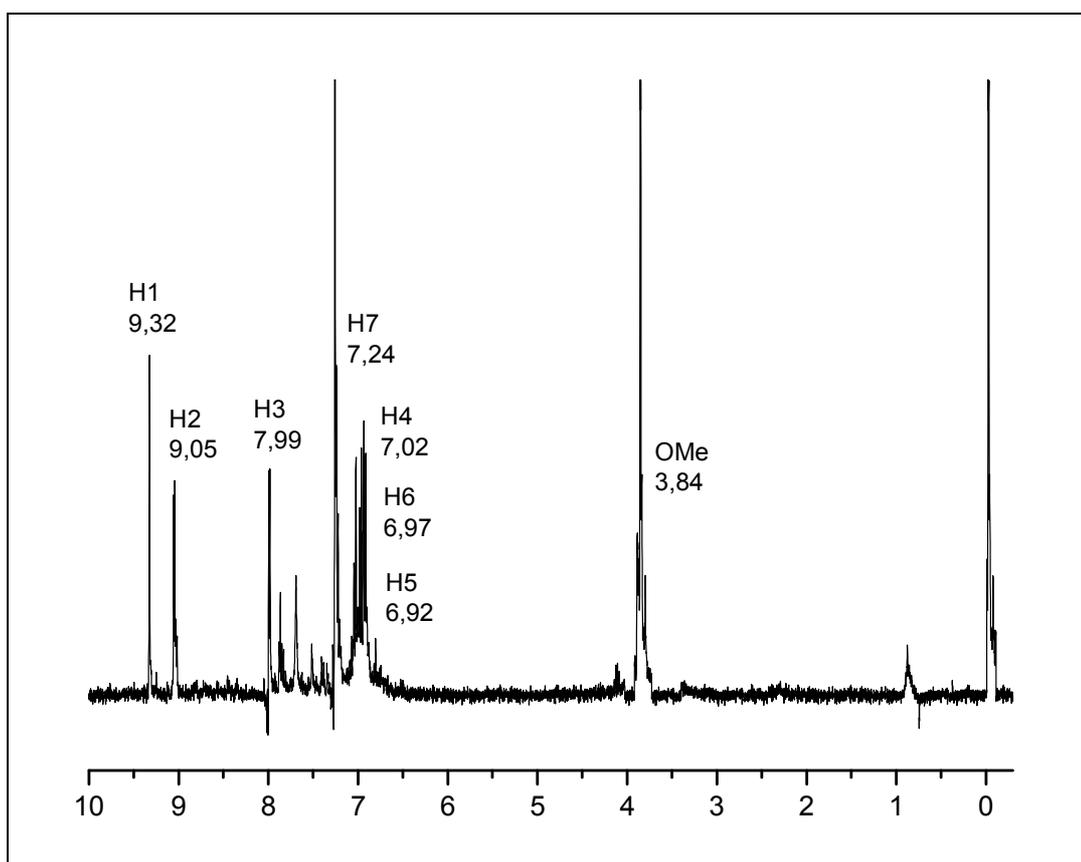
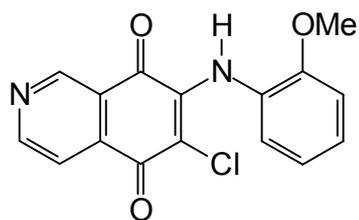
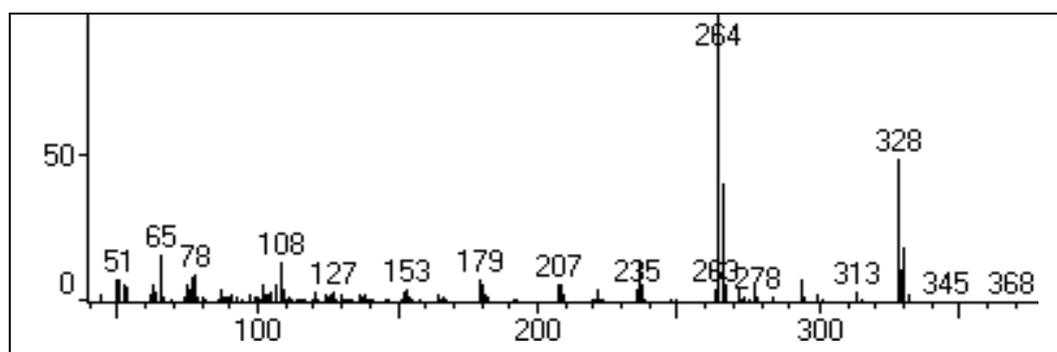
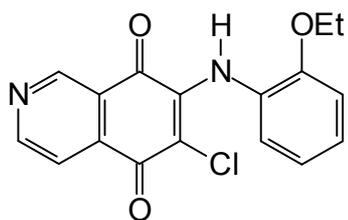


Figura 25A - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Isoquinolino-5,8-diona [51].



**Figura 26A** - Espectro de massas da isoquinolino-5,8-diona [52].