UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos

Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de potenciais antitumorais análogos da sanguinarina planejados por simplificação molecular

Thais Batista Fernandes

Tese para a obtenção do título de doutor

Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos

Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de potenciais antitumorais análogos da sanguinarina planejados por simplificação molecular

Thais Batista Fernandes

Versão Corrigida

Tese para a obtenção do título de doutor

Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

FF363s

Fernandes, Thais Batista
Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de potenciais antitumorais análogos da sanguinarina planejados por simplificação molecular / Thais Batista Fernandes. - São Paulo, 2020.
185 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Parise Filho, Roberto

1. Planejamento de fármacos. 2. Química farmacêutica. 3. Neoplasias. 4. Química orgânica. I. T. II. Parise Filho, Roberto, orientador.

Thais Batista Fernandes

Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de potenciais antitumorais análogos da sanguinarina planejados por simplificação molecular

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Roberto Parise Filho
orientador/ presidente

_____
Roberto Parise Filho

_____
Letícia Costa Lotufo

_____
Wanda Pereira Almeida

_____
Daniel Fábio Kawano

São Paulo, 04 de fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos dá oportunidades e condições para aproveitá-las.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao CNPq (140804/2016-1) e FAPESP (2017/00689-0) pelo auxílio financeiro concedido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Parise Filho, que acreditou no meu potencial e se engajou ao longo destes anos na minha formação como pesquisadora, docente e também como pessoa. Entre broncas e elogios, muitas pontes foram construídas.

Aos meus pais Lucimar Batista Fernandes e André Gonçalves Fernandes, que ao longo da vida se dedicaram em me abrir os caminhos necessários para minhas conquistas acadêmicas.

Ao meu irmão Thales Augusto Batista Fernandes, em quem encontro admiração e inspiração mútuas no que se refere à formação acadêmica e profissional.

Aos meus tios Valéria Batista e Nicanor Vieira, que sempre acreditaram e investiram na minha formação profissional.

Aos companheiros de grupo Alfredo Souza, Gustavo Vasco, Mariana Frojuello, Maurício Tavares e Rosania Yang pela amizade, ombro amigo e contribuição no meu amadurecimento como pessoa, pesquisadora e docente. Agradeço também aos colegas Micael Cunha, Camila Felix, Caroline Branco, Julia Barrios, Karine Esteves e Vitor Navarausckas, que colaboraram para a minha formação e sempre foram dispostos a ajudar. Agradeço especialmente ao Nuno Tavares, que se manteve perto e trouxe serenidade nos momentos de dificuldades.

Aos companheiros e “vizinhos” de laboratório Elys Lima, Fernando Gatti, Natanael Segretti, Marina Primi, Débora Savino, Rodrigo Gonzaga, João Vitor, Diego

Prieto, Luccas Sanches, Mariana Darbem, Isadora Maria e Stanley Vasconcelos, por compartilharem seu conhecimento e estarem sempre dispostos a auxiliar no que podem.

Aos professores e alunos do LAPEN e LITEC. A ajuda mútua é essencial para o bom andamento da pesquisa.

Aos pesquisadores Glaucio Monteiro e Márcio Hirata pela colaboração nos estudos de modelagem molecular. Obrigada por, pacientemente, transmitirem seus conhecimentos.

Às pesquisadoras Elizandra Braganhol, Gabriela Roliano, Priscila Oliveira e Rosania Yang pela colaboração para o desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Às professoras Jeanine Giarolla e Wanda Almeida pela participação e contribuição no exame de qualificação.

Aos funcionários David Olimpio, Mônica Zaninni, Maria Inês, Elisabete de Almeida e Charles Brito pelo auxílio e presteza no que lhes compete.

Aos meus familiares e amigos que participam da construção da pessoa e profissional que sou hoje. Obrigada por estarem ao meu lado.

FERNANDES, T.B. **Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de potenciais antitumorais análogos da sanguinarina planejados por simplificação molecular**. 2020. 185 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

RESUMO

A sanguinarina é um alcaloide capaz de inibir Bcl-x_L, uma proteína antiapoptótica que se encontra superexpressa em linhagens tumorais e que está frequentemente relacionada à resistência destas frente a quimioterápicos antineoplásicos. No intuito de identificar potenciais agentes antitumorais, o objetivo deste trabalho foi sintetizar três séries de análogos da sanguinarina planejados por simplificação molecular e avaliar sua atividade biológica. Dez *N*-benzil-naftil-aminas (**3a-e**; **4a-e**) e dez aril-isoquinolinas (**6a-e**; **7a-e**) foram sintetizadas em duas a três etapas reacionais, utilizando-se métodos de aminação redutiva e acoplamento de Suzuki. Insucesso na etapa de reação de Heck impossibilitou a síntese da terceira série, benzofenantridínica, apesar de testadas diversas condições reacionais. Avaliação da citotoxicidade em linhagens de glioblastoma U87MG revelou que a série *N*-benzil-naftil-amina apresenta melhor atividade quando comparada às aril-isoquinolinas, sendo para ambas, observada atividade superior à temozolamida, principal fármaco para o tratamento de glioblastoma. Estudos em linhagem não tumorigênica MRC-5 demonstraram que os análogos foram significativamente superiores à sanguinarina em relação à seletividade. Os compostos mais mais promissores, **4a** e **6e**, induziram morte celular por apoptose e causaram despolarização da membrana mitocondrial, indicando morte apoptótica pela via extrínseca. Ademais, **4a** interrompeu o ciclo interrompeu o ciclo celular na fase G_2/M, indicando que o mesmo seria um agente ciclo celular específico. Simulações de dinâmica molecular sugerem que os compostos interagem com a proteína Bcl-x_L principalmente por interações hidrofóbicas, e que o composto **4a** apresentaria afinidade com o alvo semelhante à sanguinarina, embora esta tenha apresentado atividade superior em células U87. Perspectivas incluem estudos das vias de indução de morte celular, além da expansão do painel de células. Conclui-se, portanto, que os análogos da sanguinarina representam um arcabouço a ser explorado pelos químicos medicinais no desenvolvimento de potenciais antineoplásicos.

Palavras-chave: glioblastoma; Bcl-x_L; sanguinarina; simplificação molecular; *N*-benzil-naftil-amina; aril-isoquinolina; citotoxicidade; dinâmica molecular.

FERNANDES, T.B. **Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of potential antitumors analogues from sanguinarine designed by molecular simplification.** 2020. 185 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

ABSTRACT

Sanguinarine is an alkaloid able to inhibit Bcl-xL, an antiapoptotic protein which is overexpressed in tumor cells and related to their resistance against antineoplastic chemotherapy. Regarding to develop potential antitumor agents, the aim of this work was the synthesis of three series of sanguinarine analogues designed by molecular simplification and their biological evaluation. Ten *N*-benzyl-naphtyl-amines (**3a-e**; **4a-e**) and ten aryl-isoquinolines (**6a-e**; **7a-e**) were synthesized in two or three reaction steps through reductive amination and Suzuki coupling. Failure about Heck-type reaction had impaired the synthesis of the thirth series, benzophenanthridine, although several conditions were tested. Cytotoxicity evaluation against U87MG glioblastoma cell line showed that *N*-benzyl-naphtyl-amines are more active than aryl-isoquinolines and both series were superior to temozolamide, the main drug for glioblastoma treatment. Tests against non-tumorigenic cell MRC-5 indicated that the analogues were significantly superior to sanguinarine regarding selectivity. The most promising compounds, **4a** e **6e**, induced cell death by apoptosis and mitochondrial membrane depolarization, indicating apoptotic death by extrinsic pathway. **4a** provide cell cycle arrest at G_2/M phase, suggesting that it is a specific cell cycle agent. Molecular dynamics suggested that compounds interact with Bcl-x_L mainly by hydrophobic interactions and **4a** has affinity to the protein like sanguinarine, although the last showed superior activity against U87 cells. Perspectives include mechanistics studies about cell death pathway and expanding cell panel. In conclusion, sanguinarine anlogues represent a scaffold to be explored by medicinal chemists to the development of potential antitumor agents.

Key words: glioblastoma; Bcl-x_L; sanguinarine; molecular simplification, *N*-benzyl-naphtyl-amine; aryl-isoquinolines; cytotoxicity, molecular dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos diferentes tipos de câncer entre a população mundial, referente ao ano de 2018 **18**

Figura 2. Diagrama simplificado dos mecanismos de apoptose. **20**

Figura 3. Representação esquemática das subfamílias de proteínas Bcl-2. **22**

Figura 4. Fármacos inibidores de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2. **23**

Figura 5. Estruturas de antineoplásicos de origem natural **25**

Figura 6. Estrutura química da sanguinarina (destacando os anéis **A**, **B**, **C**, **D** e **E**) e outros alcaloides benzofenantridínicos com atividade citotóxica. **26**

Figura 7. Simplificação molecular no planejamento de fármacos. **31**

Figura 8. Simplificação molecular da sanguinarina, originando as séries de análogos *N*-benzil-naftil-amínicos, aril-isoquinolínicos e benzofenantridínicos. **33**

Figura 9. Mecanismo de formação da imina por adição à carbonila, com eliminação de água. **36**

Figura 10. Mecanismo de formação da amina secundária por redução de imina, empregando boridreto como agente redutor. **36**

Figura 11. Rota sintética para obtenção da série *N*-naftil-benzil-amina. **37**

Figura 12. Espectro de RMN ^{1}H do composto **2a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-benzil-naftil-iminas. **39**

Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C do composto **2a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-benzil-naftil-iminas. **40**

Figura 14. Espectro de RMN ^{1}H do composto **3a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-benzil-naftil-aminas. **41**

Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C do composto **3a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-benzil-naftil-aminas. **42**

Figura 16. Espectro de RMN ^{1}H do composto **4a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N,N*-benzil-metil-naftil-aminas. **43**

Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C do composto **4a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N,N*-benzil-metil-naftil-aminas. **44**

Figura 18. Ciclo catalítico da reação de acoplamento cruzado de Suzuki. **45**

Figura 19. Rota sintética para obtenção da série aril-isoquinolina. **46**

Figura 20. Espectro de RMN ^{1}H do composto **6a**, indicando os principais sinais para a identificação das aril-isoquinolinas. **48**

Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C do composto **6a**, indicando os principais sinais para a identificação das aril-isoquinolinas. **49**

Figura 22. Espectro de RMN ^{1}H do composto **7a**, indicando os principais sinais para a identificação das aril-*N*-metil-isoquinolinas. **50**

Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C do composto **7a**, indicando os principais sinais para a identificação das aril-*N*-metil-isoquinolinas. **50**

Figura 24. Rota sintética para a obtenção das benzofenantridinas. **51**

Figura 25. Síntese dos intermediários *N*-naftil-benzamídicos, utilizando $SOCl_2$ como reagente para a obtenção de cloreto de ácido. **52**

Figura 26. Mecanismo de formação de cloreto de ácido a partir de ácido carboxílico e cloreto de tionila **53**

Figura 27. Mecanismo de formação de cloreto de ácido a partir de ácido carboxílico e cloreto de oxalila. **54**

Figura 28. Mecanismo de formação de amida a partir de cloreto de ácido e amina. **54**

Figura 29. Espectro de RMN ^{1}H do composto **9b**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-naftil-benzamidas. **55**

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C do composto **9b**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-naftil-benzamidas. **55**

Figura 31. *N*-proteção com bromometil-metil-éter. **56**

Figura 32. Mecanismo de *N*-proteção de amida com bromometil-metil-éter (MOMBr). **56**

Figura 33. Mecanismo de *N*-proteção de amida com di-*terc*-butil-dicarbonato (Boc_2O). **57**

Figura 34. Espectro de RMN ^{1}H do composto **10b**, indicando os principais sinais para a identificação *N*-naftil-benzamidas protegidas com Boc. **58**

Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C do composto **10b**, indicando os principais sinais para a identificação *N*-naftil-benzamidas protegidas com Boc. **58**

Figura 36. Ciclo catalítico da reação de acoplamento cruzado de Heck. **62**

Figura 37. Fluxograma simplificado das etapas propostas para os estudos biológicos. **64**

Figura 38. Viabilidade celular da linhagem de glioblastoma humano (U87MG) após 72h de tratamento com sanguinarina (San) e os compostos mais ativos, **3c 4a** e **6e**, pelos métodos do MTT e SRB. **67**

Figura 39. Morfologia celular da linhagem U87MG após 72h de tratamento. **69**

Figura 40. Avaliação da indução de morte celular pela sanguinarina (San), **3c** e **4a** e **6e**, utilizando coloração dupla de anexina (FL1-H) e PI (FL2-H). **72**

Figura 41. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial utilizando coloração com rodamina 123. **74**

Figura 42. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial utilizando coloração com rodamina 123. **75**

Figura 43. Esquema do ciclo celular normal. **76**

Figura 44. Efeito da sanguinarina (SAN), **3c**, **4a** e **6e** sobre a progressão do ciclo celular de linhagem U87MG. **77**

Figura 45. Efeito da sanguinarina (San), **3c**, **4a** e **6e** sobre a progressão do ciclo celular de linhagem U87MG. **78**

Figura 46. Fluxograma simplificado das etapas desenvolvidas nos estudos de modelagem molecular. **81**

Figura 47. Estrutura da proteína Bcl-x_L. **82**

Figura 48. Modelo de interação da sanguinarina com Bcl-xL, proposto por Zhang e colaboradores (2006). **84**

Figura 49. Representação da superfície da Bcl-xL, desmonstrando o modo de interação da sanguinarina, **4a** e **6e**. **85**

Figura 50. Interações entre a proteína Bcl-x_L (PDB 3SP7) e os ligantes sanguinarina, **4a** e **6e**, observadas nas trajetórias de dinâmica molecular. **86**

Figura 51. Análise da trajetória da dinâmica molecular. **87**

Figura 52. Representação das estruturas da sanguinarina, **4a** e **6e**, destacando os anéis **A**, **B**, **C**, **D** e **E**, e seus respectivos mapas de orbital molecular e vetor de momento de dipolo. **90**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores de IC_{50} referente à sanguinarina frente a diferentes linhagens tumorais.	**27**
Tabela 2.	Estruturas de anaálogos planejados a partir de alcaloides benzofenantridínicos e seus respectivos valores de atividade biológica	**27**
Tabela 3.	Resultados obtidos na síntese e caracterização dos análogos *N*-naftil-benzil-amínicos	**38**
Tabela 4.	Resultados obtidos na síntese e caracterização dos análogos aril-isoquinolínicos.	**47**
Tabela 5.	Resultados obtidos na síntese dos intermediários amídicos.	**53**
Tabela 6.	Condições reacionais aplicadas para a obtenção dos intermediários tetracíclicos.	**60**
Tabela 7.	Valores de IC_{50} da sanguinarina e seus respectivos análogos frente à linhagem de glioblastoma U87MG.	**68**
Tabela 8.	Valores de IC_{50} da sanguinarina e seus análogos frente a linhagens U87MG e MRC-5, obtidos pelo método do MTT, e os respectivos índices de seletividade.	**70**
Tabela 9.	Predição *in silico* do perfil farmacocinético da sanguinarina, **4a** e **6e**.	**92**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A1	*Bcl-2 related gene A1* (gene A1 relacionado ao Bcl-2)
ACN	Acetronitrila
AIF	*Apoptosis Inducing Factor* (fator indutor de apoptose)
Apaf-1	*Apoptotic Protease Activing Factor* (fator apoptótico 1 de ativação de protease)
Apo2L	*Apoptosis antigen 2* (antígeno de apoptose 2)
Apo3L	*Apoptosis antigen 3* (antígeno de apoptose 3)
Atm.	Atmosfera
ATP	Trifosfato de Adenosina
BAD	*Bcl-2-Associated Death promoter*(promotora de morte associada à Bcl-2)
BAK	*Bcl-2 Antagonist/Killer protein* (antagonista/assassino de Bcl-2)
BAX	*Bcl-2-Associated X protein* (Bcl-2 associada à proteína X)
Bcl-2	*B-Cell Lymphoma 2 protein* (proteína de linfoma 2 de células B)
Bcl-b	*B-Cell Lymphoma b protein* (proteína de linfoma b de células B)
Bcl-w	*B-Cell Lymphoma w protein* (proteína de linfoma w de células B)
Bcl-x_L	*B-Cell Lymphoma-Extra Large protein* (proteína de linfoma de células B extra grandes)
BH3	*Bcl-2 homology region 3*
BID	*BH3-interacting domain Death agonist* (agonista de morte que interage com o domínio BH3)
BIK	*Bcl-2-Interacting Killer* (assassino que interage com Bcl-2)
BIM	*Bcl-2-Interacting Mediator of cell death* (mediador de morte celular que interage com Bcl-2)
BMF	*Bcl-2-Modifying Factor* (fator modificador de Bcl-2)
CAD	*Caspase-Activated Deoxyribonuclease* (caspase ativada por deoxirribonuclease)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLog P	Logarítmo do oeficiente de Partição octanol-água Calculado
cyt c	Citocromo c
DCM	Diclorometano
DISC	*Death-Inducing Signaling Complex* (complexo de sinalização indutor de morte)
DMF	Dimetilformamida

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido Desoxirribonucléico

DR3 *Decoy Receptor 3* (Receptor Decoy 3)

DR4 *Decoy Receptor 4* (Receptor Decoy 4)

DR5 *Decoy Receptor 5* (Receptor Decoy 5)

Entr. Entrada

FADD *Fas-Associated Protein with Death Domain* (proteína do domínio de morte associada à Fas)

FasL Ligante Fas

FasR Receptor Fas

FCF-USP Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

FDA U.S. Food and Drug Administration

HOMO *Highest Occupied Molecular Orbital* (orbital molecular ocupado de maior energia)

HRK Harakiri

HtrA2 High Temperature Required protein A2

HTS *High Throughput Screening* (Triagem de Alta Demanda)

IAP *Inhibitors of Apoptosis Protein* (proteínas inibidoras de apoptose)

IC_{50} Concentração Inibitória 50%

JNK *c-Jun N-terminal Kinase* (Proteína quinase c-Jun N-terminal)

LAPESSB Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas

LBDD *Ligand-Based Drug Design* (planejamento de fármacos baseado no ligante)

LUMO *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (orbital molecular desocupado de menor energia)

Mcl-1 *Myeloid Cell Leukemia-1 protein* (proteína de célula mieloide de leucemia 1)

MD *Molecular Dynamics* (dinâmica molecular)

MTT *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

NF-κB Fator Nuclear kappa-B

p53 proteína de 53 kDa

PI *Propidium Iodide* (iodeto de propídio)

PIA Proteínas Inibidoras da Apoptose

PKC *Protein Kinase C* (Proteína quinase C)

PUMA *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis* (proteína moduladora de apoptose modulada positivamente por p53)

QSAR *Quantitative Structure-Activity Relationship* (Relação Estrutura-Atividade

	Quantitativa)
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
ROS	*Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)
San	Sanguinarina
SBDD	*Structure-Based Drug Design* (planejamento de fármacos baseado na estrutura)
Smac	*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases* (segundo ativador mitocondrial de caspase)
SRB	Sulforrodamina B
Solv.	Solvente
Temp.	Temperatura
TFA	Ácido Trifluoracético
THF	Tetraidrofurano
TNF	*Tumor-Necrosis Factor* (fator de necrose tumoral)
TNFR	*Tumor-Necrosis Factor Receptor* (receptor de fator de necrose tumoral)
TNFR1	*Tumor-Necrosis Factor Receptor 1* (receptor de fator de necrose tumoral 1)
TRADD	*TNFR1 Associated Protein with Death Domain* (proteína TNFR1 associada ao domínio de morte)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 18
2.1 Epidemiologia do câncer 18
2.2 Aspectos fisiopatológicos do câncer 19
2.3 Terapia antineoplásica e produtos naturais 24
2.4 Planejamento de Fármacos e simplificação molecular 29
3 OBJETIVOS 32
3.1 Objetivo geral 32
3.2 Objetivos específicos 32
3.3 Planejamento dos análogos e modificações moleculares 32
4 SÍNTESE DOS ANÁLOGOS DA SANGUINARINA 35
4.1 *N*-benzil-naftil-aminas 35
4.1.1 Introdução 35
4.1.2 Método 36
4.1.3 Resultados e discussão 37
4.2 Aril-isoquinolinas 44
4.2.1 Introdução 44
4.2.2 Método 46
4.2.3 Resultados e discussão 46
4.3 Benzofenantridinas 51
4.3.1 Introdução 51
4.3.2 Método 51
4.3.3 Resultados e discussão 52
5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* 63
5.1 Introdução 63
5.2 Método 64
5.3 Resultados e discussão 65
5.3.1 Avaliação da citotoxicidade 65
5.3.2 Avaliação da indução de morte celular 70
5.3.3 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial 73
5.3.4 Análise do ciclo celular 75

6 MODELAGEM MOLECULAR 79
6.1 Introdução 79
6.2 Método 80
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 81
6.3.1 Dinâmica Molecular 81
6.3.2 Determinação de propriedades físico-químicas 88
6.3.3 Predição do perfil farmacocinético *in silico* 91
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 94
8 PARTE EXPERIMENTAL 96
8.1 Química 96
8.1.1 Reagentes e solventes utilizados 96
8.1.2 Métodos cromatográficos 96
8.1.3 Métodos espectrométricos por ressonância magnética nuclear 97
8.1.4 Métodos sintéticos 97
8.2 Avaliação biológica 109
8.2.1 Cultura de células 109
8.2.2 Avaliação da citotoxicidade por MTT 110
8.2.3 Avaliação da citotoxicidade por sulforrodamina B 110
8.2.4 Estudo de indução apoptótica por anexina e iodeto de propídio 111
8.2.5 Análise do ciclo celular 111
8.2.6 Análise do potencial de membrana mitocondrial 111
8.3 Modelagem molecular 112
8.3.1 Ancoramento molecular 112
8.3.2 Dinâmica molecular 113
8.3.3 Predição do perfil farmacocinético *in silico* 114
9 REFERÊNCIAS 115
ANEXOS 135

1 INTRODUÇÃO

O termo “câncer” se aplica a uma diversidade de doenças, que podem acometer diferentes tecidos do organismo e compartilham de uma patogênese comum, envolvendo a proliferação desordenada de células mutadas (LABI; ERLACHER, 2015). O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e seu tratamento permanece um desafio, tendo em vista a resistência das células tumorais frente ao tratamento quimioterápico, capacidade de metástase e a elevada toxicidade relacionada aos fármacos antitumorais (WU et al., 2017).

Muitos esforços, por parte da academia e da indústria, são despendidos na pesquisa e desenvolvimento de terapias contra o câncer, que compreende basicamente intervenção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Embora novas abordagens, como o uso de anticorpo monoclonal, tenham sido desenvolvidas, o estudo e utilização de pequenas moléculas no tratamento de tumores é, ainda, a estratégia mais empregada (ADAMS et al., 2015; LEE; TAN; OON, 2018).

Neste sentido, a indução da morte celular apoptótica em células tumorais, através de ligantes sintéticos é uma abordagem promissora no desenvolvimento de novos agentes antitumorais. Alvos envolvidos nas vias de apoptose têm sido estudados e explorados no planejamento de compostos para o tratamento do câncer, dentre os quais a proteína inibidora de apoptose, Bcl-xL, vem ganhando destaque (SUVARNA; SINGH; MURAHARI, 2019).

Após a recente aprovação do inibidor de proteínas antiapoptóticas, venetoclax, primeiro e único fármaco da classe introduzido na terapêutica, a inibição de proteínas antiapoptóticas no tratamento do câncer se consolida como uma estratégia eficaz no tratamento da determinados tipos de cânceres, e que necessita ser expandida no que se refere à diversidade de fármacos disponíveis que atuem por meio deste mecanismo (FDA, 2016; MULLARD, 2016). Assim, o presente trabalho vem como uma contribuição para a pesquisa e desenvolvimento de antitumorais inibidores de proteína antiapoptótica Bcl-x_L.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer se destaca como um problema de saúde pública, tendo em vista o crescente número de indivíduos acometidos pela doença. No ano de 2018, foram registrados 18.078.957 casos e 9.555.027 óbitos pela doença em todo o mundo. Entre os diferentes tipos de câncer, os mais incidentes são os de pulmão, mama, colorretal e próstata, e as causas mais comuns de morte por câncer envolvem tumores de pulmão, colorretal, estômago e fígado (figura 1) (GLOBOCAN, 2019a).

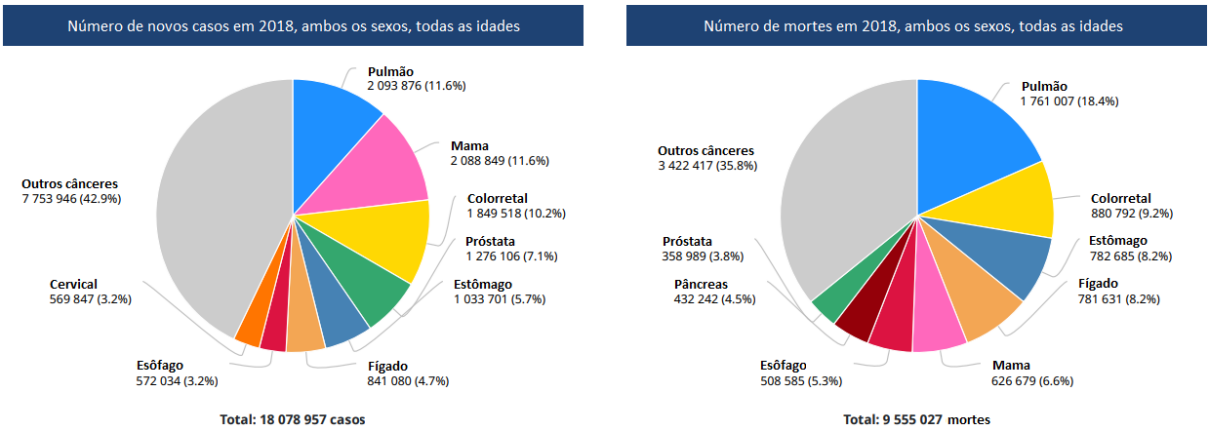


Figura 1. Distribuição proporcional dos diferentes tipos de câncer entre a população mundial, referente ao ano de 2018 (GLOBOCAN, 2019a).

No Brasil, foram 559.371 novos casos e 243.588 mortes pelo câncer em 2018. Os cânceres de próstata e mama se caracterizam como os mais incidentes entre homens e mulheres, respectivamente. Embora o aumento da expectativa de vida seja um fator relacionado aos níveis de incidência de câncer, o risco de ser acometido pela doença antes dos 75 anos no país chega a quase 22 % (GLOBOCAN 2019b).

Uma diversidade de fatores estão associados ao risco de desenvolver câncer, dentre os quais 80 a 90% estão relacionados a causas externas. Maus hábitos alimentares, sedentarismo, obesidade, tabagismo e exposição à radiação estão entre estas causas. Causas herediárias, por sua vez, influenciam em 10 a 20% dos casos (INCA, 2019).

2.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DO CÂNCER

A proliferação desordenada das células que dão origem ao câncer envolve mutações genéticas que causam alterações em processos relacionados com a replicação e/ou morte celular, resultando em autossuficiência de sinais de crescimento, perda da sensibilidade aos sinais anticrescimento, evasão à apoptose, aumento do potencial replicativo, angiogênese, invasão tecidual e metástase (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011; RUBIN, 2006).

Neste contexto, a apoptose é de suma importância como um processo fisiológico de morte celular programada, que desempenha papel fundamental na homeostase de organismos pluricelulares, removendo células senescentes ou defeituosas, bem como as células tumorais. A apoptose é a forma de morte celular programada melhor caracterizada bioquimicamente, e envolve um processo no qual caspases (acrônimo de *cysteine-dependent aspartate-directed proteases*, ou proteases dirigidas por aspartato dependentes de cisteína) são ativadas em resposta a um estímulo extracelular (via extrínseca) ou dano interno (via instrínseca ou mitocondrial), culminando em uma forma de morte celular definida por eventos moleculares distintos e mudanças características na morfologia da células (BERGANTINI; SOUZA; FETT-CONTE, 2005; RILEY et al., 2015; SHALINI et al., 2015).

As caspases podem ser subdivididas em duas categorias: caspases iniciadoras (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 12), que regulam a atividade das caspases efetoras a partir da ativação de sua forma inativa (prócaspases) na sua forma ativa (caspases 3, 6, 7 e 14), que clivam outros substratos proteicos da célula, resultando em morte celular (FUCHS; STELLER, 2015; SHALINI et al., 2015).

A via extrínseca (figura 2) envolve a ativação de receptores específicos presentes na superfície celular pertencentes à superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) pelos seus respectivos ligantes. FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 são alguns exemplos de ligantes e seus respectivos receptores que participam desta via. A ativação destes receptores resulta na ligação de proteínas adaptadoras como FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain* – Proteína do Domínio de Morte Associada à Fas) ou TRADD

(*TNFR1 Associated Protein with Death Domain* – Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1) (a qual recruta FADD). FADD então associa-se à procaspase-8 e forma um complexo de sinalização indutor de morte (CSIM ou do inglês, *DISC*) que converte procaspase-8 em caspase-8. Esta, por sua vez, ativa uma cascata de caspases efetoras (3, 6 e 7). O resultado final inclui a ativação de endonucleases que causam a fragmentação do DNA e morte celular (ELMORE, 2007; PORTH; MATFIN, 2010; XU; SHI, 2007).

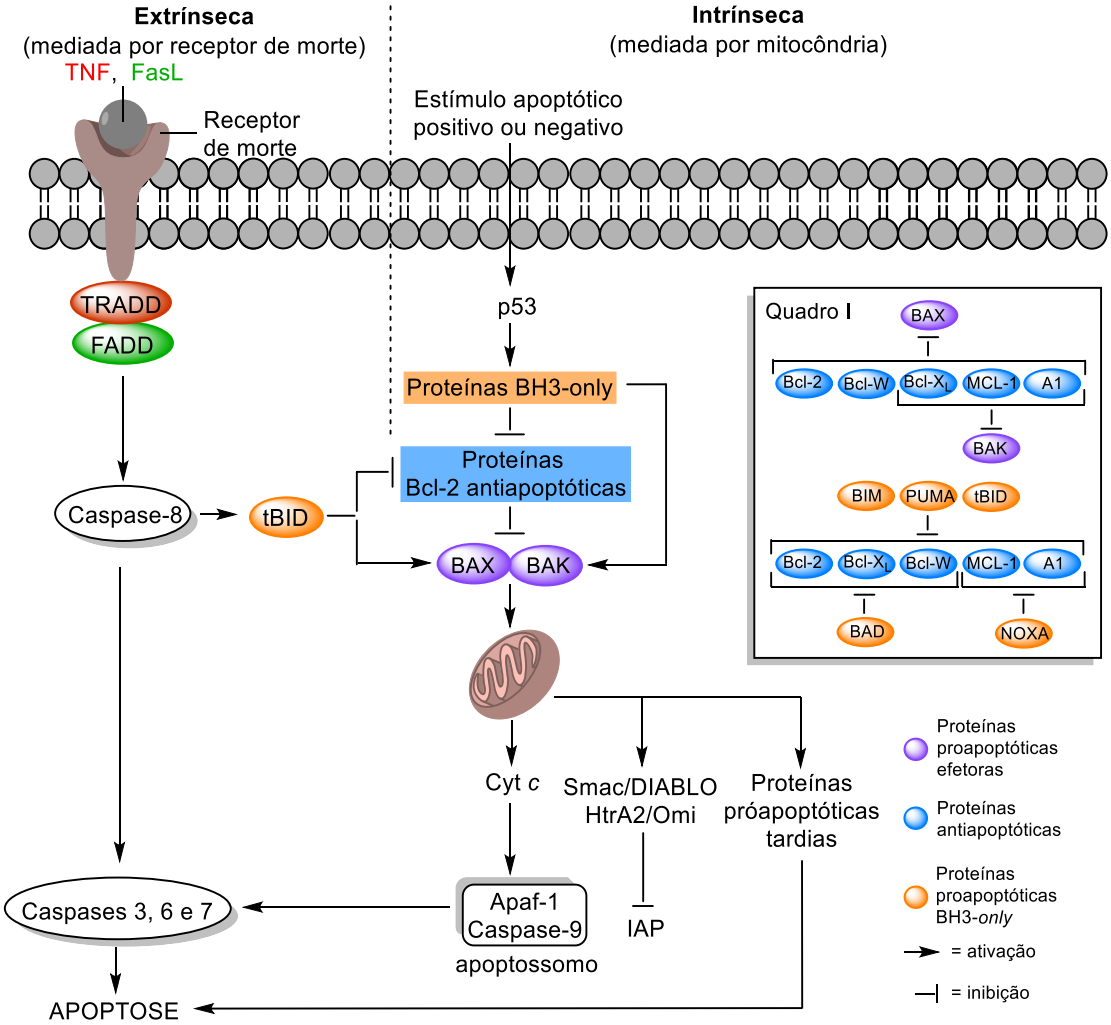


Figura 2. Diagrama simplificado dos mecanismos de apoptose. À esquerda da linha pontilhada é ilustrada a via extrínseca, mediada por receptor de morte. À direita da linha pontilhada é ilustrada a via intrínseca, na qual estão envolvidas proteínas da família Bcl-2. O quadro I apresenta as principais proteínas da família Bcl-2 (adaptado de FERNANDES, 2015).

A via intrínseca, ou via mitocondrial, de apoptose, é ativada por condições que podem agir de maneira positiva ou negativa. Sinais negativos envolvem a ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas inibidoras da morte programada. Outros estímulos, que atuam de forma positiva, incluem dano do DNA, espécies reativas de oxigênio (ROS), hipoxia, níveis diminuídos de ATP, e senescência

celular. Estes estímulos provocam alterações na membrana mitocondrial interna, resultando na abertura de poros permeáveis e liberação de proteínas proapoptóticas. Um primeiro grupo destas proteínas inclui o citocromo *c* (cyt *c*), que ativa Apaf-1 e procaspase-9, formando o “apoptossomo”. A partir da formação do apoptossomo, tem-se ativação de caspase 9, com consequente ativação de caspases efetoras. Smac/DIABLO e HtrA2/Omi, por sua vez, promovem apoptose pela inibição de IAP (proteínas inibidoras da apoptose), que modulam a atividade de caspases . O segundo grupo de proteínas proapoptóticas, que inclui AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), endonuclease G e CAD (*Caspase-Activated Deoxyribonuclease*) - proteínas proapoptóticas tardias - é liberado a partir da mitocôndria durante a apoptose, e causam fragmentação do DNA e condensação da cromatina (ELMORE, 2007; FUCHS; STELLER, 2015; PORTH; MATFIN, 2010).

A alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial que resulta na liberação de proteínas proapoptóticas é mediada pelos membros da família de proteínas Bcl-2, que podem ser indutores ou inibidores da apoptose. A proteína supressora de tumor p53 tem um papel crítico na regulação da família de proteínas Bcl-2, porém, os mecanismos exatos ainda não foram completamente elucidados. As proteínas da família Bcl-2 estão divididas em três subfamílias de acordo com sua função e similaridade de sequência de aminoácidos, a saber: proteínas proapoptóticas efetoras (BAX e BAK), proteínas proapoptóticas BH3-*only* (BID, BIM, PUMA, Noxa, HRK, BIK, BMF, BAD) e proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, MCL-1, A1, Bcl-b, Bcl-w), conforme mostra a figura 3 (CZABOTAR et al., 2014; LABI; ERLACHER, 2015; LOPEZ; TAIT, 2015; SUVARNA; SINGH; MURAHARI, 2019).

A permeabilidade da membrana mitocondrial externa se dá a partir das proteínas BAX e BAK. Geralmente, a ativação destas proteínas requer a sua interação com uma proteína do subtipo BH3-*only*, que causa uma alteração conformacional de BAX e BAK, levando à sua oligomerização na membrana mitocondrial. Estes oligomeros tornam a membrana mitocondrial permeável, possivelmente de forma indireta, pela indução de poros lipídicos, ou diretamente, pela formação de poros, propriamente. A abertura destes poros permite, então, o extravasamento de proteínas proapoptóticas, como citocromo *c* (JENG; CHENG,

2013). As proteínas da família BH3-*only* podem ser subdivididas em ativadoras (ativam diretamente BAX/BAK) ou sensibilizadoras (neutralizam a ação antiapoptótica das proteínas Bcl-2) (CZABOTAR et al., 2014; SUVARNA; SINGH; MURAHARI, 2019).

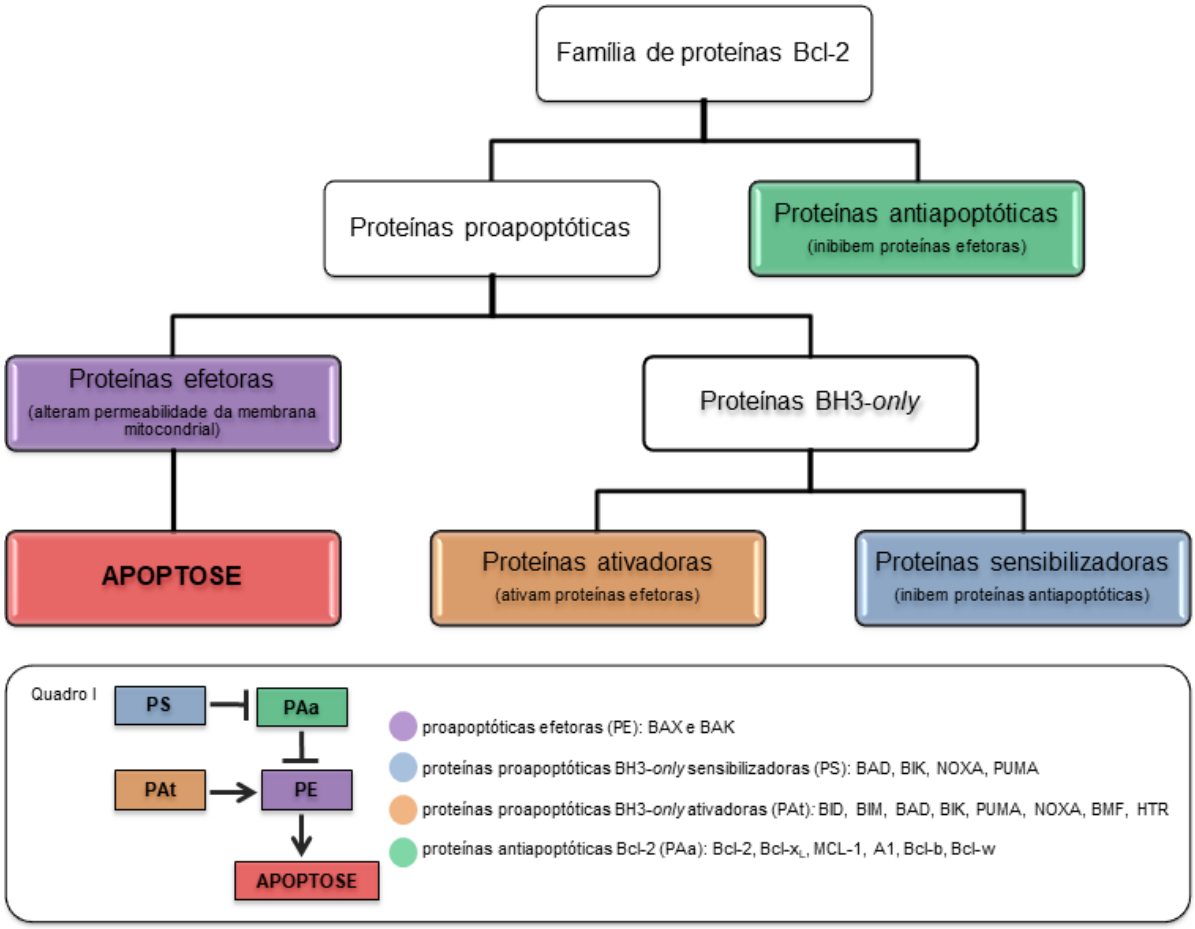


Figura 3. Representação esquemática das subfamílias de proteínas Bcl-2. O quadro I apresenta uma ilustração simplificada das relações entre as proteínas da família Bcl-2. Proteínas BH3-*only* ativadoras ligam-se às proteínas efetoras, causando uma alteração conformacional que leva à oligomerização de BAX e BAK na membrana mitocondrial, o que resulta na permeabilidade da mesma, com extravasamento de proteínas proapoptóticas (p. ex. citocromo *c*). Proteínas sensibilizadoras inibem a ação das proteínas antiapoptóticas sobre as proteínas efetoras (elaborada pelo autor).

Proteínas antiapoptóticas Bcl-2 têm sua ação baseada na inibição das proteínas proapoptóticas efetoras, ao se ligarem a estas e impedirem sua oligomerização. Proteínas inibidoras de morte estão superexpressas em diversos tipos de tumores, representando um mecanismo de evasão à apoptose e favorecendo resistência aos agentes antineoplásicos (ASHKENAZI et al., 2017; VOGLER et al., 2009). A superexpressão de Bcl-$X_{L,}$ particularmente, é reportada em cânceres de mama, próstata, pulmão, colorretal, melanoma e linfoma de células B (MENA et al., 2012; RAGHAV; VERMA; GANGENAHALLI, 2012) e níveis

aumentados desta proteína foram correlacionados com a redução da sensibilidade das células tumorais aos fármacos antineoplásicos (AMUNDSON et al., 2000; BROECKER-PREUSS et al., 2015; HOLOHAN et al., 2013; ZHOU et al., 2015).

Neste contexto, as proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 tornam-se alvo de estudo no desenvolvimento de antitumorais capazes de inibi-las (figura 4), a fim de favorecer a apoptose das células tumorais e contornar uma possível resistência apresentada por estas células aos agentes quimioterápicos (ADAMS; CORY, 2007; ASHKENAZI et al., 2017; BROECKER-PREUSS et al., 2015; HOLOHAN et al., 2013; KARPEL-MASSLER et al., 2015; KAZI et al., 2011).

Em geral, fármacos que atuam sobre estas proteínas baseiam seu efeito na inibição de proteínas antiapoptóticas mimetizando proteínas BH3-*only* sensibilizadoras (CZABOTAR et al., 2014). Vale salientar que embora existam fármacos em estudos clínicos que atuem inibindo proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, como navitoclax, AT-101 (gosssipol) e obatoclax, o venetoclax (figura 4) foi recentemente aprovado pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) como o primeiro fármaco com ação sobre Bcl-2, sendo o único representante da sua classe disponível na terapêutica atualmente (FDA, 2016; LIU; WANG, 2012; MULLARD, 2016).

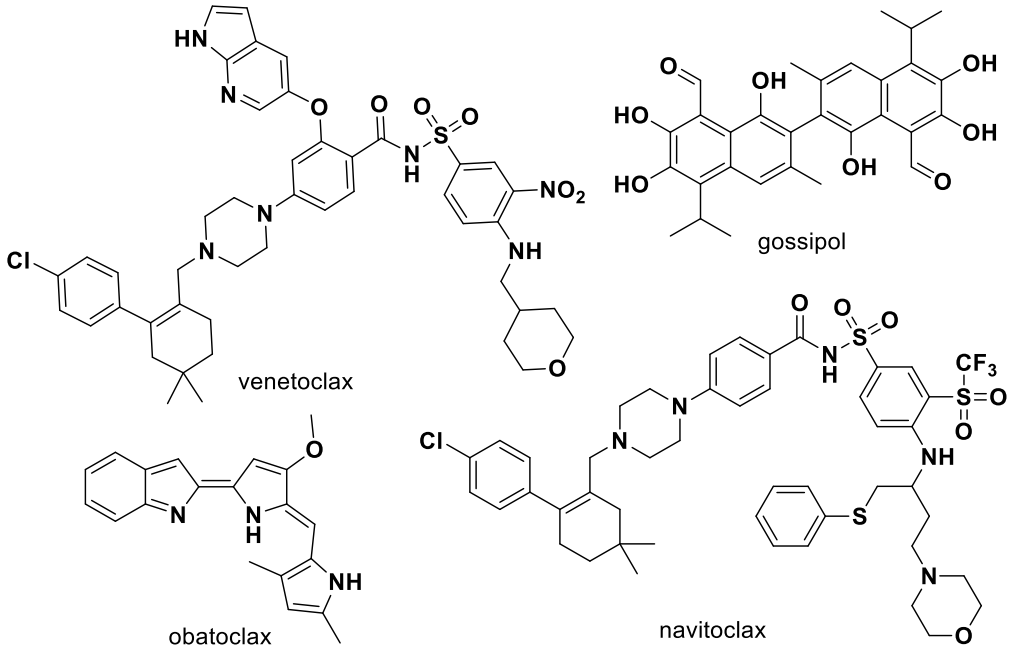


Figura 4. Fármacos inibidores de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 (OPYDO-CHANEK; GONZALO; MARZO, 2017).

2.3 TERAPIA ANTINEOPLÁSICA E PRODUTOS NATURAIS

Diversas estratégias são empregadas no tratamento do câncer, incluindo intervenção cirúrgica e radioterapia para o tratamento loco-regional, e hormonioterapia e quimioterapia para o tratamento sistêmico (BRASIL, 2015; INCA; CEDC, 2012). Neste contexto, a quimioterapia adquire particular relevância pelo seu emprego na doença metastática e em tumores não-sólidos. Entretanto, os quimioterápicos disponíveis na terapêutica mostram-se muito tóxicos e pouco seletivos, e muitos tumores podem exibir ou desenvolver resistência aos antineoplásicos existentes, trazendo a necessidade de se desenvolver novos antineoplásicos mais eficazes e seguros (BRANDÃO et al., 2010; GARRAWAY; JÄNNE, 2012; MACHADO; SAWADA, 2008).

No desenvolvimento de novos fármacos, os produtos naturais representam uma fonte importante de novos compostos bioativos. No período de 1940 a 2014, cerca de 25% de todas as novas entidades químicas aprovadas pelo FDA correspondem a fármacos de origem natural. No que se refere ao câncer, 49 % dos fármacos aprovados neste período são de origem natural ou moléculas diretamente derivadas destes, o que reforça a relevância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos contra o câncer (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A descoberta de novos antineoplásicos de origem natural tem incentivado as pesquisas nessa área. A camptotecina,alcaloides da vinca e produtos naturais de outras naturezas químicas, como etoposídeo e paclitaxel (figura 5), são fármacos importantes e bastante empregados no tratamento do câncer (BARREIRO; BOLZANI, 2009; BRANDÃO et al., 2010; BROWN et al., 2010).

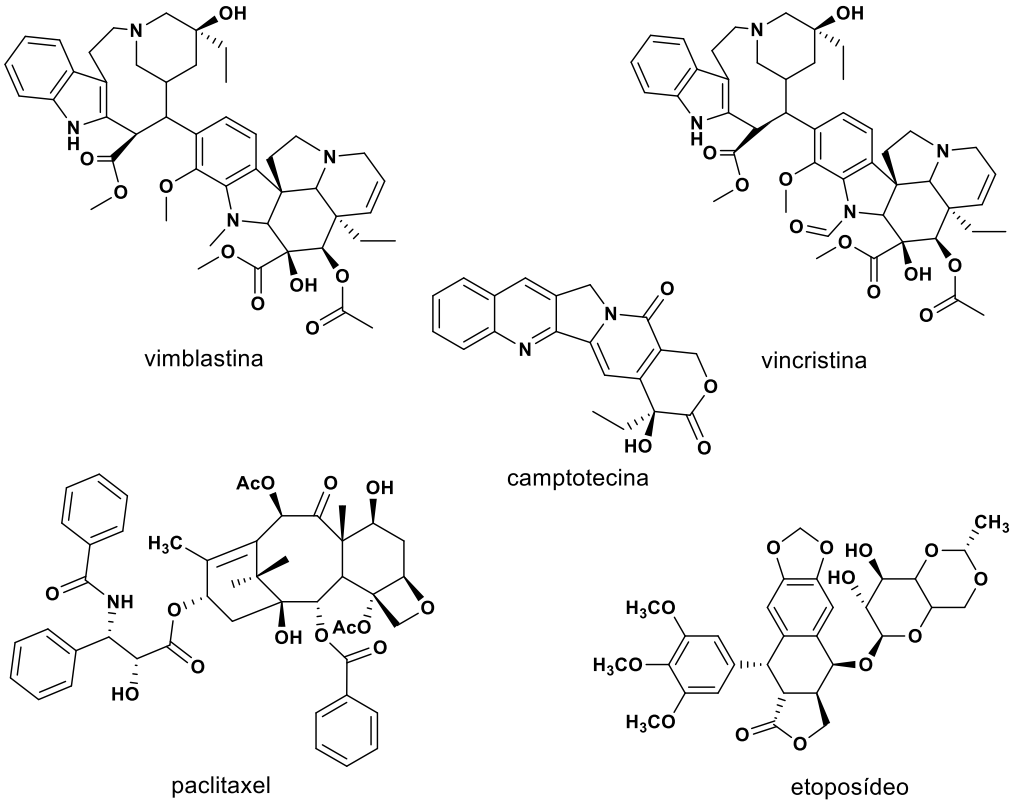


Figura 5. Estruturas de antineoplásicos de origem natural (BRANDÃO *et al*. 2010).

Embora o venetoclax, de origem sintética, seja atualmente o único inibidor de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, inibidores de Bcl-x_L de origem natural também têm sido submetidos a ensaios clínicos. O gossipol (figura 4), um polifenol extraído de semente de algodão, é capaz de inibir proteínas antiapoptóticas e chegou à fase 2 de estudos clínicos em pacientes com glioblastoma multiforme e à fase 3 em pacientes com câncer de pulmão (NIC, 2017; TMMSU, 2013).

Alcaloides também têm sido estudados quanto à sua capacidade de inibir proteína Bcl-x_L, particularmente o alcaloide benzofenantridínico sanguinarina (figura 6). A sanguinarina, bem como outros alcaloides da classe, apresenta atividade frente a diversas linhagens tumorais, e se encontra como uma das benzofenantridinas mais estudadas e relevantes (DENG; QIN, 2010; SLANINOVÁ et al., 2007, 2014; YU et al., 2014).

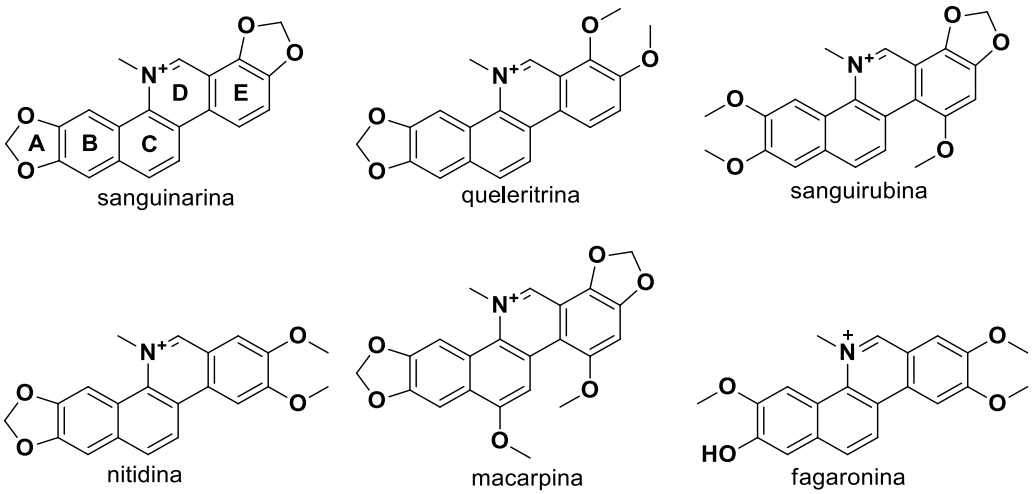


Figura 6. Estrutura química da sanguinarina (destacando os anéis **A**, **B**, **C**, **D** e **E**) e outros alcaloides benzofenantridínicos com atividade citotóxica.

A sanguinarina é encontrada em diversas famílias de plantas medicinais, como *Papaveraceae*, *Fumariaceae*, *Rutaceae* e em plantas específicas como *Sanguinaria canadensis, Bocconia frutescens, Chelidonium majus* e *Macleaya cordata*. Este alcaloide apresenta propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidante e anti-inflamatórias (CROAKER et al., 2016; KUMAR; HAZRA, 2014; LI et al., 2014b; PARHI et al., 2012). Sua atividade frente a linhagens tumorais também tem sido bastante estudada e já foi verificada em linhagens de cânceres como de próstata (ADHAMI et al., 2004; SUN et al., 2010), pâncreas (AHSAN et al., 2007), pulmão (JANG et al., 2009), leucemia (ABURAI et al., 2010), mama (DEBITON et al., 2003), cervival (SLANINOVÁ et al., 2007), melanoma (HAMMEROVÁ et al., 2011) e glioblastoma (SAEED et al., 2018).

O efeito citotóxico da sanguinarina foi relacionado com diferentes alvos e mecanismos, que incluem intercalação em DNA (DE STEFANO et al., 2009) e inibição de di-idrofolato redutase (SUN et al., 2010). Adicionalmente, a sanguinarina induz produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), promovendo apoptose tanto pela via extrínseca como intrínseca e interferindo na regulação de uma gama de proteínas envolvidas nestas vias (KOCK; SMITH; CHIBALE, 2017), como AKT (CHOI et al., 2009), NF-κB (GUPTA et al., 2010), caspases (JANG et al., 2009; KIM et al., 2008), XIAP e cIAP-1 (CHOI et al., 2008), além de modular a expressão de proteínas da família Bcl-2 (AHSAN et al., 2007; GUPTA et al., 2010; HAN; YOO; CHOI, 2008; ZHANG et al., 2014, 2015).

A atividade inibidora de Bcl-x_L pela sanguinarina também foi verificada na faixa de 19 µM, representando um mecanismo importante para o seu efeito citotóxico e que merece ser explorado (BERNARDO et al., 2008; ZHANG et al., 2006). Entretanto, a sanguinarina, bem como outros alcaloides da classe, apresenta toxicidade frente a células tumorais bem como não tumorigênicas (tabela 1), inviabilizando seu uso na terapêutica e trazendo a necessidade de se otimizar sua estrutura no que se refere à seletividade (MALÍKOVÁ et al., 2006; SLANINOVÁ et al., 2007).

Tabela 1. Valores de IC_{50} referentes à sanguinarina frente a diferentes linhagens tumorais.

Linhagem	IC_{50} (µM)	Rerefência
Leucemia promielocítica humana (HL60)	0,37 0,92	ABURAI et al., 2010 SLANINOVÁ et al., 2007
Adenocarcinoma de mama humano (MCF-7)	3,30 4,40	DEBITON et al., 2003 MATKAR et al., 2008
Melanoma maligno humano (A-375)	1,18	HAMMEROVÁ et al., 2011
Adenocarcinoma cervical humano (HeLa)	2,00	SLANINOVÁ et al., 2007
Glioblastoma multiforme (U87MG)	2,60	SAEED et al., 2018
Queratinócitos epidermais humanos (NHEKs)	10,00	AHMAD et al., 2000
Fibroblastos gengivais humanos (GF)	1,20	(MALÍKOVÁ et al., 2006)
Fibroblastos de pele (KF-II)	1,00	SLANINOVÁ et al., 2007

Em vista dos efeitos dos alcaloides benzofenantridínicos frente ao câncer, análogos sintéticos têm sido desenvolvidos e avaliados quanto seu potencial antitumoral (tabela 2), com o intuito de se obter compostos mais ativos e seguros e/ou estabelecer uma relação estrutura-atividade (BERNARDO et al., 2008; CAO et al., 2015; CHO et al., 2002; ISHIKAWA et al., 2011; JANIN et al., 1993; KOCK et al., 2005; MAKHEY et al., 2003; PRADO et al., 2004; ŞERBETÇI et al., 2010; YANG et al., 2016).

Tabela 2. Estruturas de análogos planejados a partir de alcaloides benzofenantridínicos e seus respectivos valores de atividade biológica.

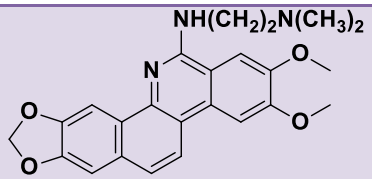
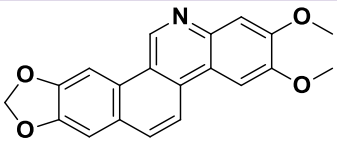
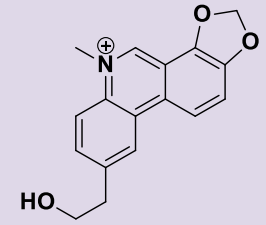
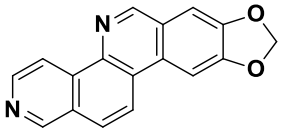
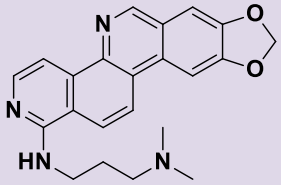
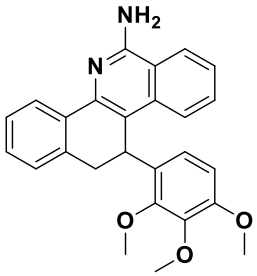
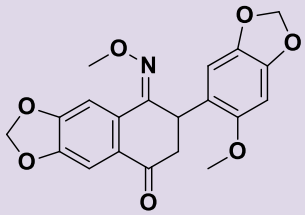
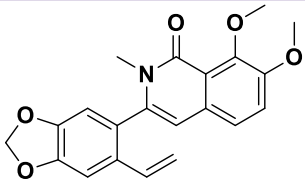
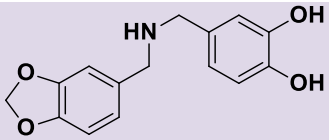
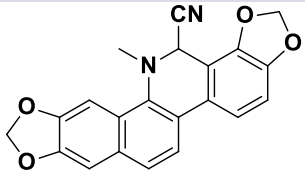
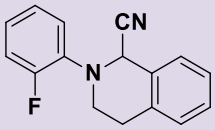
Estrutura	linhagem celular ou alvo	IC_{50} (µM)	Referência
	L1210 (leucemia linfocítica)	0,30	JANIN et al., 1993
	RPMI-8402 (leucemia linfoblástica aguda)	4,50	MAKHEI et al., 2003

Tabela 2. Estruturas de análogos planejados a partir de alcaloides benzofenantridínicos e seus respectivos valores de atividade biológica (continuação).

Estrutura	linhagem celular ou alvo	IC_{50} (µM)	Referência
	Bcl-x_L	3,0	BERNARDO et al., 2008
	L1210 (leucemia linfocítica)	4,40	PRADO et al., 2004
	L1210 (leucemia linfocítica)	0,29	SERBETÇI et al., 2010
	CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda)	21,42	KOCK et al., 2005
	HeLa (adenocarcinoma cervial)	0,10	ISHIKAWA et al., 2011
	A549 (carcinoma de pulmão)	0,03	CHO et al., 2002
	A549 (carcinoma de pulmão)	112,29	YANG et al., 2016
	NB4 (leucemia promielocítica aguda)	0,53	CAO et al., 2015
	NB4 (leucemia promielocítica aguda)	0,62	CAO et al., 2015

Com base nos estudos encontrados (tabela 2) é possível verificar que, em geral, os análogos mantêm o núcleo benzofenantridínico ou núcleos semelhantes com quatro anéis, explorando substituições principalmente nas posições *meta* e *para* da porção correspondente ao anel **E**. Ademais, observa-se que tais estudos, em sua maioria, apresentam resultados baseados em ensaios de citotoxicidade, havendo poucas informações disponíveis a respeito do potencial de análogos benzofenantridínicos como inibidores de Bcl-x_L e da relação estrutura-atividade envolvida nesta propriedade (JANIN et al., 1993; MAKHEY et al., 2003; PRADO et al., 2004; ŞERBETÇI et al., 2010).

Neste sentido, a proposta de novos análogos dos alcaloides benzofenantridínicos empregando-se estratégias de modificação molecular como a introdução de substituintes em diversas posições dos aneis e a simplificação da estrutura em outras regiões pode ser promissora na identificação de novos compostos com potencial antitumoral, especialmente com propriedade de inibir Bcl-x_L.

2.4 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS E SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR

No desenvolvimento de terapias para o tratamento das doenças, diversos métodos podem ser empregados, que vão desde a terapia gênica, até o uso de HTS (*High Throughput Screening*, ou Triagem de Alta Demanda) para a descoberta de compostos bioativos. Apesar do avanço e desenvolvimento de vários métodos, ainda hoje o planejamento racional de fármacos, auxiliado por computador, mostra-se uma ferramenta bastante empregada e bem-sucedida (APAROY; REDDY; REDDANNA, 2012; LEE; HUANG; JUAN, 2011; LEMKE; WILLIAMS, 2012).

Neste contexto, duas importantes abordagens podem ser utilizadas. Para tanto, em primeira instância, torna-se necessário elencar-se uma doença como objeto de estudo. A partir disto, conhecendo-se a estrutura tridimensional de um determinado alvo macromolecular envolvido na fisiopatologia da doença (p. ex. enzima ou receptor), é possível realizar o planejamento de fármacos baseado na estrutura (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*), que consiste no desenvolvimento de compostos planejados por complementariedade molecular ao alvo

macromolecular, mais especificamente ao seu sítio de ação (APAROY; REDDY; REDDANNA, 2012; LEE; HUANG; JUAN, 2011; LEMKE; WILLIAMS, 2012).

Na ausência da estrutura tridimensional do receptor, ou combinado com SBDD, pode ser utilizado o planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*). Nesta abordagem, o planejamento de novos compostos ativos é realizado a partir de ligantes já existentes com atividade biológica conhecida, que são utilizados como modelo para a realização de modificações moleculares e desenvolvimento de novos compostos. Abordagens de similaridade molecular, relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) e modelos farmacofóricos são métodos frequentemente empregados no processo de LBDD, que podem fornecer modelos preditivos para a identificação de moléculas com atividade biológica, bem como a otimização de suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas e segurança (ACHARYA et al., 2011; BARREIRO; FRAGA, 2014; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; LEMKE; WILLIAMS, 2012).

Uma vez que nem sempre o composto ativo obtido a partir do planejamento racional de fármacos apresenta propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas apropriadas ou possui limitações relacionadas ao seu isolamento ou síntese (especialmente no que se tange aos produtos naturais), tornam-se necessárias novas modificações moleculares. O composto em questão pode então ser otimizado por modificações moleculares subsequentes (BARREIRO; FRAGA, 2014; CHEN et al., 2015; DI, 2015).

Na seleção do protótipo, os produtos naturais podem fornecer estruturas promissoras ao desenvolvimento de compostos bioativos. Entretanto, estes frequentemente caracterizam-se por uma estrutura complexa e de difícil obtenção por meios sintéticos. No processo de otimização, estratégias de simplificação molecular podem ser empregadas a fim de se obter análogos potencialmente ativos, com melhor perfil farmacocinético, farmacodinâmico, e com estruturas de síntese mais simples (BARREIRO, 2002; CHEN et al., 2015; LEE, 2010; WERMUTH, 2008).

A simplificação molecular consiste na modificação de um protótipo, preservando a atividade biológica e reduzindo seu padrão de complexidade molecular a partir da remoção de grupos excedentes ou toxicofóricos. Esta

estratégia é útil para elucidação do grupo farmacofórico, por meio de “dissecação molecular”, onde funções, elementos estruturais ou anéis são removidos da molécula. Desta forma, é possível determinar quais seriam as porções da molécula essenciais ou não para a atividade biológica (BARREIRO, 2002; CHEN et al., 2015; LEE, 2010; WERMUTH, 2008). Como exemplo, a aplicação da simplificação molecular na morfina, alcaloide precursor dos analgésicos da classe das 4-fenilpiperidinas, permitiu identificar a petidina como grupo farmacofórico clássico dos analgésicos opiáceos (figura 7A) (BARREIRO, 2002).

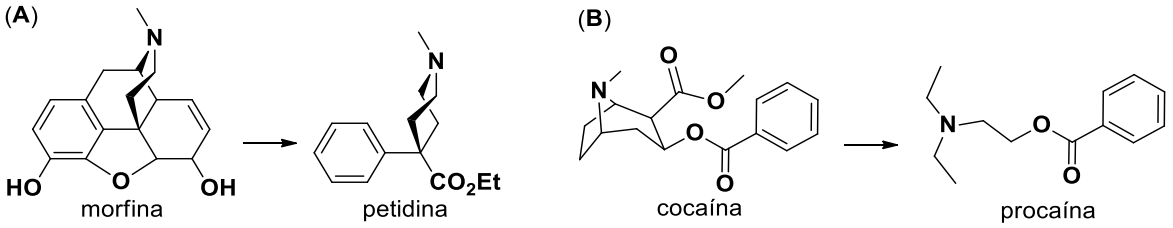


Figura 7. Simplificação molecular no planejamento de fármacos. (**A**) Identificação da petidina como grupo farmacofórico dos analgésicos opiáceos, a partir da simplificação molecular da morfina. (**B**) Obtenção da procaína a partir da simplificação molecular da cocaína.

A cocaína é um alcaloide que foi utilizado como anestésico tópico em cirurgias nasais e oculares, porém sua ação vasoconstritora, toxicidade cardiovascular e uso como droga de abuso limitou seu uso. A simplificação molecular da cocaína deu origem a anestésicos locais sintéticos, como a procaína (figura 7B), mais seguros e menos tóxicos (GUO, 2017).

A partir do processo de simplificação molecular, é possível estabelecer a relação entre a estrutura química e a atividade biológica desempenhada por uma molécula, direcionando as modificações moleculares ideais à otimização da mesma e, por meio delas, fundamentar o planejamento de novas substâncias que possuam perfil terapêutico mais adequado às necessidades atuais. Ademais, a simplificação molecular frequentemente fornece compostos de obtenção sintética facilitada em comparação com o protótipo, além de permitir a remoção de grupos toxicofóricos. Tendo isto em vista, estratégias de simplificação molecular tornam-se interessantes no planejamento de análogos de produtos naturais como os alcaloides benzofenantridínicos (BARREIRO; FRAGA, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Diante da relevância epidemiológica do câncer e dos problemas relacionados à quimioterapia convencional, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar análogos da sanguinarina planejados por simplificação molecular, obtendo-se compostos com potencial antitumoral e de síntese química facilitada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Sintetizar análogos *N*-benzil-naftil-amínicos, aril-isoquinolínicos e benzofenantridínicos (item 3.3.);

b) Avaliar o potencial antitumoral dos análogos sintetizados a partir de ensaios de citotoxicidade em linhagens tumorais de glioblastoma multiforme (U87MG) com superexpressão de Bcl-x_L, e fibroblasto humano fetal de pulmão (MRC-5), não tumorigênico, além de realizar estudos do mecanismo de indução de morte celular;

c) Realizar estudos de modelagem molecular para determinação de propriedades físico-químicas e proposição de um perfil de interação entre os compostos sintetizados e a proteína Bcl-x_L, a fim de correlacionar a estrutura química com a atividade biológica por eles desempenhada, fornecendo informações relevantes ao planejamento de novos compostos. Adicionalmente, com base em propriedades físico-químicas calculadas, realizar predição *in silico* do perfil farmacocinético dos compostos.

As informações relacionadas a cada um destes objetivos (introdução, métodos, resultados e discussão) estão agrupadas nos seus respectivos tópicos no corpo do trabalho, a saber: 4 – Síntese dos análogos da sanguinarina; 5 – Avaliação biológica *in vitro*; 6 – Modelagem molecular.

3.3 PLANEJAMENTO DOS ANÁLOGOS E MODIFICAÇÕES MOLECULARES

Utilizando-se o alcaloide benzofenantridínico sanguinarina como protótipo, foram propostas três séries de análogos planejados por simplificação molecular, a

saber: série *N*-benzil-naftil-amina (I), série aril-isoquinolina (II) e série benzofenantridina (III) (figura 8). Para cada série, foram propostos dez análogos, totalizando trinta compostos.

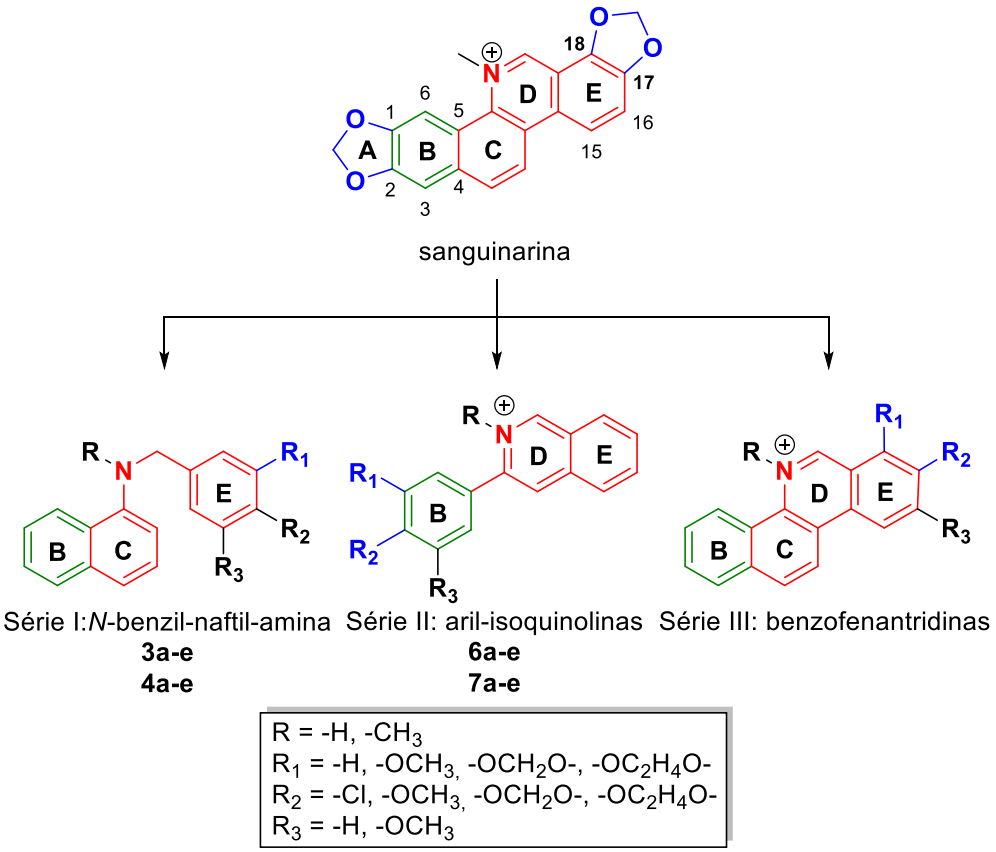


Figura 8. Simplificação molecular da sanguinarina, originando as séries de análogos *N*-benzil-naftil-amínicos, aril-isoquinolínicos e benzofenantridínicos. A porção fenantridina é composta dos anéis **C**, **D** e **E** (vermelho). O núcleo benzofenantridínico, característico dos alcaloides da classe, corresponde à fusão da fenantridina ao anel **B** (verde).

Na simplificação molecular para a obtenção dos compostos das séries I (*N*-benzil-naftil-aminas) e II (aril-isoquinolinas) aplicou-se abertura de anel, como intuito de verificar a relevância destes anéis e da rigidez da molécula para a atividade biológica bem como reduzir o número de etapas sintéticas. Diferentes padrões de substituição nos anéis aromáticos foram aplicados, além da substituição no nitrogênio com um grupo metil.

No que se refere à série *N*-benzil-naftil-amina, observa-se que a abertura do anel que contém o nitrogênio foi pouco explorada, sendo encontrados análogos com o grupo oxima-metil-éter em detrimento do nitrogênio aromático (ISHIKAWA et al., 2011). Adicionalmente, análogos derivados da amina têm sido reportados quanto à sua atividade citotóxica e citostática (YANG et al., 2016).

Análogos aril-isoquinolínicos e tetraidroisoquinolínicos são reportados na literatura, porém com a introdução de um único substituinte nos anéis aromáticos nas posições *orto*, *meta* ou *para* (CHO et al., 2002). Uma vez que tais análogos apresentaram efeito citotóxico, a exploração deste grupo foi considerada promissora na identificação de novos compostos, mais ativos. Ademais, os análogos aril-isoquinolínicos também foram avaliados quanto a influência da carga positiva no nitrogênio.

São relatados na literatura análogos benzofenantridínicos que não possuem o grupo benzodioxol na posição 1-2 e apresentaram atividade superior ao protótipo, dependendo do substituinte nas posições 16, 17 e 18 (BERNARDO et al., 2008). Neste contexto, na série III almejou-se avaliar o efeito da introdução de diferentes grupos substituintes (funções oxigenadas, grupos alquílicos e halogênios) nas posições 15, 16 e 17, uma vez que estudos mostram que a variação de grupos nas posições 16 e 17 podem fornecer compostos ativos (CHO et al., 2002; JANIN et al., 1993; MAKHEY et al., 2003). Adicionalmente, influência da carga positiva do nitrogênio na atividade biológica também é um fator a ser verificado.

4 SÍNTESE DOS ANÁLOGOS DA SANGUINARINA

Todos os experimentos sintéticos foram realizados no Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas (LAPESSB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). O detalhamento dos métodos de síntese e purificação encontra-se na “parte experimental” e a caracterização dos compostos consta no item “anexos”.

4.1 *N*-BENZIL-NAFTIL-AMINAS

4.1.1 Introdução

N-benzil-naftil-aminas consistem em aminas secundárias, que podem ser obtidas através de diferentes métodos, como por exemplo alquilação de aminas primárias e redução de amidas (CHADWICK et al., 2014; HANADA et al., 2009; WETZEL et al., 2013). Entretanto, o procedimento clássico e geralmente preconizado consiste na aminação redutiva. Neste tipo de método, intermediários imínicos são formados da reação de adição-eliminação (condensação) entre uma amina e um aldeído (GUZEN et al., 2007). A ligação dupla das iminas é reduzida para obtenção das aminas secundárias, frequentemente utilizando-se um boridreto (GARAY et al., 2014).

A obtenção da imina se dá, basicamente, pela formação da ligação dupla entre o nitrogênio da amina com a carbonila do aldeído (**1**), conforme ilustrado na figura 9. Em geral, é descrita a necessidade de catálise ácida para a formação da imina (**2**). Sem um catalisador ácido, a reação seria muito lenta, uma vez que este é necessário para a eliminação de água nas etapas tardias da reação. Entretanto, o uso de ácido muito forte pode protonar completamente a amina, comprometendo sua nucleofilicidade (MCMURRY, 2011). Neste sentido, a literatura clássica descreve o uso de ácido fraco, que pode ser substituído pelo uso de solvente prótico (DIKUSAR; KOZLOV, 2006; GHOSH; RATHI; KUSHWAHA, 2013; GUZEN et al., 2007; SHARMA et al., 2006; ZHIKHARKO; KOZLOV; BASALAEVA, 2012).

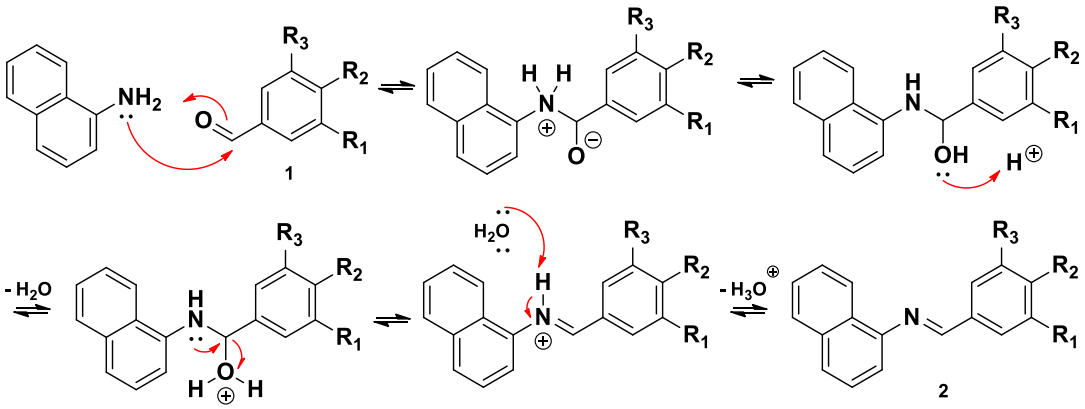


Figura 9. Mecanismo de formação da imina por adição à carbonila com eliminação de água.

A imina (**2**) obtida da reação de condensação é então reduzida à amina (**3**) através de um agente redutor. A figura 10, a seguir, ilustra o mecanismo reacional envolvido na redução da imina, com o uso de boridreto (EVANS; CHAPMAN; CARREIRA, 1988).

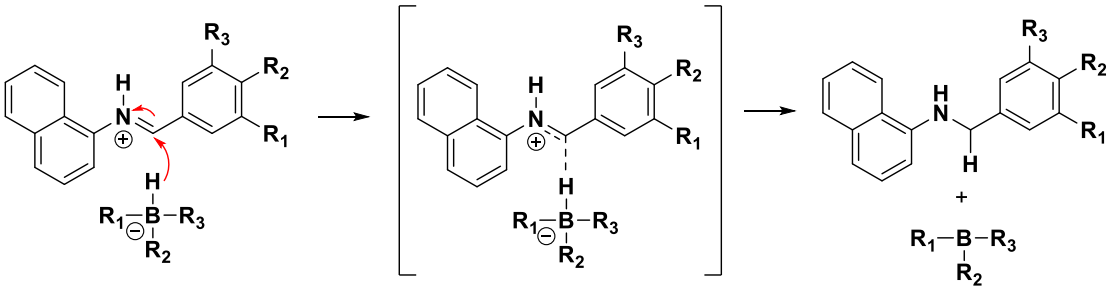
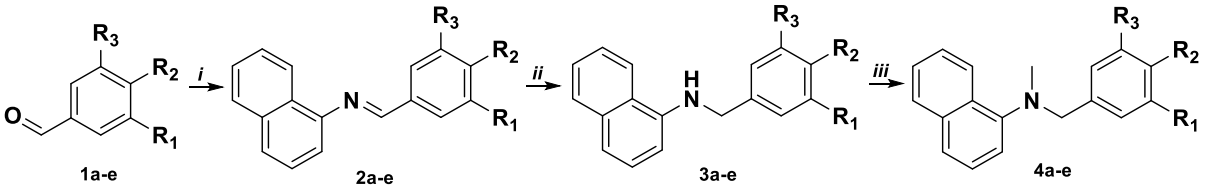


Figura 10. Mecanismo de formação da amina secundária por redução de imina, empregando boridreto como agente redutor.

Reações de aminação redutiva podem se dar de forma indireta, pelo isolamento da imina com posterior redução, em etapas reacionais isoladas, ou de maneira direta, onde as etapas de formação da imina e sua redução são processadas em uma reação *one-pot* (CHO; SANG, 2005). As duas abordagens são amplamente descritas na literatura e podem ser empregadas na síntese de aminas.

4.1.2 Método

A síntese das *N*-benzil-naftil-aminas se deu por método de aminação redutiva indireta, em duas etapas reacionais, para a obtenção dos análogos **3a**-**e**. Estes foram submetidos a uma terceira reação, de aminação redutiva direta, para a síntese dos análogos *N*-metilados **4a**-**e**, conforme ilustrado na figura 11.



1a: R_1 = R_3 = H; R_2 = OCH_3
1b: R_1 = R_2 = OCH_3; R_3 = H
1c: R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3
1d: R_1 = R_2 = -OCH_2O-; R_3 = H
1e: R_1 = R_3 = H; R_2 = Cl

2a: R_1 = R_3 = H; R_2 = OCH_3
2b: R_1 = R_2 = OCH_3; R_3 = H
2c: R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3
2d: R_1 = R_2 = -OCH_2O-; R_3 = H
2e: R_1 = R_3 = H; R_2 = Cl

3a: R_1 = R_3 = H; R_2 = OCH_3
3b: R_1 = R_2 = OCH_3; R_3 = H
3c: R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3
3d: R_1 = R_2 = -OCH_2O-; R_3 = H
3e: R_1 = R_3 = H; R_2 = Cl

4a: R_1 = R_3 = H; R_2 = OCH_3
4b: R_1 = R_2 = OCH_3; R_3 = H
4c: R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3
4d: R_1 = R_2 = -OCH_2O-; R_3 = H
4e: R_1 = R_3 = H; R_2 = Cl

Reagentes e condições: (***i***) 1-naftil-amina (1 eq.) MeOH, t.a. (***ii***) $NaBH_4$ (5 eq.), THF/EtOH (1:1), t.a. (***iii***) HCHO (10 eq.), CH_3COOH (2 eq.), $NaBH_3CN$ (1,5 eq.) MeCN, 0 - 21 ºC.

Figura 11. Rota sintética para obtenção da série *N*-naftil-benzil-amina.

A síntese desta série de análogos se inicia pela condensação entre o benzaldeído substituído e naftil-amina (*i*), para obtenção de intermediários *N*-benzil-naftil-imínicos (GARAY et al., 2014). Estes foram reduzidos a amina secundária (**3**) por aminação redutiva, empregando-se $NaBH_4$ (*ii*). A reação de *N*-metilação se deu pela reação com formaldeído e redução com $NaBH_3CN$ (*iii*).

4.1.3 Resultados e discussão

Conforme proposto, dez análogos *N*-naftil-benzil-amínicos foram sintetizados, dos quais cinco são aminas secundárias e cinco são aminas terciárias (tabela 3). Com exceção do composto **4b**, as aminas terciárias são moléculas inéditas. Os rendimentos para cada uma das etapas reacionais foram apreciáveis, refletidos em rendimentos globais entre 28 e 76 %. Divergências entre os redimentos obtidos e aqueles encontrados na literatura podem estar relacionadas a diferenças nos métodos de síntese e purificação para cada molécula. O maior rendimento reportado (98 %, composto **3c**) foi encontrado por Garay e colaboradores (2014), que utilizaram aminação redutiva indireta, com $NaBH_4$ como agente redutor, método empregado neste trabalho. Moreno e colaboradores (2011), por sua vez, obtiveram um rendimento de 89 % (**3b**) através de aminação redutiva direta com $NaBH_3CN$.

Com exceção de **4d**, os compostos sintetizados se apresentaram como sólidos de cores variadas. As faixas de fusão encontram-se em temperaturas que variam de 63 – 128 ºC e, próximos aos valores encontrados na literatura. As faixas de fusão não excederam o limite de 2 ºC, indicando provável pureza do produto, que foi corroborada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nesta, verificou-se pureza superior a 95 %, e, portanto, os compostos foram considerados apropriados para serem submetidos a ensaios biológicos.

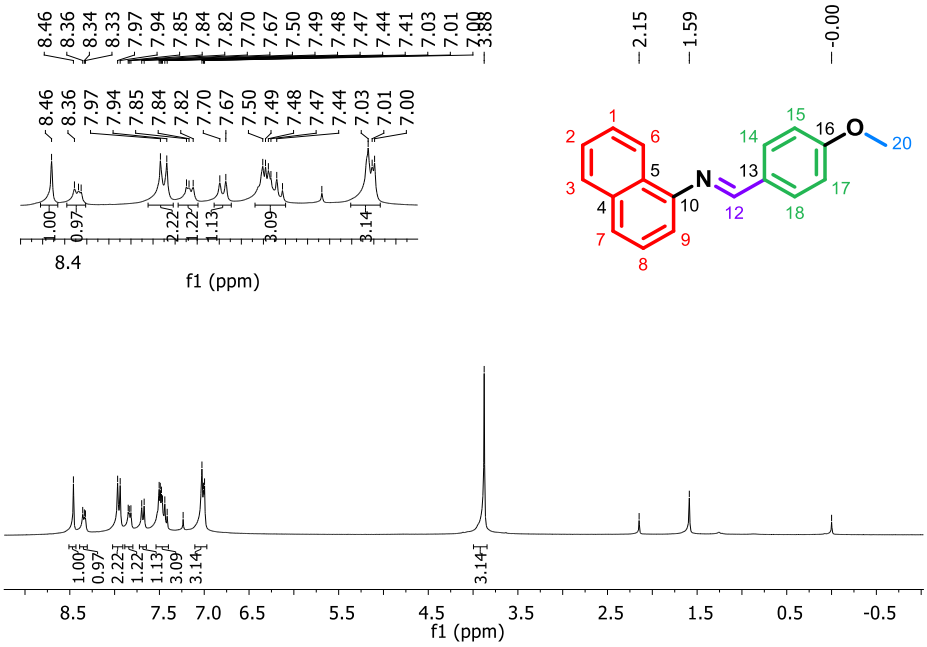
Tabela 3. Resultados obtidos na síntese e caracterização dos análogos *N*-naftil-benzil-amínicos. Os substituintes **R**, $\mathbf{R_1}$, $\mathbf{R_2}$ e $\mathbf{R_3}$ na molécula encontram-se orientados conforme ilustrado na figura 11.

Composto	R	R_1	R_2	R_3	Aspecto físico	CLAE	Faixa de fusão (ºC)		η_i (%)	η_{ii} (%)	η_{iii} (%)	η_G (%)	η_L (%)
							Experimental	*Literatura					
3a	H	H	OCH_3	H	Sólido branco	t = 12,8 min pureza > 99%	72 – 73	67 – 80[1,2,3]	94	81	-	76	56 – 88[1,3]
3b	H	OCH_3	OCH_3	H	Sólido amarelo claro	t = 12,1 min pureza > 99%	122 – 124	124 – 126[4]	77	79	-	60	89[4]
3c	H	OCH_3	OCH_3	OCH_3	Sólido branco	t = 12,6 min pureza > 99%	126 – 128	-	87	84	-	73	98[7]
3d	H	$-OCH_2O-$		H	Sólido laranja claro	t = 12,1 min pureza > 99 %	n.d.	65 – 67[2]	72	60	-	43	-
3e	H	H	Cl	H	Sólido laranja claro	t = 13,6 min pureza > 99%	71 – 73	75 – 76[2,5]	88	85	-	75	56 – 82[5,8]
4a	CH_3	H	OCH_3	H	Sólido branco	t = 10,7 min pureza > 99%	63 – 65	-	94	81	79	60	-
4b	CH_3	OCH_3	OCH_3	H	Sólido branco	t = 10,1 min pureza > 99%	81 – 83	64 – 66[6]	77	79	69	42	69[4]
4c	CH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	Sólido branco	t =9,7 min pureza > 95%	81 – 83	-	87	84	55	40	-
4d	CH_3	$-OCH_2O-$		H	Óleo laranja claro	t = 11,1 min pureza 95 %	n. d.	-	72	60	65	28	-
4e	CH_3	H	Cl	H	Sólido amarelo	t = 7,1 min pureza >97 %	n. d.	-	88	85	75	56	-

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **t**: Tempo de retenção com sistema eluente inicialmente com H_2O 100 % e ACN 0,1% TFA alcançando 100% em 10 minutos. **n.d.** = não determinado; η_i = rendimento obtido no procedimento ***i***; η_{ii} = rendimento obtido no procedimento ***ii***; η_{iii} = rendimento obtido no procedimento ***iii***; η_G = rendimento global; η_L = rendimento encontrado na literatura.
*****Menor e maior valores de temperatura de fusão encontrados na literatura. [1]LI et al., 2014a; [2]CROSSLEY et al., 1952; [3]ZECHMEISTER; TRUKA, 1930; [4]MORENO et al., 2001; [5]SLOVITER, 1949; [6]DE et al., 2013; [7]GARAY et al., 2014; [8]MUTHAYALA; KUMAR, 2012.

Na primeira etapa da reação, a purificação por métodos cromatográficos se mostrou ineficaz, mesmo com o uso de trietilamina na fase móvel. Isto pode estar relacionado ao fato de que os intermediários imínicos são instáveis e de difícil isolamento, dada a facilidade de hidrólise deste grupo funcional (MCMURRY, 2011). Entretanto, o uso de recristalização para a purificação, por sua vez, permitiu o isolamento das iminas **2a**-**e** e o prosseguimento da rota sintética.

A figura 12 apresenta o espectro de RMN ^{1}H do composto **2a**, tomado como exemplo para visualização geral dos sinais apresentados pelas *N*-naftil-benzil-iminas. A formação do análogo é verificada por um singleto em 8,46 ppm referente ao hidrogênio do carbono da imina (12-CH). Sinal referente aos hidrogênios da metoxila (20-CH_3) é observado em 3,88 ppm. Na faixa de 8,36 a 7,00 ppm verificam-se hidrogênios do anel naftalênico (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9-ArH) e da fenila (14, 15, 17, 18-ArH). Ademais, a ausência de sinal característico de aldeído, na faixa de 9,0 a 10,0 ppm, sugere a ausência de material de partida e corrobora os dados anteriores, que evidenciam a formação do produto (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

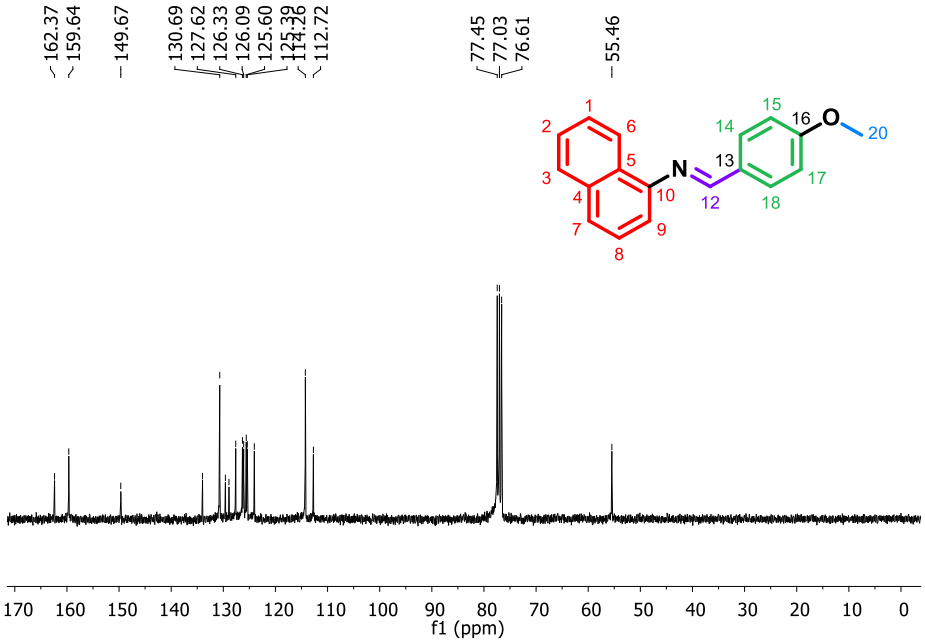


RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ **8,46** (s, 1H, 12-CH), **8,34** (t, 1H, *J* = 3,0 Hz, *J* = 9 Hz, 6-ArH), **7,95** (d, 2H, *J* = 9 Hz, 14, 18-ArH), **7,84** (t, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz, 3-ArH), **7,68** (d, 1H, *J* = 9 Hz, 7-ArH), **7,50-7,41** (m, 3H, 1, 2, 8-ArH), **7,03-7,00** (m, 3H, 9, 15, 17-ArH), **3,88** (s, 3H, 20-CH_3).

Figura 12. Espectro de RMN ^{1}H do composto **2a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-benzil-naftil-iminas. As cores na molécula ilustram os hidrogênios especificados para cada deslocamento químico. Roxo = hidrogênio da imina; vermelho = hidrogênios naftalênicos; verde = hidrogênios da fenila; azul = hidrogênios da metoxila.

Em relação ao espectro de carbono (figura 13), observa-se a ausência de sinal característico de carbonila de aldeído (entre 180 a 220 ppm). Embora carbonos de

iminas sejam encontrados na faixa de 110-140 ppm, o deslocamento do sinal em campo mais baixo (159,6 ppm) justifica-se pela ligação da imina diretamente a um anel aromático, que torna este carbono mais desblindado (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Ghosh e colaboradores (2013) encontraram deslocamentos químicos com valores próximos em seu estudo, onde foram sintetizadas aril-iminas com estruturas químicas semelhantes.

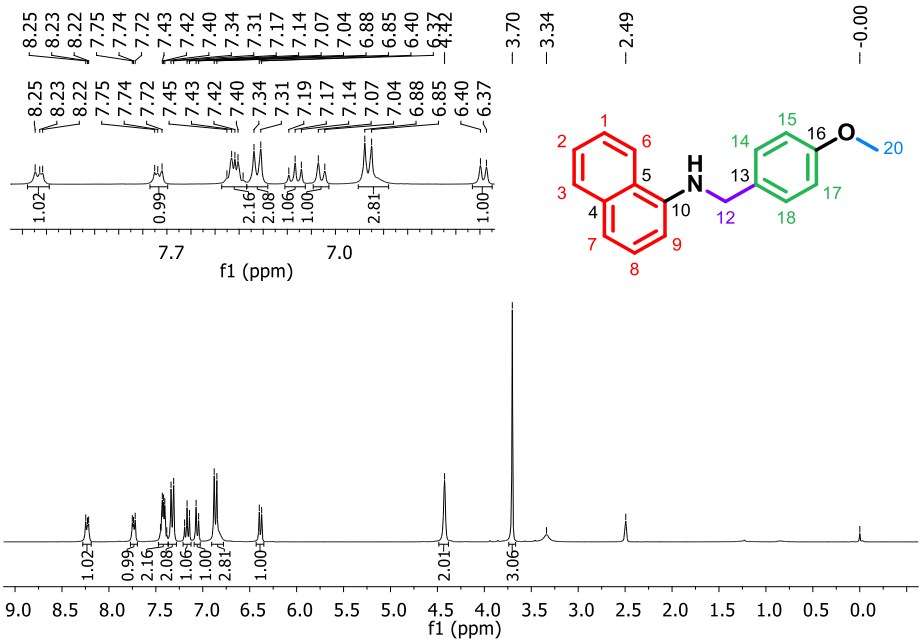


RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ **162,3** (C12), **159,6** (C16), **149,6** (C10), **133,9** (C4), **130,6** (C14, C18), **129,6** (C3), **128,9** (C5), **127,6** (C13), **126,3** (C7), **126,0** (C1), **125,6** (C8), **125,3** (C2), **124,0** (C6), **114,2** (C15, C17), **112,7** (C9), **55,4** (C20).

Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C do composto **2a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-benzil-naftil-iminas. As cores na molécula ilustram os carbonos especificados para cada deslocamento químico. Roxo = carbono da imina; vermelho = carbonos naftalênicos; verde = carbonos da fenila; azul = carbono da metoxila.

Para a obtenção das aminas secundárias **3a-e** (etapa ***ii***), a mistura de solventes foi importante por permitir a solubilidade tanto do material de partida como do agente redutor. O uso de $NaBH_4$ foi eficaz, dispensando a necessidade do uso de ácido na reação, geralmente empregado em reduções com $NaBH_3CN$ (WEICHET; HODROVÁ; BLÁHA, 1961). Entretanto, $NaBH_4$ também reduz aldeídos e cetonas, tornando importante garantir a completa formação da imina antes de adicionar o agente redutor (BAXTER; REITZ, 2002). Apesar da falta de seletividade, o uso de $NaBH_4$ pode ser vantajoso porque ele é menos tóxico e mais barato que outros boridretos redutores (ALINEZHAD; TAJBAKHSH; MAHDAVI, 2010; TRIPATHI et al., 2008).

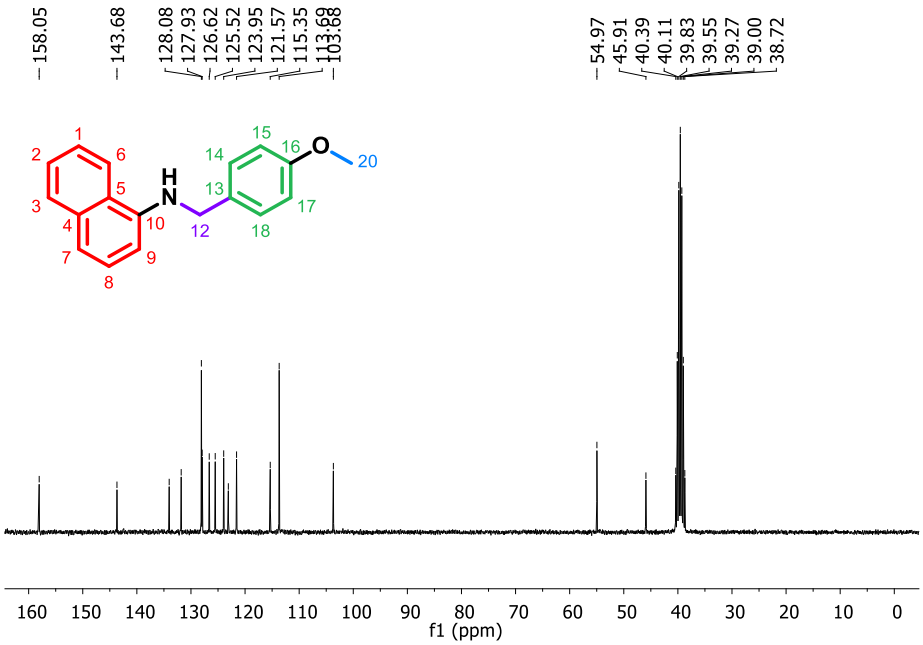
O espectro de RMN ^{1}H do composto **3a** é apresentado na figura 14, a seguir, para visualização geral dos sinais referentes às aminas secundárias. A formação do composto é verificada pelo singleto em 4,42 ppm, referente ao metileno ligado ao nitrogênio, enquanto o sinal referente ao hidrogênio da imina (8,46 ppm) deixa de ser observado. Sinais do naftaleno são observados entre 8,23 e 6,38 ppm, enquanto sinais da fanila são encontrados de 7,32 a 6,86 ppm. Em 3,70 ppm encontra-se o sinal da metoxila, característico da molécula. O sinal referente ao hidrogênio do NH parece estar sobreposto pelo dubleto em 6,86, uma vez que a integral está para 3 hidrogênios (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).



RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ **8,23** (t, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz, 6-ArH), **7,74** (t, 1H, *J* = 3 Hz, *J* = 9 Hz, 3-ArH), **7,45-7,38** (m, 2H, 1, 2-ArH), **7,32** (d, 2H, *J* = 9 Hz, 14, 18-ArH), **7,17** (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), **7,05** (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), **6,86** (d, 3H, *J* = 9 Hz, 11-NH, 15, 17-ArH), **6,38** (d, 1H, *J* = 9 Hz, 9-ArH), **4,42** (s, 2H, 12-CH_2), **3,70** (s, 3H, 20-CH_3).

Figura 14. Espectro de RMN ^{1}H do composto **3a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-benzil-naftil-aminas. As cores na molécula ilustram os hidrogênios especificados para cada deslocamento químico. Roxo = hidrogênios do metileno; vermelho = hidrogênios do naftaleno; verde = hidrogênios do anel fenílico; azul = hidrogênios da metoxila.

No espectro de RMN ^{13}C (figura 15) também é possível verificar a formação do composto pela alteração do deslocamento químico referente ao carbono 12. Enquanto o C12 do intermediário imínico apresenta deslocamento em 159,6 ppm, para a amina secundária, o sinal é observado em 45,9 ppm. Os sinais dos aneis aromáticos são observados entre 158,0 e 103,6 ppm, e o carbono da metoxila encontra-se em 54,9 ppm.



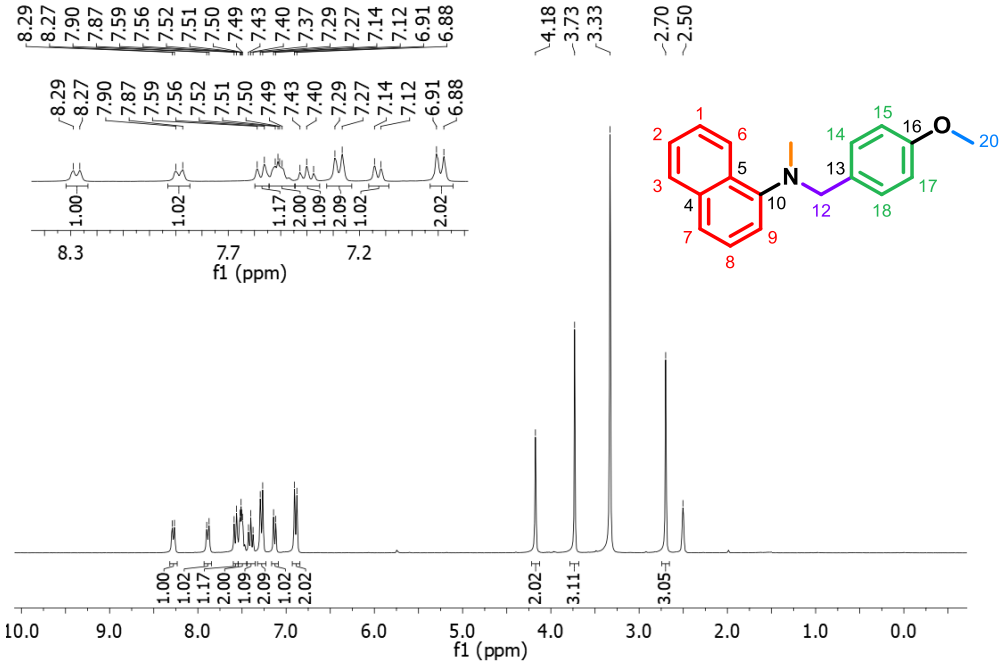
RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ **158,0** (C16), **143,6** (C10), **134,0** (C4), **131,1** (C13), **128,0** (C14, C18), **127,9** (C3), **126,6** (C8), **125,5** (C1), **123,9** (C5), **123,0** (C2), **121,5** (C6), **115,3** (C7), **113,6** (C15, C17), **103,6** (C9), **54,9** (C20), **45,9** (C12).

Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C do composto **3a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-benzil-naftil-aminas. As cores na molécula ilustram os carbonos especificados para cada deslocamento químico. Roxo = carbono do metileno; vermelho = carbonos do naftaleno; verde = carbonos do anel fenílico; azul = carbono da metoxila.

Para a síntese das aminas terciárias (**4a**-**e**), os compostos obtidos na etapa anterior (**3a**-**e**) foram metilados pela reação com formaldeído e $NaBH_3CN$, numa reação de aminação redutiva direta (CHEN et al., 2015b). Este método de *N*-metilação é vantajoso pois não permite a formação de sais de amônio quaternário, como acontece com métodos como metilação com CH_3I (PINE; SANCHEZ, 1971).

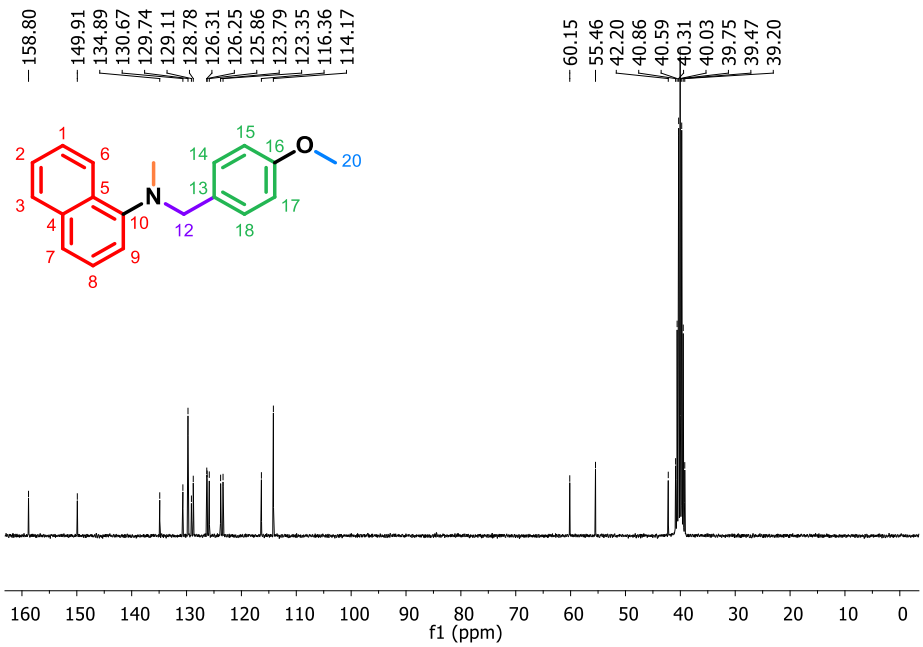
O grupo ciano do $NaBH_3CN$ apresenta propriedade retiradora de elétrons, o que reduz a reatividade do hidreto quando comparado com $NaBH_4$ e permite a redução seletiva da dupla ligação carbono-nitrogênio na presença de aldeídos e cetonas em pH ligeiramente ácido (de 5 a 7). A vantagem do $NaBH_3CN$ é a sua estabilidade em soluções ácidas relativamente fortes (pH = 3), a sua solubilidade em solventes próticos tais como álcoois e a sua seletividade em diferentes valores de pH. Esta seletividade permite um conveniente procedimento de aminação redutiva direta (*one pot*). Embora frequentemente seja relatado o uso de solvente prótico para esta reação, acetonitrila e THF também são utilizados (BAXTER; REITZ, 2002; TRIPATHI et al., 2008).

As análises de RMN ^{1}H e ^{13}C dos análogos *N*-metilados diferenciam-se das aminas secundárias basicamente pela presença do sinal referente à metila ligada ao nitrogênio 11 em 2,70 (figura 16) e 42,2 ppm nos espectros de hidrogênio e carbono, respectivamente (figura 17).



RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ **8,28** (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 6-ArH), **7,88** (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 3-ArH), **7,57** (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 7-ArH), **7,52-7,49** (m, 2H, 1, 2-ArH), **7,43** (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 8-ArH), **7,28** (d, 2H, *J* = 8,3 Hz 14, 18-ArH), **7,13** (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 9-ArH), **6,90** (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, 15, 17-ArH), **4,18** (s, 2H, 12-CH_2), **3,73** (s, 3H, 20-CH_3), **2,70** (s, 3H, 11-NCH_3).

Figura 16. Espectro de RMN ^{1}H do composto **4a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N,N*-benzilmetil-naftil-aminas. As cores na molécula ilustram os hidrogênios especificados para cada deslocamento químico. Roxo = hidrogênios do metileno; vermelho = hidrogênios do naftaleno; verde = hidrogênios do anel fenílico; azul = hidrogênios da metoxila; laranja = hidrogênios da metila.



RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ **158,8** (C16), **149,9** (C10), **134,8** (C4), **130,6** (C13), **129,7** (C14, C18), **129,1** (C5), **128,7** (C8), **126,3** (C1), **126,2** (C2), **125,8** (C6), **123,7** (C5), **123,3** (C7), **116,3** (C9), **114,1** (C15, C17), **60,1** (C12), **55,4** (C20), **42,2** (C11).

Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C do composto **4a**, indicando os principais sinais para a identificação das *N,N*-benzilmetil-naftil-aminas. As cores na molécula ilustram os carbonos especificados para cada deslocamento químico. Roxo = carbono do metileno; vermelho = carbonos do naftaleno; verde = carbonos do anel fenílico; azul = carbono da metoxila; laranja = carbono da metila.

4.2 ARIL-ISOQUINOLINAS

4.2.1 Introdução

Rotas de síntese de compostos aril-isoquinolínicos podem se basear em reações de ciclização (BRADSHER; WALLIS, 1978; TOVAR; SWAGER, 1999) ou no acoplamento do grupo arílico ao sistema isoquinolínico. Para a última, torna-se útil a reação de Suzuki (figura 20), que baseia-se classicamente em uma reação de acoplamento cruzado entre ácidos organoborônicos e haletos orgânicos, utilizando catalisador de paládio e base (KAJIYAMA et al., 2010; MIYAURA; SUZUKI, 1995; PAGLIARO et al., 2011; RAO et al., 2012; STOKES et al., 2009).

O mecanismo da reação de acoplamento de Suzuki se inicia com adição oxidativa do brometo de arila ao Pd(0) para formar um complexo de Pd(II) (figura 18). Uma molécula de base então substitui o brometo no complexo de paládio enquanto outra é adicionada ao organoborano para formar um reagente borato, tornando seu anel aromático mais nucleofílico. Transmetalação com o borato então se sucede, onde seu anel substitui o carbonato no complexo de paládio. Por fim,

após a etapa de eliminação redutiva, tem-se o produto final acoplado, regenerando o catalisador paládio, e o ciclo catalítico pode ocorrer novamente (SUZUKI, 1999).

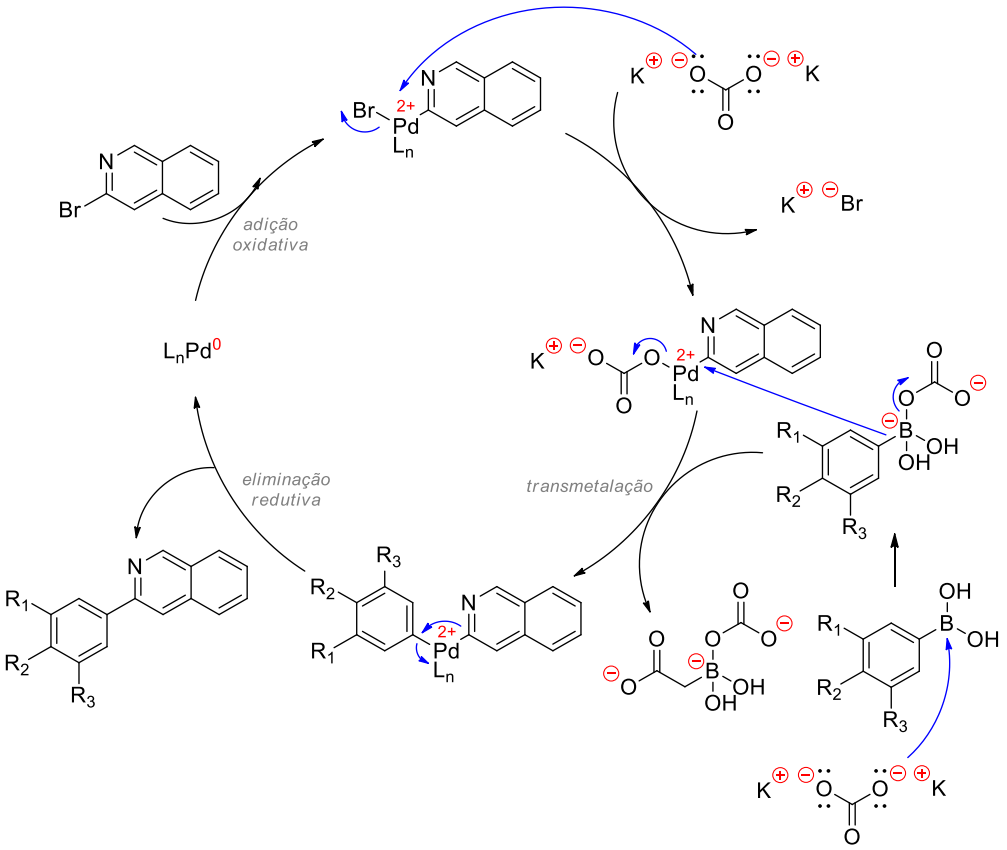


Figura 18. Ciclo catalítico da reação de acoplamento cruzado de Suzuki (SUZUKI, 1999).

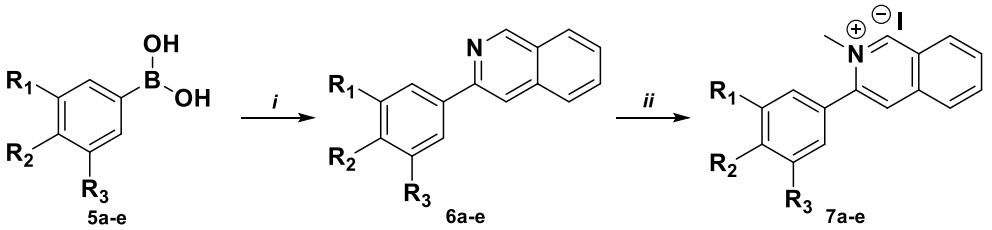
Embora no catalisador empregado o paládio se apresente como Pd^{2+}, o mesmo pode ser reduzido a Pd(0) *in situ* por componentes do meio reacional, como a base (MIYAURA; SUZUKI, 1995). Uma vez que o mecanismo de redução é incerto, o ciclo catalítico é apresentado de maneira genérica com "L_nPd^0", onde "L_n" seria um ligante fornecido pelas condições reacionais.

Em alguns casos, os sistemas catalíticos podem requerer o uso de ligantes como fosfinas, ligantes derivados de nitrogênio ou enxofre, ou sistemas que possuem Pd-carbenos e ciclopaladatos. Estes ligantes coordenam-se ao composto organometálico, estabilizando e/ou reduzindo o metal, ou, ainda, aumentando sua seletividade. O emprego de ligante pode ser necessário quando se utiliza substratos como cloretos de arila e brometos de arila desativados. Haletos de arila desativados são menos reativos à adição oxidativa, que representa uma etapa determinante da velocidade do ciclo catalítico. Entretanto, os sistemas catalíticos que utilizam precursores de paládio sem ligantes são bastante eficientes para iodetos e brometos

de arila com grupos ativantes (CORBET; MIGNANI, 2006; MOLANDER; TRICE; TSCHAEN, 2015; SUZUKI, 1999).

4.2.2 Método

A síntese das aril-isoquinolinas (**6**) compreendeu o acoplamento entre 3-bromoisoquinolina e ácidos aril-borônicos (**5**), por reação de Suzuki (KAJIYAMA et al., 2010; MIYAURA; SUZUKI, 1995; PAGLIARO et al., 2011; RAO et al., 2012; STOKES et al., 2009), seguido da alquilação do nitrogênio para obtenção dos compostos ionizados (**7**), conforme figura 19 (ZOU et al., 2008).



5a: R_1 = R_3 = H; R_2 = OCH_3
5b: R_1 = R_2 = OCH_3; R_3 = H
5c: R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3
5d: R_1 = R_2 = -OCH_2O-; R_3 = H
5e: R_1 = R_2 = -OC_2H_4O-; R_3 = H

6a: R_1 = R_3 = H; R_2 = OCH_3
6b: R_1 = R_2 = OCH_3; R_3 = H
6c: R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3
6d: R_1 = R_2 = -OCH_2O-; R_3 = H
2e: R_1 = R_2 = -OC_2H_4O-; R_3 = H

7a: R_1 = R_3 = H; R_2 = OCH_3
7b: R_1 = R_2 = OCH_3; R_3 = H
7c: R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3
7d: R_1 = R_2 = -OCH_2O-; R_3 = H
7e: R_1 = R_2 = -OC_2H_4O-; R_3 = H

Reagentes e condições: (***i***) 3-bromoisoquinolina (0,7 eq.), $Pd(OAc)_2$ (1,5 mol %), K_2CO_3 (1,3 eq.), EtOH 67 %, 80 ºC. (***ii***) CH_3I (10 eq.), MeCN, 60 ºC.

Figura 19. Rota sintética para obtenção da série aril-isoquinolina.

A obtenção das aril-isoquinolinas se deu pelo uso de $Pd(OAc)_2$ e K_2CO_3 em EtOH 67 % (*i*), que permitiu a conversão completa dos reagentes de partida em cerca de 4 h. A segunda etapa de síntese da série aril-isoquinolina consistiu na *N*-metilação da aril-isoquinolina com iodeto de metila em MeCN (*ii*), através de substituição nucleofílica bimolecular, formando o análogo *N*-metilado, carregado positivamente (BEAUSOLEIL et al., 2009; KELLEY et al., 2012; ZOU et al., 2008).

4.2.3 Resultados e discussão

Os produtos obtidos da reação de Suzuki apresentaram rendimentos entre 54 e 82 %, compatíveis com a literatura (tabela 4). Rendimentos superiores (87 %, composto **6b**) foram encontrados para outras rotas sintéticas. Embora os valores encontrados para as faixas de fusão (76 – 124 ºC), tenham sido um pouco inferiores àqueles previamente relatados (85 – 131 ºC) os compostos apresentaram desvios de até 2 ºC. Vale ressaltar que a própria literatura pode relatar valores divergentes entre si, conforme é possível verificar para o composto **6a**.

Tabela 4. Resultados obtidos na síntese e caracterização dos análogos aril-isoquinolínicos. Os substituintes **R**, **R_1**, **R_2** e **R_3** na molécula encontram-se orientados conforme ilustrado na figura 19.

Composto	R	R_1	R_2	R_3	Aspecto físico	CLAE	Faixa de fusão (ºC)		η_i (%)	η_{ii} (%)	η_G (%)	η_L (%)
							Experimental	*Literatura				
6a	-	H	OCH_3	H	Sólido branco	t = 7,4 min pureza > 95 %	98 – 99	85 – 103[1,2,3]	82	-	82	36 – 86[1,2,3,4]
6b	-	OCH_3	OCH_3	H	Sólido amarelo	t = 9,0 min pureza > 95 %	76 – 77	90 – 92[4]	82	-	82	87[4]
6c	-	OCH_3	OCH_3	OCH_3	Sólido branco	t = 9,3 min pureza > 97 %	110 – 112	122 – 124[5]	80	-	80	71[5]
6d	-	-OCH_2O-		H	Sólido amarelo	t = 9,96 min pureza > 98 %	122 – 124	131[4]	54	-	54	96[4]
6e	-	-OCH_2CH_2O-		H	Sólido branco	t = 9,88 pureza > 98 %	103 – 105	-	66	-	66	-
7a	CH_3	H	OCH_3	H	Sólido amarelo	t = 8,9 min pureza > 98 %	180 – 182	-	82	76	62	-
7b	CH_3	OCH_3	OCH_3	H	Sólido amarelo	t = 8,9 min pureza > 95%	213 –215	-	82	93	76	-
7c	CH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	Sólido amarelo	t = 8,8 min pureza > 95 %	219 –221	-	80	98	78	-
7d	CH_3	-OCH_2O-		H	Sólido amarelo	t = 9,03 pureza > 98 %	213 – 215	-	54	55	30	-
7e	CH_3	-OCH_2CH_2O-		H	Sólido amarelo	t = 9,16 pureza > 98 %	192 – 194	-	66	80	53	-

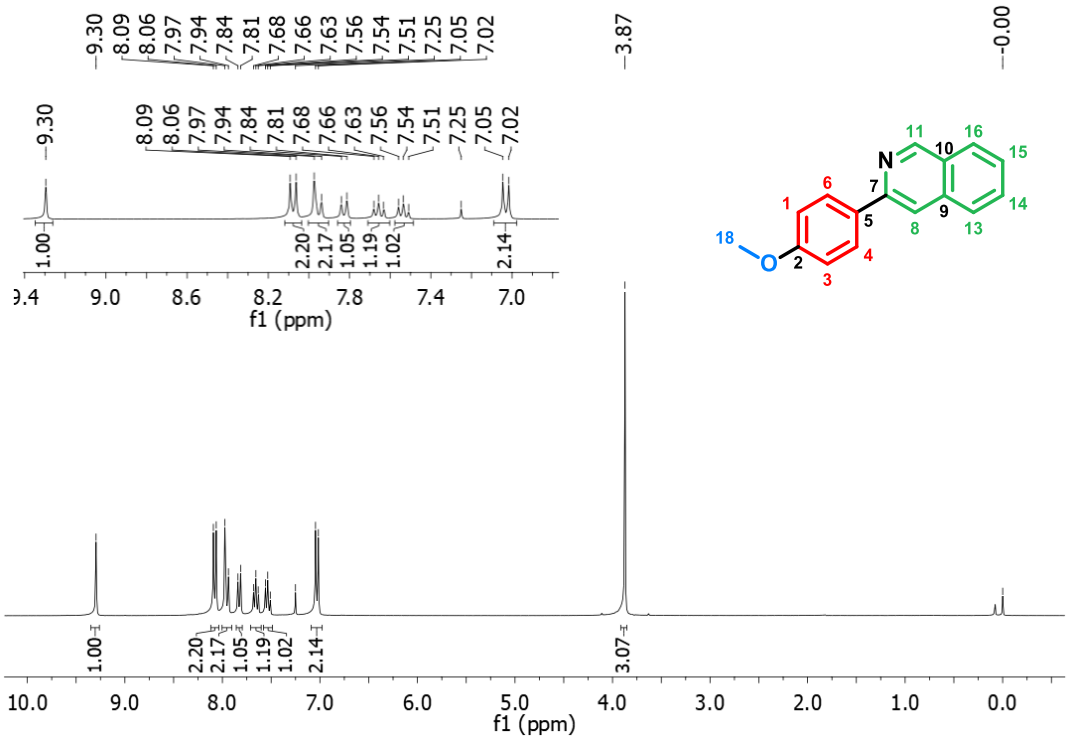
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **t**: Tempo de retenção com sistema eluente inicialmente com H_2O 100 % e ACN 0,1% TFA alcançando 100% em 10 minutos. **η_i** = rendimento obtido na primeira etapa (***i***); **η_{ii}** = rendimento obtido na segunda etapa (***ii***); **η_{iii}** = rendimento obtido na terceira etapa (***iii***); **η_G** = rendimento global; **η_L** = rendimento encontrado na literatura.

*Menor e maior valores de temperatura de fusão encontrados na literatura. [1]DELLACQUA; ABBIATI; ROSSI, 2010; [2]YANG et al., 2012; [3]HUO; YAMAMOTO, 2009; [4]BRADSHER; WALLIS, 1978; [5]HUANG; HUNTER; LAROCK, 2002.

As aril-isoquinolinas *N*-metiladas obtidas são moléculas inéditas, e apresentaram faixas de fusão entre 180 e 221 ºC, com desvios de até 2 ºC. Desvios que não ultrapassem 2 ºC para a faixa de fusão representam um indício de pureza, que foi confirmada por análise cromatográfica, onde verificou-se que os compostos apresentaram pureza superior a 95 % e podem ser submetidos a ensaios biológicos.

As condições empregadas na reação de Suzuki envolveram um sistema catalítico com precursor de paládio sem ligante e se mostraram altamente eficazes, embora o haleto de arila envolvido não apresentasse grupos ativantes.

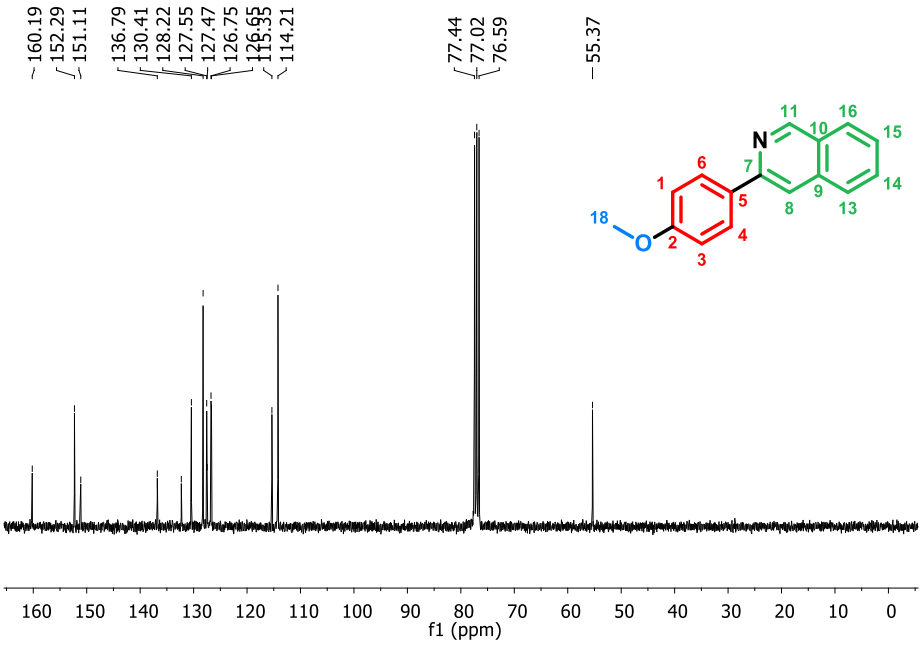
A figura 20 apresenta o espectro de RMN ^{1}H do composto **6a**, tomado como exemplo para a visualização dos sinais característicos dos compostos aril-isoquinolínicos. Os sinais referentes ao sistema quinolínico são observados entre 9,30 e 7,54 ppm. Os sinais em 8,08 e 7,03 ppm referem-se ao anel fenílico, enquando a metoxila é observada em 3,87 ppm.



RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ **9,30** (s, 1H, 11-ArH), **8,08** (d, 2H, *J* = 9 Hz, 4, 6-ArH), **7,97** (s, 1H, 8-ArH), **7,95** (d, 1H, *J* = 9 Hz, 16-ArH), **7,83** (d, 1H, *J* = 9 Hz, 13-ArH), **7,66** (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 14-ArH), **7,54** (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 15-ArH), **7,03** (d, 2H, *J* = 9 Hz, 1, 3-ArH), **3,87** (s, 3H, 18-OCH_3).

Figura 20. Espectro de RMN ^{1}H do composto **6a**, indicando os principais sinais para a identificação das aril-isoquinolinas. As cores na molécula ilustram os hidrogênios especificados para cada deslocamento químico. Vermelho = hidrogênios do anel fenílico; verde = hidrogênios do sistema isoquinolínico; azul = hidrogênios da metoxila.

A formação do composto pode ser confirmada principalmente pelo sinal referente ao carbono 5 (figura 21), que não é detectado no ácido borônico e se torna observável no espectro do produto (127,4 ppm) (ZHAO et al., 2014). O sinal referente ao C7, por sua vez, que é encontrado em 135,8 ppm na 3-bromoisoquinilina, torna-se mais desprotegido e é observado em 151,1 ppm para o composto **6a** (VELDHUIZEN; DIJK; SANDERS, 1980).

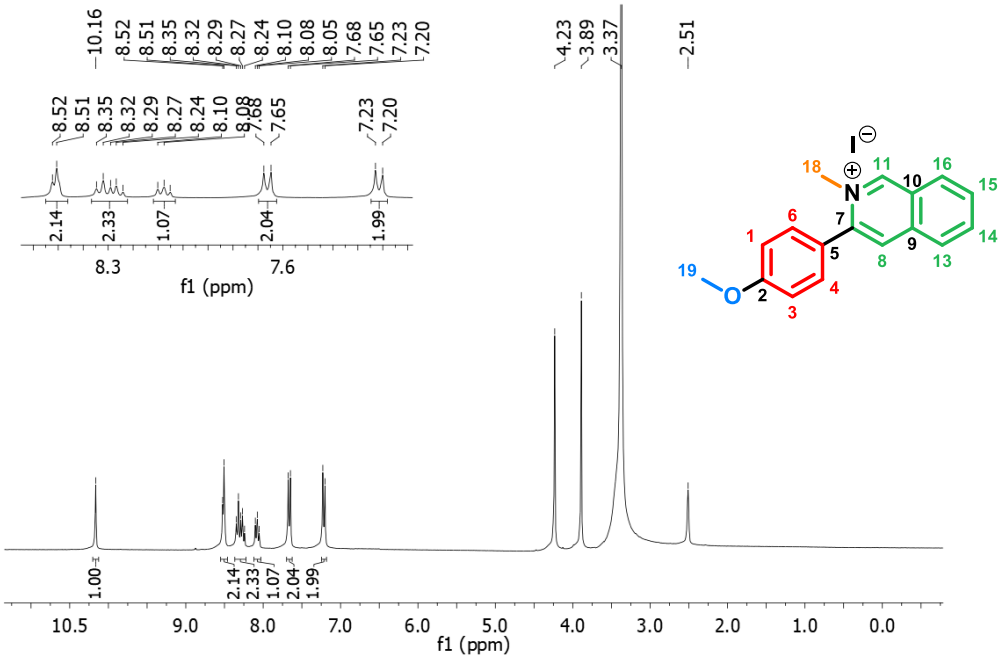


RMN ^{13}C ($CDCl_3$ 75 MHz): δ **160,1** (C2), **152,2** (C11), **151,1** (C7), **136,7** (C9), **132,3** (C10), **130,4** (C14), **128,2** (C4, C6), **127,5** (C13), **127,4** (C5), **126,7** (C16), **126,6** (C15), **115,3** (C8), **114,2** (C1, C3), **55,3** (C18).

Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C do composto **6a**, indicando os principais sinais para a identificação das aril-isoquinolinas. As cores na molécula ilustram os carbonos especificados para cada deslocamento químico. Vermelho = carbonos do anel fenílico; verde = carbonos do sistema isoquinolínico; azul = carbono da metoxila.

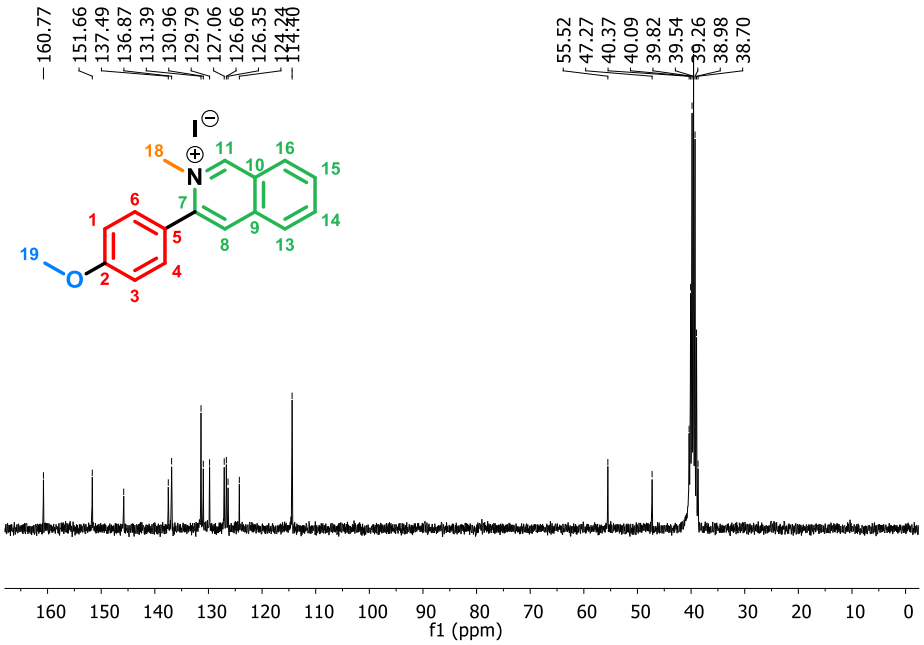
Na etapa de *N*-metilação, a aril-isoquinolina, reagente limitante, foi completamente consumida. O solvente e resíduo de iodeto de metila foram evaporados e o sólido obtido lavado com hexano e acetato de etila. Assim, a reação se mostra vantajosa por se obter composto isolado sem a necessidade de se aplicar métodos de purificação como extração, recristalização ou cromatografia de coluna.

A formação do produto é verificada pelo sinal referente aos hidrogênios da metila, em 4,23 ppm (figura 22), enquanto no RMN ^{13}C observa-se o carbono da metila em 47,2 ppm (figura 23).



RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ **10,16** (s, 1H, 11-ArH), **8,51** (s, 1H, 8-ArH), **8,51** (d, 1H, *J* = 9 Hz, 13-ArH), **8,33** (d, 1H, *J* = 9 Hz, 16-ArH), **8,27** (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 15-ArH), **8,08** (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 14-ArH), **7,67** (d, 2H, *J* = 9 Hz, 4, 6-ArH), **7,21** (d, 2H, *J* = 9 Hz, 1, 3-ArH), **4,23** (s, 1H, 18-NCH_3), **3,89** (s, 1H, 19-OCH_3).

Figura 22. Espectro de RMN ^{1}H do composto **7a**, indicando os principais sinais para a identificação das aril-*N*-metil-isoquinolinas. As cores na molécula ilustram os hidrogênios especificados para cada deslocamento químico. Vermelho = hidrogênios do anel fenílico; verde = hidrogênios do sistema isoquinolínicos; azul = hidrogênios da metoxila; laranja = hidrogênios da metila.



RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ **160,7** (C2), **151,6** (C7), **145,8** (C11), **137,4** (C9), **136,8** (C13), **131,3** (C4, C6), **130,9** (C14), **129,7** (C10), **127,0** (C16), **126,6** (C15), **126,3** (C5), **124,2** (C8), **114,4** (C1, C3), **55,5** (C19), **47,2** (C18).

Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C do composto **7a**, indicando os principais sinais para a identificação das aril-*N*-metil-isoquinolinas. As cores na molécula ilustram os carbonos especificados para cada deslocamento químico. Vermelho = carbonos do anel fenílico; verde = carbonos do sistema isoquinolínico; azul = carbono da metoxila; laranja = carbono da metila.

4.3 BENZOFENANTRIDINAS

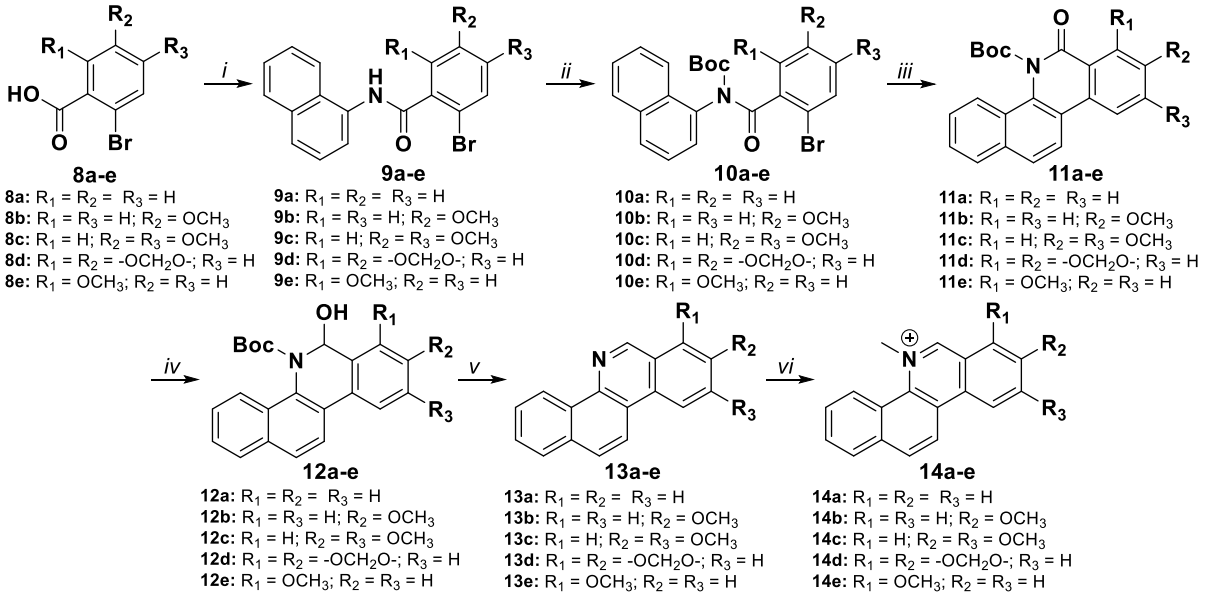
4.3.1 Introdução

As benzofenantridinhas se constituem em um sistema heteroaromático policíclico, composto de um núcleo fenantridínico fundido a um anel benzênico. Este tipo de alcaloide é amplamente encontrado no reino vegetal e, como grande parte dos compostos de origem natural, apresenta certa complexidade estrutural que se reflete em dificuldades na sua obtenção por meios sintéticos, com rotas envolvendo várias etapas (KOHNO et al., 2009; SLANINOVÁ et al., 2014)

A síntese de compostos benzofenantridínicos torna-se um desafio e diversos autores propõem a síntese deste tipo de molécula a partir da reação da amina com cloreto de ácido para formação de amida, com subsequente ciclização via reação Heck-*type* e redução da lactama (BERNARDO et al., 2008; CHENG et al., 2014; HARAYAMA et al., 2001).

4.3.2 Método

A rota proposta para a síntese dos compostos benzofenantridínicos envolveu seis etapas reacionais (figura 24), partindo do ácido 2-bromobenzoico, das quais as etapas *i* e *ii* foram realizadas, sendo a etapa *iii* limitante ao prosseguimento da rota.



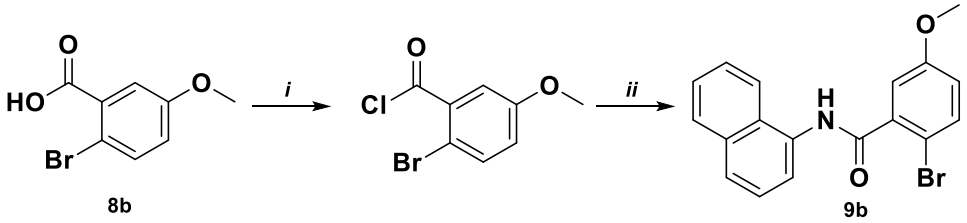
Reagentes e condições: (***i***) 1. $(CO_2)Cl_2$ (0,7 eq.), DMF (cat.), DMF, DCM, N_2, t.a. 2. naftil-amina (0,3 eq.), Et_3N (1 eq.), DCM, N_2, t.a.; (***ii***) Boc_2O (2 eq.), DMAP (0,25 eq.), MeCN, N_2, t.a. (***iii***) $Pd(OAc)_2$ (0,1 eq.), PPh_3 (0,25 eq.), Na_2CO_3 (1 eq.), DMF, refluxo; (i***v***) DIBAL, 0 ºC–rt; (***v***) 2 M HCl (***vi***) CH_3I (10 eq.), MeCN, 60 ºC.

Figura 24. Rota sintética para a obtenção das benzofenantridinas.

4.3.3 Resultados e discussão

4.3.3.1 Obtenção das *N*-naftil-benzamidas

Para a formação da amida, foi necessário obter o cloreto de ácido a partir do ácido 2-bromo-benzoico e, posteriormente, reagi-lo com a amina para formação da amida, na presença de base (Et_3N), DCM e atmosfera inerte (BERNARDO et al., 2008). Para tanto, a reação do ácido benzoico com cloreto de tionila em refluxo é usualmente descrita na literatura no contexto da síntese de benzofenantridinas, e foi inicialmente preconizada, obtendo-se, após adição da naftil-amina, o composto metoxilado **9b** com, 42 % de rendimento (figura 25) (BERNARDO et al., 2008; CHENG et al., 2014; HARAYAMA et al., 2001).



Reagentes e condições: (***i***) $SOCl_2$ (6,8 eq.), refluxo. (***ii***) 2-naftil-amina (1 eq.), Et_3N (2 eq.), CH_2Cl_2 , t.a., N_2.

Figura 25. Síntese dos intermediários *N*-naftil-benzamídicos, utilizando $SOCl_2$ como reagente para a obtenção de cloreto de ácido.

A obtenção do cloreto de ácido é uma etapa importante para a formação da amida, pois o cloreto é um grupo de saída melhor que a hidroxila na etapa de adição nucleofílica à carbonila (CLAYDEN et al., 2012). Nesta reação, o átomo de enxofre do $SOCl_2$ é eletrofílico e sofre ataque da carboxila, formando um intermediário instável e altamente eletrofílico (figura 26). A protonação deste intermediário pelo HCl formado no meio reacional gera um eletrófilo capaz de reagir com o íon cloreto, formando um intermediário tetraédrico que dará origem ao cloreto de acila, dióxido de enxofre e ácido clorídrico. Esta etapa é irreversível, uma vez que SO_2 e HCl são liberados na forma de gás. Embora o HCl esteja envolvido nesta reação, ele não pode ser usado como o único reagente para a produção de cloretos ácidos, pois é necessário ter um composto de enxofre ou fósforo para remover o oxigênio (CLAYDEN et al., 2012).

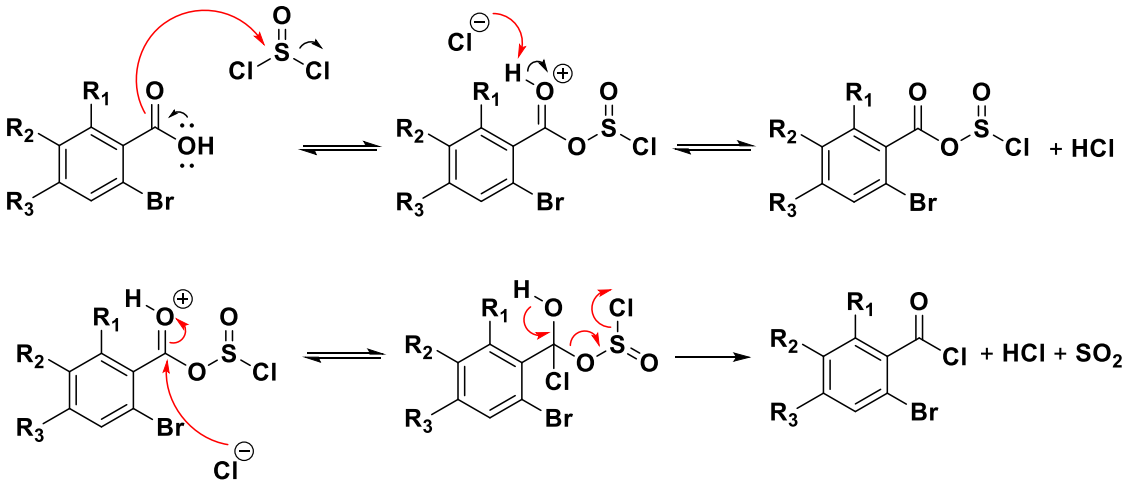


Figura 26. Mecanismo de formação de cloreto de ácido a partir de ácido carboxílico e cloreto de tionila (CLAYDEN et al., 2012).

Embora cloretos de ácidos sejam classicamente obtidos da reação de ácidos carboxílicos com cloreto de tionila, o rendimento obtido não foi elevado. Ademais, a reação requer a remoção do excesso de cloreto de tionila antes da adição da amina e face às particularidades do reagente e da estrutura do laboratório, este procedimento ofereceu riscos à saúde, o que representou uma desvantagem importante.

Por este motivo, obtenção do cloreto de ácido a partir da reação do ácido carboxílico com cloreto de oxalila e DMF foi preconizada (MONTALBETTI; FALQUE, 2005). As amidas foram obtidas com sucesso e o método de síntese se mostrou eficiente, obtendo-se produtos com rendimentos apreciáveis, entre 63 e 82 % (tabela 5). Adicionalmente, a amida formada precipitou no meio reacional, possibilitando seu isolamento por filtração à vácuo, método rápido e econômico para purificação.

Tabela 5. Resultados obtidos na síntese dos intermediários amídicos.

Composto	R_1	R_2	R_3	Aspecto físico	η (%)
9a	H	H	H	Sólido branco	82
9b	H	OCH_3	H	Sólido branco	63
9c	H	OCH_3	OCH_3	Sólido branco	77
9d	$-OCH_2O-$		H	Sólido branco	83

Esta reação se inicia com o ataque nucleofílico da amida do DMF à carbonila do cloreto de oxalila, formando um intermediário tetraédrico que sofre eliminação de íon cloreto (figura 27). Este ataca a ligação C=N, gerando um novo intermediário tetraédrico. O par eletrônico do nitrogênio se desloca para formar novamente uma ligação C = N, culminando na eliminação de gases CO e CO_2. O intermediário

catiônico formado da reação com DMF reage rapidamente com a carboxila, formando um intermediário que captura o íon cloreto e gera o cloreto de acila, com DMF regenerado (CLAYDEN et al., 2012).

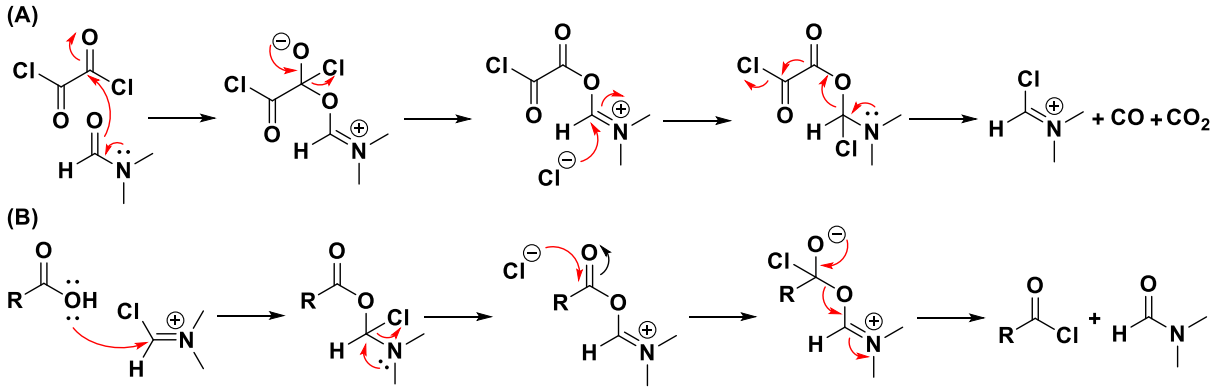


Figura 27. Mecanismo de formação de cloreto de ácido a partir de ácido carboxílico e cloreto de oxalila. (**A**) Mecanismo catalítico do DMF sobre o $(CO)_2Cl_2$ para formação do intermediário catiônico. (**B**) Ataque da carboxila ao intermediário catiônico para obtenção do cloreto de ácido (CLAYDEN et al., 2012).

A obtenção da amida, propriamente, ocorre a partir da adição do nitrogênio nucleofílico da naftil-amina à carbonila do cloreto de acila, formando um intermediário zwiteriônico tetraédrico instável (figura 28). Este intermediário sofre uma reação de eliminação do íon cloreto, com posterior remoção do próton do nitrogênio pela base, trietilamina.

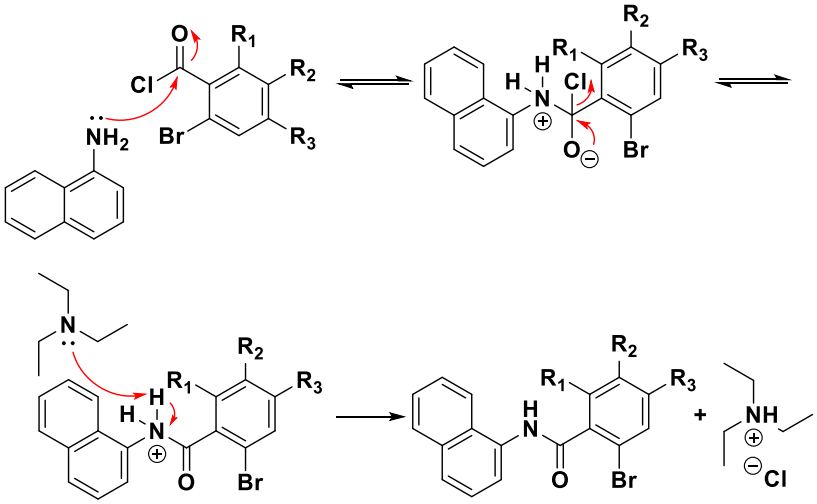
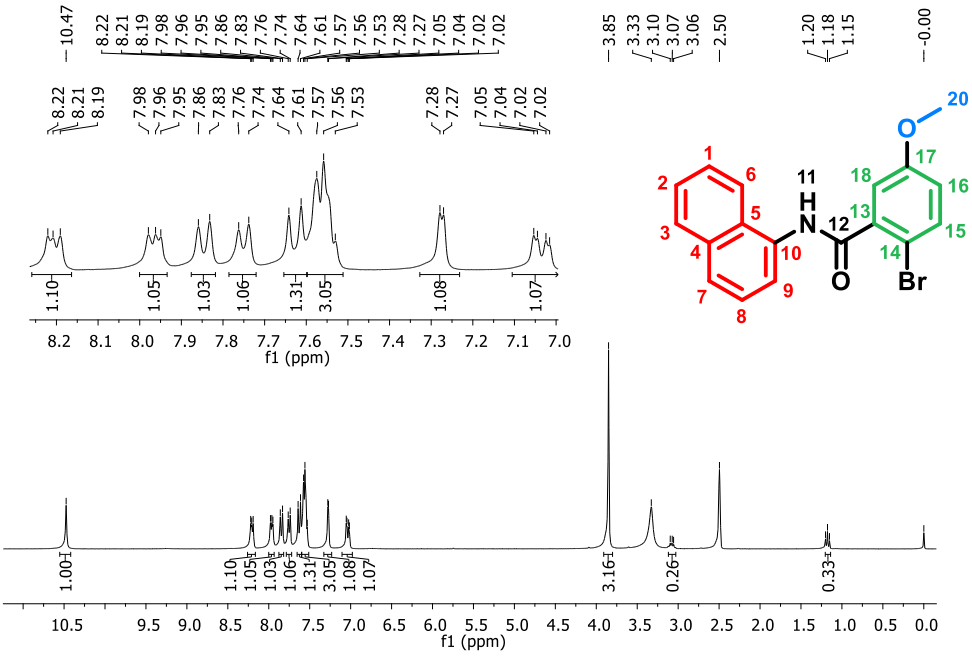


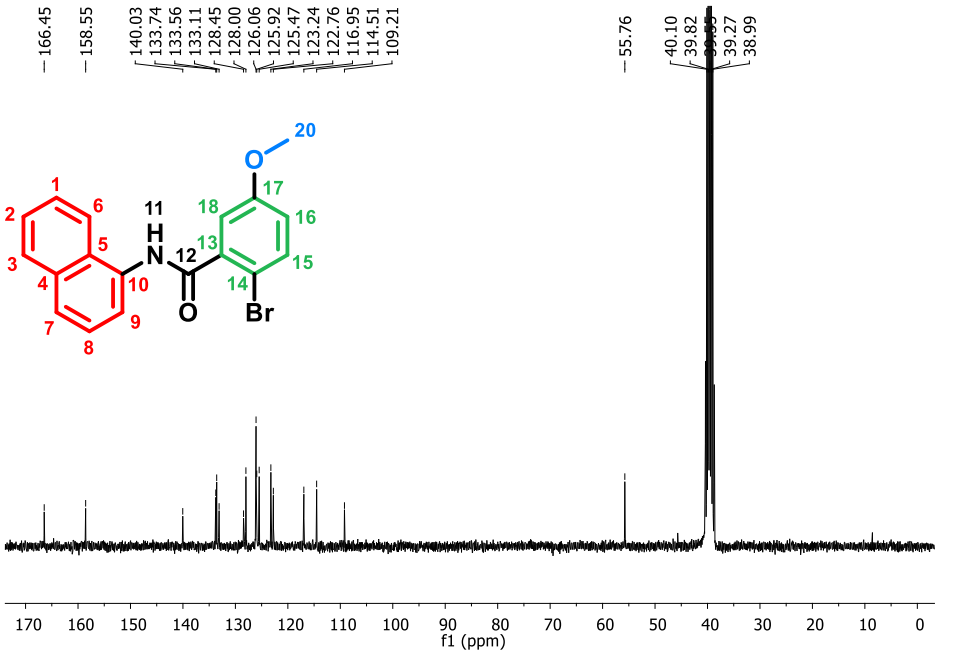
Figura 28. Mecanismo de formação de amida a partir de cloreto de ácido e amina.

A formação do composto é verificada pelo singleto em 10,47 ppm, referente ao hidrogênio da amida (figura 29), bem como pela respectiva carbonila em 166,4 ppm (figura 30). Sinais referentes aos anéis aromáticos são observados na faixa de 7 a 8 ppm, enquanto o sinal da metoxila encontra-se em campo alto (3,85 ppm).



RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ **10,47** (s, 1H, 11-NH), **8,20** (t, 1H, *J* = 4,5 Hz, 6-ArH), **7,96** (t, 1H, *J* = 4,5 Hz, 3-ArH), **7,85** (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-ArH), **7,75** (d, 1H, *J* = 7,3, 9-ArH), **7,63** (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, 15-ArH), **7,57-7,53** (m, 3H, 1,2,8-ArH), **7,27** (d, 1H, *J* = 2,6 Hz, 18-ArH), **7,03** (dd, 1H, *J* = 2,6 Hz, *J* = 8,8 Hz, 16-ArH), **3,85** (s, 3H, 20-OCH$_3$).

Figura 29. Espectro de RMN ^{1}H do composto **9b**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-naftil-benzamidas. As cores na molécula ilustram os hidrogênios especificados para cada deslocamento químico. Vermelho = hidrogênios do sistema naftílico; verde = hidrogênios do anel benzílico; azul = hidrogênios da metoxila.



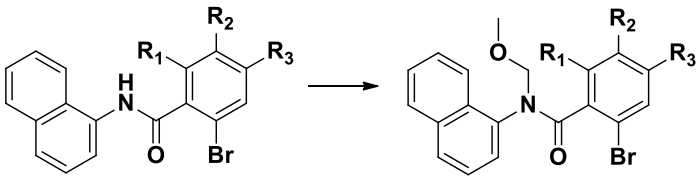
RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ **166,4** (C12), **158,5** (C17), **140,0** (C10), **133,7** (C13), **133,5** (C15), **133,1** (C4), **128,4** (C5), **127,9** (C3), **126,0** (C8, C2), **125,9** (C7), **125,4** (C1), **123,2** (C6) **122,7** (C16), **116,9** (C9), **114,5** (C18), **109,2** (C14), **55,7** (C20).

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C do composto **9b**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-naftil-benzamidas. As cores na molécula ilustram os carbonos especificados para cada deslocamento químico. Vermelho = carbonos do sistema naftílico; verde = carbonos do anel benzílico; azul = carbono da metoxila.

4.3.3.2 Proteção das *N*-naftil-benzamidas

Referências desta rota sintética estabelecem uma etapa de proteção do nitrogênio da amida antecedendo a reação de ciclização (BERNARDO et al., 2008; CHENG et al., 2014; FUKUDA et al., 2017; HARAYAMA et al., 2001; KARAKI et al., 2014; PRADO; MICHEL; KOCH, 2006; SMIDRKAL, 1988; TATTON; SIMPSON; DONOHOE, 2014). Proteção de grupos funcionais são realizadas no intuito de aumentar a seletividade da reação e reduzir a formação de subprodutos (WUTS, 2014), embora a reação de Heck (ciclização) seja descrita como uma síntese altamente seletiva e que, na maioria das vezes, não é dificultada pela presença de heteroátomos como nitrogênio, oxigênio e enxofre (JAGTAP, 2017).

Entre os métodos preconizados para para *N*-proteção de amidas está a alquilação com reagentes como bromometil-metil-eter (MOMBr) ou clorometil-metil-eter (MOMCl) na presença de base (BERNARDO et al., 2008; CHENG et al., 2014; HARAYAMA et al., 2001). Porém, ao se aplicar o método utilizando MOMBr (figura 31), descrito por Bernardo et al (2008), não foi observada conversão do material de partida.



Reagentes e condições: MOMBr (2 eq.), NaH (7 eq.), THF, N_2, t.a.-40 ºC.
Figura 31. *N*-proteção com bromometil-metil-éter.

Um fator que pode contribuir para a baixa reatividade das amidas é o fato de que, ao contrário de nitrogênios de aminas, nitrogênios de amidas não são bons nucleófilos, tendo em vista que seu par de elétrons livre participa da ressonância desta função (CLAYDEN et al., 2012). Assim, utiliza-se neste tipo de reação uma base forte, como o hidreto de sódio, que desprotona o nitrogênio e favoreceria sua reatividade frente ao carbono eletrofílico do MOMBr (figura 32).

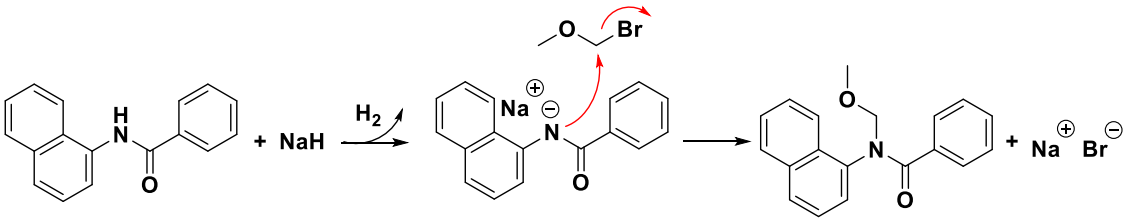


Figura 32. Mecanismo de *N*-proteção de amida com bromometil-metil-éter (MOMBr).

Neste sentido, optou-se por explorar a proteção com Boc_2O. Embora este reagente seja classicamente utilizado na proteção de aminas, reações para proteção de amidas também são descritas, incluindo amidas aromáticas (GREHN et al., 1986; LIU et al., 2017; PRADO; MICHEL; KOCH, 2006).

A proteção da amida com Boc_2O utilizou DMAP como catalisador (MENG; LEI; SZOSTAK, 2017) e permitiu a obtenção do produto protegido com 71 % de rendimento. A reação para proteção do intermediário amídico se inicia com o ataque do DMAP à carbonila do di-*terc*-butil-dicarbonato, com saída de *terc*-butil-carbonato e formação de um intermediário catiônico altamente eletrofílico, que é então atacado pelo nitrogênio da amida (figura 33). O *terc*-butil-carbonato formado na etapa anterior captura o próton da amida, formando o produto protegido de interesse. Paralelamente, tem-se *terc*-butil-bicarbonato como subproduto da reação, que sofre uma reação intramolecular gerando CO_2 e *terc*-butanol.

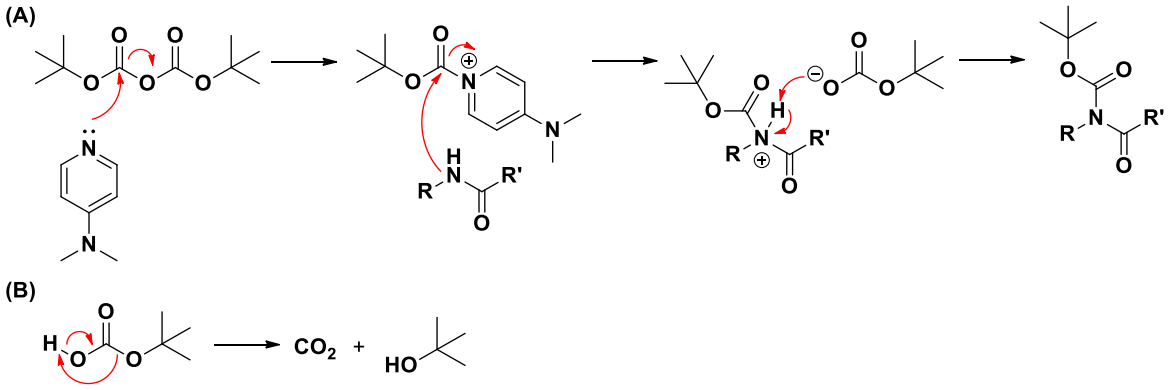
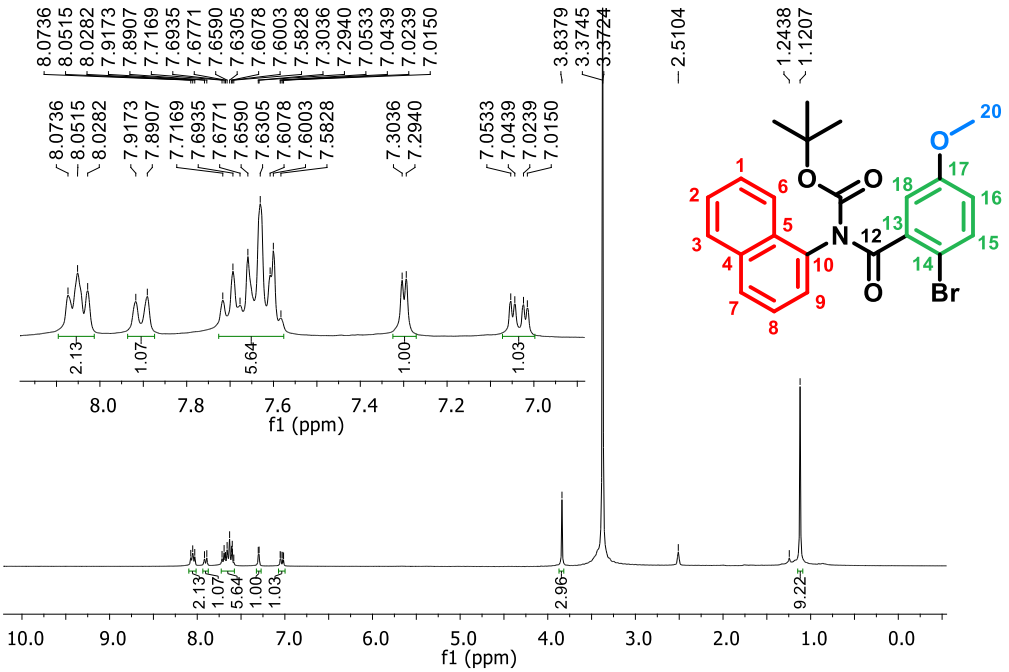


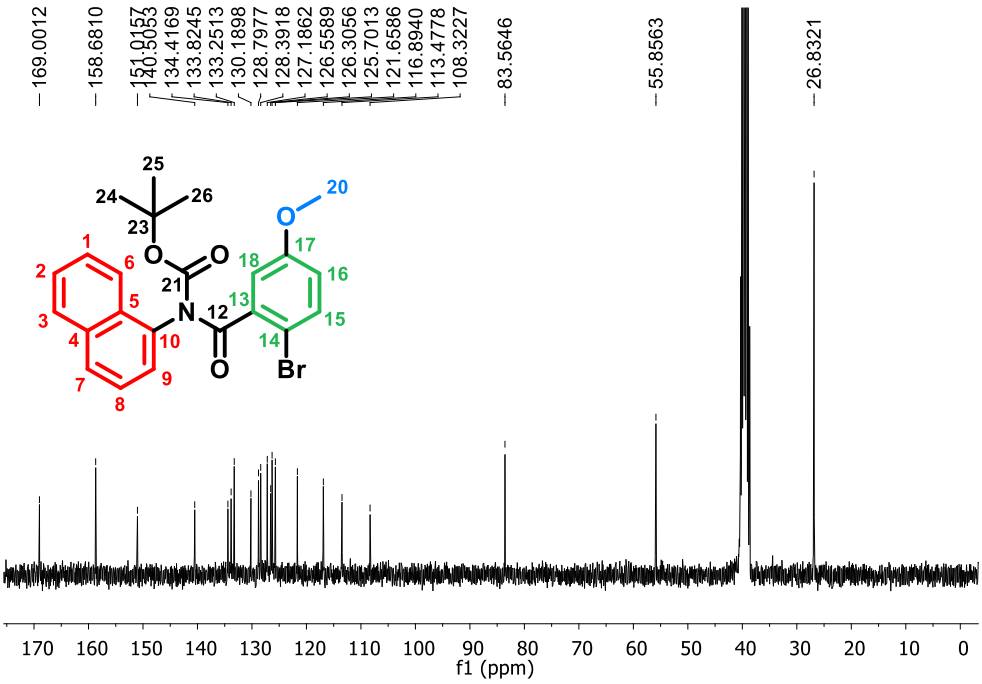
Figura 33. Mecanismo de *N*-proteção de amida com di-*terc*-butil-dicarbonato (Boc_2O). (**A**) Mecanismo catalítico do DMAP sobre o Boc_2O para formação do intermediário catiônico, que reage com a amida para obtenção do produto protegido. (**B**) Um subproduto *terc*-butil-bicarbonato é formado, a partir do qual são gerados CO_2 e *terc*-butanol.

A formação do produto é verificada pelo desaparecimento do sinal referente ao hidrogênio da amida secundária, que se encontraria em torno de 10 ppm. Adicionalmente, observa-se a presença do sinal relacionado à *terc*-butila do grupo protetor (figura 34). No espectro de carbono, observa-se a sinal referente à carbonila do carbamato, em 157,0 ppm, enquanto sinais do grupo *terc*-butil são verificados em 83,5 e 26,8 ppm (figura 35).



RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ **8,05** (t, 2H, *J* = 3,6 Hz, 3, 6-ArH), **7,90** (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-ArH), **7,71-7,58** (m, 5H, 1, 2, 8, 9, 15-ArH), **7,63** (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, 15-ArH), **7,30** (d, 1H, *J* = 2,8 Hz, 18-ArH), **7,03** (dd, 1H, *J* = 2,8 Hz, *J* = 8,8 Hz, 16-ArH), **3,83** (s, 3H, 20-OCH_3), **1,12** (s, 9H, *t*-Bu).

Figura 34. Espectro de RMN ^{1}H do composto **10b**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-naftil-benzamidas protegidas com Boc. As cores na molécula ilustram os hidrogênios especificados para cada deslocamento químico. Vermelho = hidrogênios do sistema naftílico; verde = hidrogênios do anel benzílico; azul = hidrogênios da metoxila; preto = hidrogênio da *terc*-butila.



RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ **169,0** (C12), **158,6** (C17), **157,0** (C21), **140,5** (C10), **134,4** (C13), **133,8** (C15), **133,2** (C4), **130,1** (C5), **128,7** (C3), **128,3** (C2), **127,1** (C8), **126,5** (C7), **126,3** (C1), **125,7** (C6) **121,6** (C16), **116,8** (C9), **113,4** (C18), **108,3** (C14), **83,5** (C23), **55,7** (C20), **26,8** (C24-26).

Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C do composto **10b**, indicando os principais sinais para a identificação das *N*-naftil-benzamidas protegidas com Boc. As cores na molécula ilustram os carbonos especificados para cada deslocamento químico. Vermelho = carbonos do sistema naftílico; verde = carbonos do anel benzílico; azul = carbono da metoxila; preto = carbonos das carbonilas e *terc*-butila.

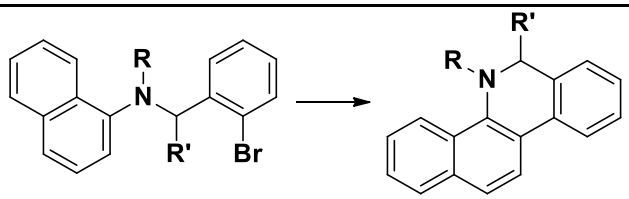
4.3.3.3 Obtenção dos intermediários tetracíclicos

A etapa subsequente da rota sintética consiste na ciclização dos compostos via reação intramolecular Heck-*type*, obtendo-se as respectivas lactamas. Classicamente, a reação de Heck é uma reação de acoplamento cruzado entre haletos orgânicos e olefinas, que utiliza catalisador de paládio e base (GIBSON; MIDDLETON, 1996; HECK, 1968). Sendo assim, a síntese apresentada trata-se de uma adaptação deste tipo de reação.

A tabela 6 apresenta as condições reacionais testadas para a obtenção dos intermediários tetracíclicos. A referência adotada inicialmente como base para a reação de ciclização (CHENG et al., 2014) apresenta a condição utilizada para as entradas 1 (nitrogênio desprotegido) e 9 (nitrogênio protegido). Após 24 h de reação, não foi verificada conversão do reagente de partida, mesmo para a amida protegida. Baseado-se na literatura, foram alteradas as condições reacionais, variando-se o solvente (MeCN) e a base (K_2CO_3, Cs_2CO_3, Ag_2CO_3), conforme verificado para as entradas 2 a 8 e 10 a 16 (FUKUDA et al., 2017; LI; LIN; HSU, 2001). Não houve obtenção do produto desejado, sendo eventualmente verificada a degradação do material de partida, com obtenção de intermediários das etapas anteriores da rota sintética, o que foi corroborado pelos espectros de RMN.

Mediante às dificuldades encontradas na rota sintética proposta, buscou-se na literatura rotas alternativas. Métodos robustos, partindo de reagentes como indanonas ou fenil-dioxolanos foram encontrados (LE; GANG; CHO, 2004; SAINSBURY; DYKE; MOON, 1970; TATTON; SIMPSON; DONOHOE, 2014). Verificou-se, ainda, métodos baseados em estratégias de aminação redutiva e reações radicalares (GILLESPIE; AMOROS; STERMITZ, 1974; SMIDRKAL, 1988; ŠMIDRKAL, 1984; STÝSKALA; HLAVÁČ; CANKAŘ, 2013).

Tabela 6. Condições reacionais aplicadas para a obtenção dos intermediários tetracíclicos. Todas as reações foram realizadas sob atmosfera inerte (N_2) e refluxo.



Entrada	R	R'	Solvente	Base	Equivalentes de $Pd(OAc)_2$	PPh_3
1	H	O	DMF	Na_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
2	H	O	ACN	Na_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
3	H	O	DMF	K_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
4	H	O	ACN	K_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
5	H	O	DMF	Cs_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
6	H	O	ACN	Cs_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
7	H	O	DMF	Ag_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
8	H	O	ACN	Ag_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
9	Boc	O	DMF	Na_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
10	Boc	O	ACN	Na_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
11	Boc	O	DMF	K_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
12	Boc	O	ACN	K_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
13	Boc	O	DMF	Cs_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
14	Boc	O	ACN	Cs_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
15	Boc	O	DMF	Ag_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
16	Boc	O	ACN	Ag_2CO_3 (1 eq)	0,1	0,25
17	CH_3	H_2	DMF	K_2CO_3 (1 eq)	0,2	0,4
18	CH_3	H_2	ACN	K_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
19	CH_3	H_2	DMF	Na_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
20	CH_3	H_2	ACN	Na_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
21	CH_3	H_2	DMF	Cs_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
22	CH_3	H_2	ACN	Cs_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
23	Boc	O	DMF	Na_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
24	Boc	O	ACN	Na_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
25	Boc	O	DMF	K_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
26	Boc	O	ACN	K_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
27	Boc	O	DMF	Cs_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4
28	Boc	O	ACN	Cs_2CO_3 (2 eq)	0,2	0,4

Dentre os métodos encontrados, a rota descrita por Harayama e colaboradores (2004) (entrada 17) utiliza aminas terciárias como reagente de partida em detrimento da amida, obtendo-se uma benzodi-idrofenantridina. Maior proporção dos reagentes em relação ao material de partida também é empregada e K_2CO_3 é utilizado como base. Neste sentido, *N*-(2-bromobenzil)-*N*-metilnaftalen-1-amina foi obtida conforme o método descrito para a síntese das *N*-benzil-naftil-aminas e foi utilizada como

reagente de partida para a obtenção do intermediário tetracíclico (HARAYAMA et al., 2004). O método não permitiu a obtenção do produto esperado, sendo variados o solvente (MeCN) e a base (Na_2CO_3, Cs_2CO_3, Ag_2CO_3), conforme entradas 18 a 22. Em geral, observou-se indícios de conversão do reagente de partida após, aproximadamente, 16 h de reação. Ao aplicar métodos cromatográficos para a purificação, não foi possível isolar quaisquer dos compostos visualizados na CCD. Tendo em vista que na mesma constavam 6 manchas e o tempo de reação, acredita-se que o reagente de partida sofreu degradação.

Para as entradas 23 a 28, aplicou-se as condições utilizadas nas entradas 17 a 22, porém utilizando a amida protegida como reagente de partida, onde foram verificados os mesmos resultados obtidos para as entradas 1 a 16.

Como a maioria das reações de acoplamento carbono-carbono, o primeiro passo do ciclo catalítico desta reação envolve a adição oxidativa do haleto de arila ao Pd(0) para permitir a formação de um complexo de Pd(II) (figura 36). A ligação carbono-carbono é formada, com um novo complexo carbono-paládio, seguido de eliminação do hidreto e obtenção do produto de interesse. A etapa de eliminação redutiva permite a regeneração do catalisador de paládio, e o ciclo catalítico pode ocorrer novamente (GIBSON; MIDDLETON, 1996; HECK, 1968).

Dentre as várias espécies de haleto empregados na reação de Heck, os cloretos de arila são de especial interesse em virtude do seu baixo custo e disponibilidade comercial com uma variedade de padrões de substituição. Entretanto, brometos e iodetos são vantajosos devido à maior reatividade, tendo em vista que a energia de dissociação da ligação destes elementos ao carbono é inferior quando comparados ao cloro (SMITH; MARCH, 2007).

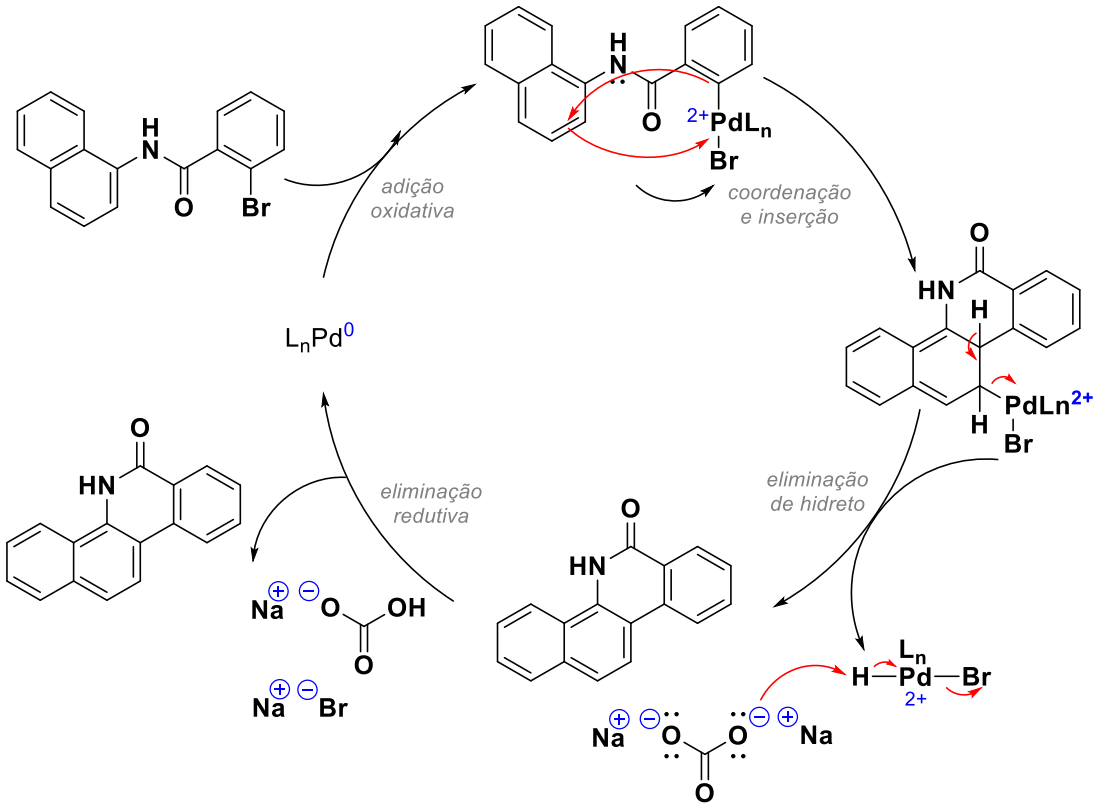


Figura 36. Ciclo catalítico da reação de acoplamento cruzado de Heck (GIBSON; MIDDLETON, 1996).

Existe disponível uma diversidade de catalisadores de paládio que podem ser empregados neste tipo de reação, desde complexos de paládio divalente ou zerovalente até na forma de nanopartículas. Adicionalmente, as condições para a reação costumam requerer temperaturas elevadas e uso de solventes apróticos como DMA e DMF, além do uso de base como trietilamina, entre outras. Embora frequentemente altos rendimentos estejam atrelados a este método de reação, limitações podem ser encontradas como necessidade de alta concentração do precursor catalítico para substratos menos reativos (JAGTAP, 2017).

Neste sentido, uma concentração mais alta do catalisador, bem como o uso de outros solventes polares apróticos com alto ponto de ebulição (além do DMF) representam uma estratégia que poderia ser melhor explorada no intuito de se estabelecer uma condição reacional que permitisse a obtenção dos intermediários tetracíclicos.

5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO*

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com as pesquisadoras profª Dra. Elizandra Braganhol, Dra. Priscila Oliveira e Me. Rosania Yang, vinculadas ao Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. O detalhamento dos ensaios biológicos é descrito em “parte experimental”.

5.1 INTRODUÇÃO

Gliomas compreendem um grupo de tumores do sistema nervoso central (SNC) característicos das células neurogliais, como astrócitos e oligodendrócitos. O glioblastoma, em particular, é o tipo de glioma mais comum, correspondendo 54% de todos os gliomas e 16% de todos os tumores cerebrais primários. Entre os gliomas, o glioblastoma é o tumor de maior malignidade, sendo altamente letal e com um prognóstico ruim, que está relacionado à resistência tumoral, à quimioterapia e à metástase (OH et al., 2017; VLEESCHOUWER, 2017).

Em 2018, foram registrados 296.851 novos casos de encefálicos e 241.037 óbitos em todo o mundo. Embora estes tipos de cânceres não estejam entre os de maior prevalência, eles destacam-se pela sua agressividade e mortalidade, que pode ser estimada em 81 % (GLOBOCAN, 2019a). A sobrevida de pacientes de glioblastoma não tratados é de três meses, e se extende a apenas quinze meses quando submetidos a tratamento. Tal tratamento consiste classicamente na remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com o agente alquilante temozolamida (VLEESCHOUWER, 2017).

Cerca de 50% dos pacientes não respondem ao tratamento com temozolamida. (LEE, 2016). Várias linhagens de glioblastoma (ex.: LN-18, T98G, U138, CCF-STTG1, U343-MG), são resistentes ao fármaco, principal quimioterápico no tratamento da doença. Células U87MG de glioblastoma, embora consideradas sensíveis à temozolamida, podem apresentar valores de IC_{50} superiores a 100 µM (ALONSO et al., 2007; BAER et al., 1993; KANZAWA et al., 2003).

Células de glioblastoma apresentam desregulação da morte celular apoptótica, de maneira que a indução da apoptose nestas células representa uma estratégia

interessante no desenvolvimento de novos antitumorais, mais eficazes (VALDÉS-RIVES et al., 2017). Adicionalmente, células de glioblastoma, como U87MG, apresentam expressão aumentada de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, incluindo a Bcl-x_L e são sensíveis à sanguinarina (JIANG; ZHENG; RICH, 2003; SAEED et al., 2018). Portanto, a linhagem U87MG representa um modelo interessante para a avaliação da atividade biológica dos compostos planejados.

5.2 MÉTODO

Os experimentos foram delineados conforme esquematizado na figura 37. Inicialmente, avaliou-se a atividade citotóxica dos compostos sintetizados pelos métodos do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e SRB (sulforrodamina B) em linhagem U87MG de glioblastoma (SOMENSI et al., 2017; ZANOTTO-FILHO et al., 2015). A atividade frente a fibroblastos de pulmão fetal MRC-5, linhagem não tumorigênica forneceu informações sobre seletividade e segurança ds compostos.

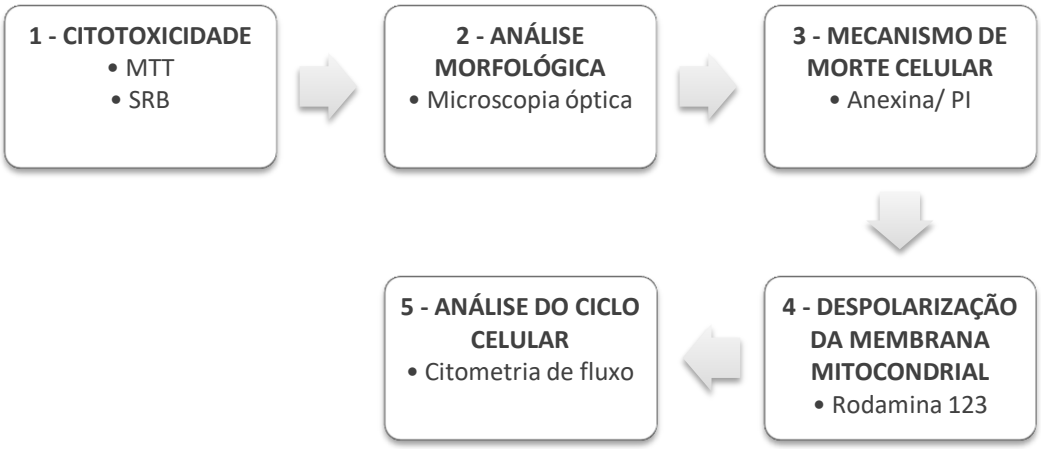


Figura 37. Fluxograma simplificado das etapas propostas para os estudos biológicos.

Tendo em vista que a Bcl-x_L é uma proteína envolvida na via mitocondrial de apoptose, estudos dos mecanismos de indução de morte celular em linhagem U87MG também foram planejados. A avaliação do tipo de morte celular (apoptose ou necrose) envolvida na ação citotóxica foi realizada por coloração com anexina V e iodeto de propídio (PI – *Propidium Iodide*), enquanto a avaliação do potencial de membrana mitocondrial por coloração com rodamina 123 forneceu informações sobre a via de morte apoptótica (intrínseca ou extrínseca). Análise do ciclo celular

foi realizada para verificação de possível interrupção do mesmo associada ao efeito citotóxico (KANIPANDIAN; LI; KANNAN, 2019; SOMENSI et al., 2017).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Avaliação da citotoxicidade

O protótipo, sanguinarina, bem como os análogos sintetizados, foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica em linhagem de glioblastoma multiforme U87MG para determinação do potencial antitumoral. A atividade frente a fibroblastos de pulmão fetal MRC-5, linhagem não tumorigênica, foi avaliada para determinação da seletividade. Para tanto, foram empregados os métodos do MTT e SRB.

O ensaio de MTT baseia-se na redução deste sal pelo sistema enzimático mitocondrial, através da atividade de desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado formazan, o qual reflete o normal funcionamento da mitocôndria e consequentemente a viabilidade celular. Este produto final, de cor violeta, é quantificado por método espectrofotométrico, após lise celular induzida e solubilização em DMSO. A quantidade de formazan produzida foi correlacionada com a concentração de células viáveis. Quanto maior a concentração de células vivas, maior é a taxa de biotransformação do MTT e, consequentemente, a concentração do produto reduzido (AZIZ, 2006).

O ensaio da sulforrodamina B (SRB), por sua vez, se baseia na ligação deste composto a proteínas celulares, através de dois grupos ácidos sulfônicos que se ligam a resíduos básicos de aminoácidos sob condições ligeiramente ácidas, e se dissociam sob condições básicas. A SRB retida na célula pelas interações com suas proteínas foi quantificada por espectrofotometria, tendo em vista que é tida como um corante de coloração vermelha. A quantidade de SRB foi então correlacionada com a densidade celular. Quanto maior a concentração de células, maior é a concentração de proteínas e, consequentemente, a quantidade de SRB ligada (ORELLANA; KASINSKI1, 2016).

A avaliação da citotoxicidade utilizando métodos de princípios distintos torna-se relevante visto que tanto o método do MTT como o da SRB apresentam limitações que são inerentes à própria técnica, como reações químicas entre os compostos

avaliados e os reagentes do experimento, e a associação das duas medidas garante maior confiabilidade ao resultado obtido (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Inicialmente, foi realizado um *screening* para determinar a potencial atividade antitumoral de todos os compostos sintetizados, por meio da exposição de culturas de linhagem de glioma de humano U87MG a concentrações crescentes (6,25-100 µM) dos compostos por um período de 72 h (figura 38).

Conforme apresentado na figura 38, compostos das duas séries planejadas, resultaram em uma redução da viabilidade e da proliferação celular, apresentando um perfil de atividade antiglioma concentração-dependente. Os valores de IC_{50} para os compostos desenvolvidos e para a sanguinarina (molécula protótipo) foram calculados e estão apresentados na tabela 7. Valores de IC_{50} entre 35 e 93 µM foram verificados para o ensaio por MTT, enquanto por SRB valores entre 26 e 86 µM foram observados. Estes valores apresentam-se superiores aos valores de IC_{50} da temozolamida nesta linhagem (>100 µM) (ALONSO et al., 2007; BAER et al., 1993; KANZAWA et al., 2003), reforçando o potencial antitumoral dos compostos.

Considerando os resultados obtidos nas análises de viabilidade e de proliferação celular, verifica-se que a série *N*-benzil-naftil-amina representa a série de análogos mais ativa (compostos **3a-e** e **4a-e**), sendo o composto *N*-metilado **4a**, com metoxila na posição 4, o mais ativo. O composto **3c**, trimetoxilado, também apresentou maior atividade antitumoral quando comparado aos demais, o que é reforçado pela efetividade do tratamento com concentrações menores (12,5 µM e 6,25 µM) dos compostos **3c** e **4a**, respectivamente. O mesmo foi possível observar com o composto **6e**, a partir de 25 µM. A aril-isoquinolina **6e**, com substituinte etilenodioxi, representou o compostos mais ativo da sua série (compostos **6a-e** e **7a-e**). Devido a essas características, os três compostos (**3c**, **4a** e **6e**) foram inicialmente considerados os mais relevantes e, portanto, submetidos a estudos mecanísticos.

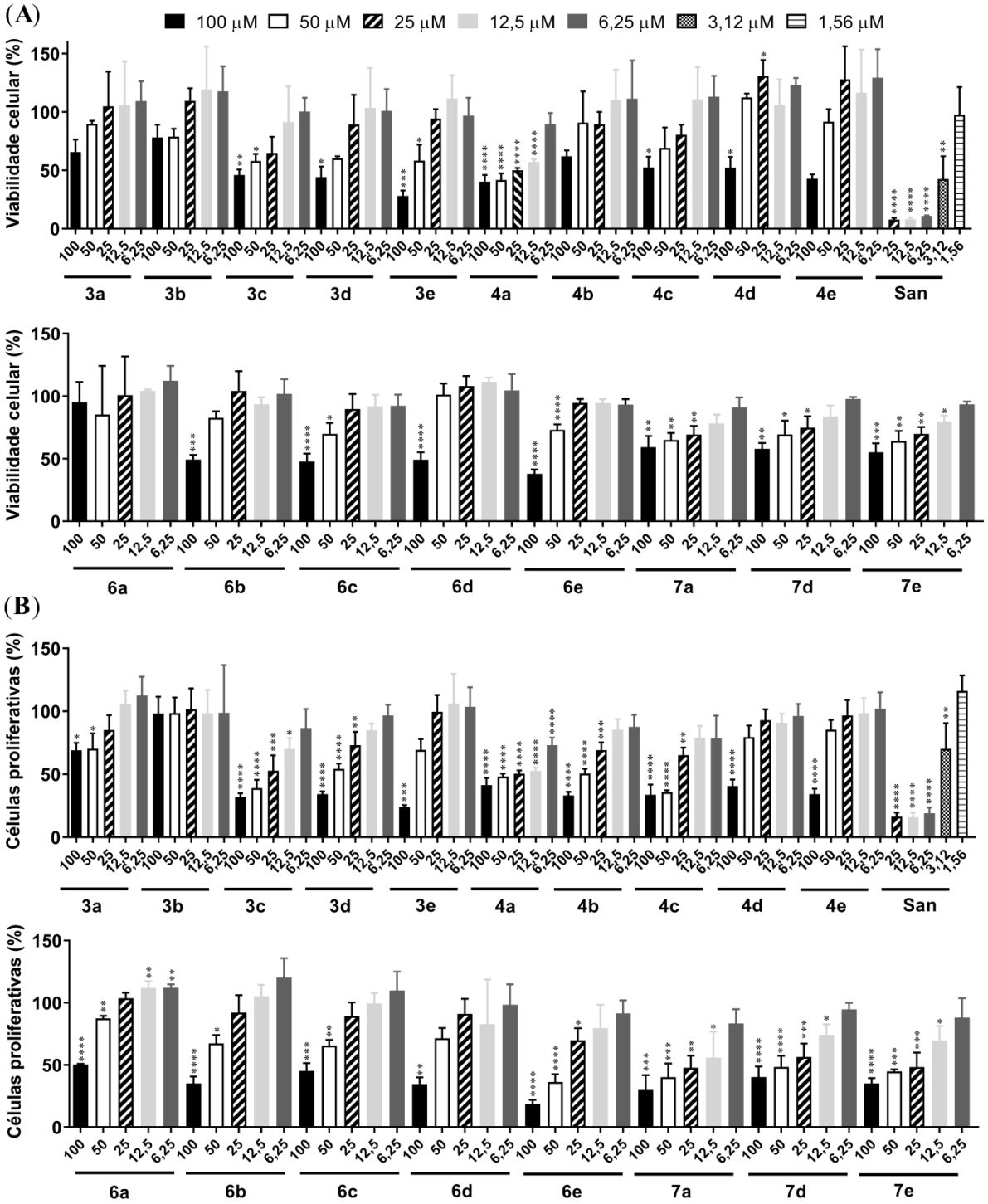
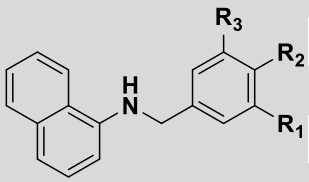
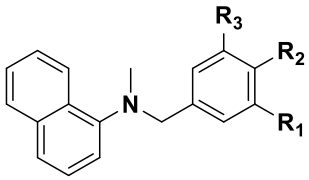
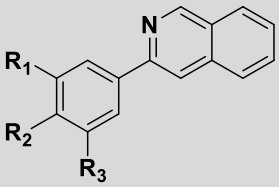
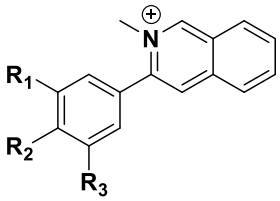


Figura 38. Viabilidade celular da linhagem de glioblastoma humano (U87MG) após 72 h de tratamento com sanguinarina (San) e os respectivos análogos pelos métodos do MTT (**A**) e SRB (**B**). Dados são expressos em porcentagem referente ao controle. As concentrações testadas variaram de 6,25 µM a 100 µM nos compostos sintetizados e de 1,56 µM a 25 µM para a sanguinarina. *p<0,05;**p<0,01; ***p<0,001;****p<0,0001

Tabela 7. Valores de IC_{50} da sanguinarina e seus respectivos análogos frente à linhagem de glioblastoma U87MG, destacando os compostos mais promissores **3c**, **4a** e **6e**.

Composto	Estrutura geral	R_1	R_2	R_3	IC_{50} U87MG (µM)	
					MTT	SRB
3a		H	OCH_3	H	> 100	> 100
3b		OCH_3	OCH_3	H	> 100	> 100
3c		OCH_3	OCH_3	OCH_3	72,54 ± 3,4	33,7 ± 10,9
3d		$-OCH_2O-$		H	78,4 ± 6,2	57,6 ± 7,5
3e		H	Cl	H	62,8 ± 9,5	67,3 ± 6,7
4a		H	OCH_3	H	35,0 ± 2,8	34,5 ± 8,1
4b		OCH_3	OCH_3	H	>100	52,3 ± 7,1
4c		OCH_3	OCH_3	OCH_3	>100	39,4 ± 2,6
4d		$-OCH_2O-$		H	>100	86,2 ± 3,5
4e		H	Cl	H	93,6 ± 0,3	82,8 ± 4,6
6a		H	OCH_3	H	> 100	> 100
6b		OCH_3	OCH_3	H	> 100	73,32 ± 9,3
6c		OCH_3	OCH_3	OCH_3	>100	83,5 ± 9,7
6d		$-OCH_2O-$		H	>100	> 100
6e		$-OCH_2CH_2O-$		H	79,9 ± 3,4	37,1 ± 5,1
7a		H	OCH_3	H	>100	26,5 ± 11,9
7b		OCH_3	OCH_3	H	>100	> 100
7c		OCH_3	OCH_3	OCH_3	>100	> 100
7d		$-OCH_2O-$		H	>100	48,9 ± 15,0
7e		$-OCH_2CH_2O-$		H	>100	36,5 ± 8,9
sanguinarina					3,0 ± 0,3	4,2 ± 0,7
temozolamida					> 100	

Também foram observadas alterações evidentes da densidade e morfologia celular. A figura 39 apresenta a cultura celular de U87MG após o tratamento com a sanguinarina, **3c**, **4a** e **6e**, sendo possível observar que os tratamentos com **3c** e **4a** se refletem em modificação do formato estrelar das células U87MG para esférico e presença de vacúolos característicos de indução de morte por apoptose.

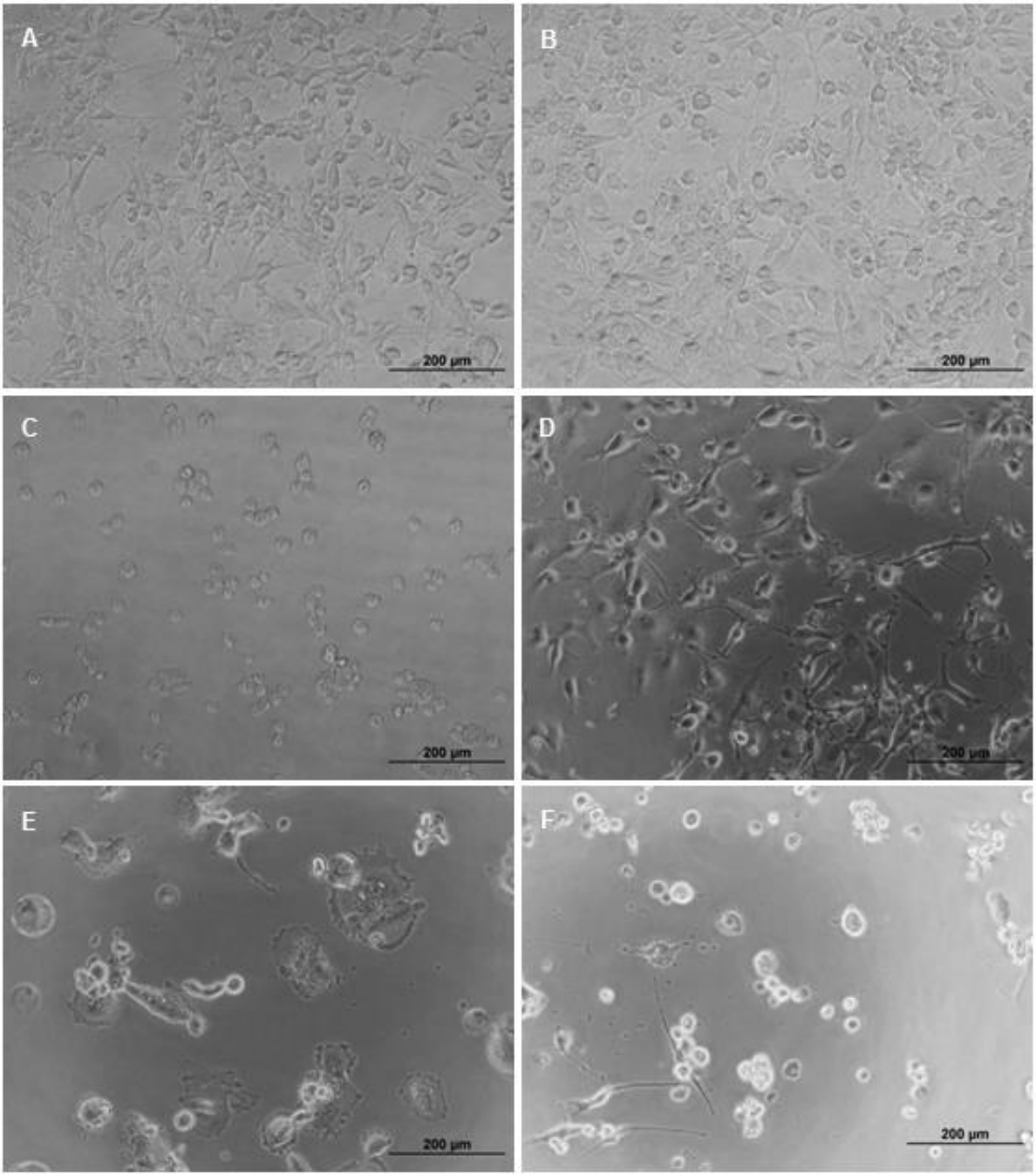


Figura 39. Morfologia celular da linhagem U87MG após 72h de tratamento. (**A**) Controle (células não tratadas). (**B**) Controle DMSO 0,5 %. (**C**) Células tratadas com sanguinarina. (**D**) Células tratadas com **3c**. (**E**) Células tratadas com **4a**. (**F**) Células tratadas com **6e**.

A sanguinarina e os respectivos análogos que apresentaram atividade antitumoral mais promissora (**3c**, **4a** e **6e**) foram testados em linhagem de fibroblastos humanos MRC-5, a qual foi utilizada como um modelo de célula não transformada, com o objetivo de avaliar a seletividade dos compostos desenvolvidos. Assim, culturas de MRC-5 foram expostas a concentrações crescentes dos referido compostos por 72 h e o valor de IC_{50} foi determinado com

base nos dados da análise da viabilidade mitocondrial utilizando o método do MTT. Além disso, a partir dos dados de IC_{50} nesta linhagem, foi determinado o índice de seletividade (IS) (tabela 8). O IS é a relação entre IC_{50} em linhagem não-tumoral (MRC-5) e linhagem tumoral (U87MG). Este valor pode ser utilizado para estimar a segurança do composto, de modo que quanto maior o valor deste índice, maior a diferença entre a IC_{50} em células tumorais e células não tumorigênicas e, portanto, maior seletividade do composto para uso nas células neoplásicas. É considerado significativo para compostos antitumorais um IS igual ou superior a 2, que indica que o composto em análise pode ser aplicado no dobro da concentração sem apresentar citotoxicidade na célula não tumorigênica (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

Tabela 8. Valores de IC_{50} da sanguinarina e seus análogos frente a linhagens U87MG e MRC-5, obtidos pelo método do MTT, e os respectivos índices de seletividade.

Composto	IC_{50} (µM)		Índice de seletividade*
	U87MG	MRC-5	
3c	72,54	38,25	0,5
4a	35,0	85,47	2,4
6e	79,9	153,9	1,9
Sanguinarina	3,0	3,27	1,1

*Índice de seletividade = $\frac{IC_{50}\ (\mu M)\ \text{linhagem não-tumorigênica}}{IC_{50}\ (\mu M)\ \text{linhagem tumoral}}$

O composto **4a** foi o análogo mais seletivo, seguido de **6e**. O composto **3c**, por sua vez, não foi seletivo, assim como a sanguinarina. Embora a sanguinarina tenha sido superior em relação à sua ação em linhagem U87MG, os análogos **6e** e, mais significativamente, **4a**, tornam-se os compostos mais interessantes como candidatos a antitumorais, visto que são potencialmente mais seguros. Estes compostos foram tidos como os mais promissores e, portanto, submetidos aos estudos de modelagem molecular, conforme será apresentado no item 7 do presente trabalho.

5.3.2 Avaliação da indução de morte celular

O mecanismo de indução de morte relacionado ao tratamento com sanguinarina, **3c**, **4a** e **6e** foi avaliado em linhagem U87MG, empregando-se os respectivos valores de IC_{50}. Para tanto, realizou-se dupla marcação das células controle e tratadas com anexina e iodeto de propídio (PI, *propidium iodide*), seguida de análise por citometria de fluxo.

A anexina é uma molécula que se complexa à fosfatidilserina, um fosfolipídio que normalmente encontra-se no interior da membrana celular. Durante a apoptose, este fosfolipídio é externalizado a fim de permitir o reconhecimento celular por macrófagos e, consequentemente, a fagocitose. A anexina liga-se à fosfatidilserina externalizada e permite a quantificação de células em apoptose. O PI, por sua vez, não é capaz de penetrar a membrana celular íntegra. Portanto, a marcação celular com PI indica a população que apresentou perda da integridade da membrana plasmática por dano ou morte celular. Células coradas com fluorescência verde (anexina) foram consideradas células apoptóticas em estado inicial (apoptose precoce), aquelas duplamente marcadas com anexina e PI foram consideradas células em apoptose tardia ou necrose, enquanto células viáveis não apresentam marcação (KOOPMAN et al., 1994) (figura 40A).

A figura 40B mostra que o tratamento com o protótipo sanguinarina aumentou em 70% a população de células em apoptose tardia/necrose, enquanto os compostos **3c**, **4a** e **6e** induziram uma apoptose inicial (50 a 70%), evidenciando um perfil de morte programada desejada nos tratamentos de células tumorais, a qual é considerado um mecanismo de morte limpa, evitando o dano de células normais adjacentes ao tumor, bem como o desenvolvimento de uma resposta imune/inflamatória exacerbada (GALLUZZI et al., 2007; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, esses dados estão em acordo com as alterações morfológicas verificadas nas células U87MG expostas aos referidos compostos (Figura 39), onde o protótipo sanguinarina induziu uma extensiva citotoxidade, evidenciando-se na cultura a presença de restos celulares e de células com vacúolos, comportamento contrário às moléculas sintetizadas.

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância, entre outras coisas, na eliminação de tumores (BERGANTINI; SOUZA; FETT-CONTE, 2005; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Por este motivo, grande parte dos quimioterápicos antineoplásicos disponíveis na terapêutica baseia seu mecanismo na indução da morte celular apoptótica (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; LEMKE; WILLIAMS, 2012).

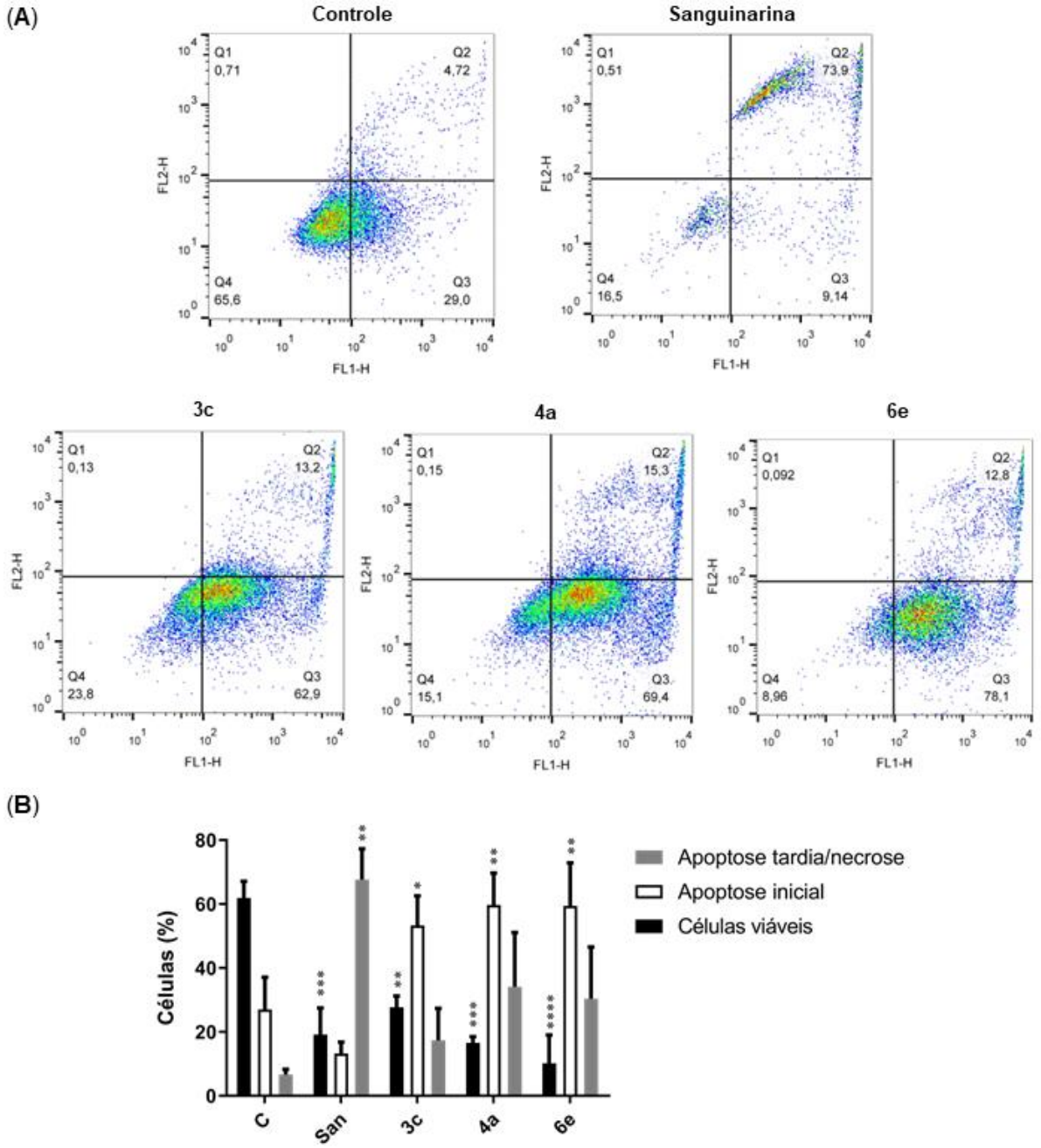


Figura 40. Avaliação da indução de morte celular em linhagem U87MG pela sanguinarina (SAN), **3c**, **4a** e **6e**, utilizando coloração dupla de anexina (FL1-H) e PI (FL2-H). (**A**) Os gráficos de pontos mostram a população de células em apoptose e necrose após 72 h de tratamento com sanguinarina, **3c** e **4a** e **6e** (Q1 = células necróticas; Q2 = células em apoptose tardia; Q3 = células em apoptose precoce; Q4 = células viáveis). (**B**) O gráfico de barras ilustra o aumento do número de células em apoptose e necrose após o tratamento nas concentrações relativas aos valores de IC_{50} sanguinarina (San), **3c**, **4a** e **6e** quando comparado com o grupo controle (**C** - não tratado).

A sanguinarina, por sua vez, induziu a morte celular por necrose, possivelmente devido à sua ação sobre outros alvos, além da Bcl-x_L. A necrose é considerada prejudicial porque geralmente está associada à perda celular patológica e devido à capacidade das células necróticas de promover inflamação, que favorece

o desenvolvimento tumoral. Células necróticas liberam sinais pró-inflamatórios no microambiente do tecido circundante e, como consequência, células inflamatórias do sistema imune são recrutadas para examinar os danos no tecido e remover os detritos necróticos. Paralelamente, estas células imunes inflamatórias podem contribuir no crescimento da neoplasia a partir da promoção da angiogênese, proliferação celular e invasão tecidual (HANAHAN; WEINBERG, 2011; VAKKILA; LOTZE, 2004).

As células necróticas podem também liberar fatores reguladores bioativos, como a IL-1α, que podem estimular a proliferação de células viáveis vizinhas e eventualmente facilitar a progressão neoplásica (GRIVENNIKOV et al., 2010). Portanto, a indução da morte das células tumorais por necrose pode, em certo nível, contribuir para o desenvolvimento tumoral ao recrutar células inflamatórias promotoras de tumor que trazem fatores estimuladores de crescimento para as células sobreviventes (HANAHAN; WEINBERG, 2011; VAKKILA; LOTZE, 2004).

5.3.3 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

A proteína Bcl-x_L participa da via intrínseca (ou mitocondrial) de apoptose. Neste processo, ocorre o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, com consequente liberação de proteínas apoptóticas, como cyt *c* (ELMORE, 2007). O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial implica na despolarização da mesma, que pode ser quantificada pelo uso de corantes fluorescentes catiônicos, como por exemplo, a rodamina 123, que se acumulam na matriz mitocondrial com carga negativa. Neste caso, a indução de morte apoptótica por via extrínseca resulta em menor interação do corante com a membrana mitocondrial e, consequentemente, menor coloração (KANIPANDIAN; LI; KANNAN, 2019).

O ensaio de marcação com o corante fluorescente rodamina 123, avaliou o grau de despolarização mitocondrial em linhagens U87MG frente ao tratamento com os compostos. A figura 41 apresenta imagens representativas da cultura de glioma U87MG após o tratamento por 72 h com a sanguinarina e com os análogos **3c**, **4a** e **6e**. A sanguinarina causou elevada citotoxicidade, que resultou em um baixo número de eventos na análise e impossibilitou a avaliação deste parâmetro.

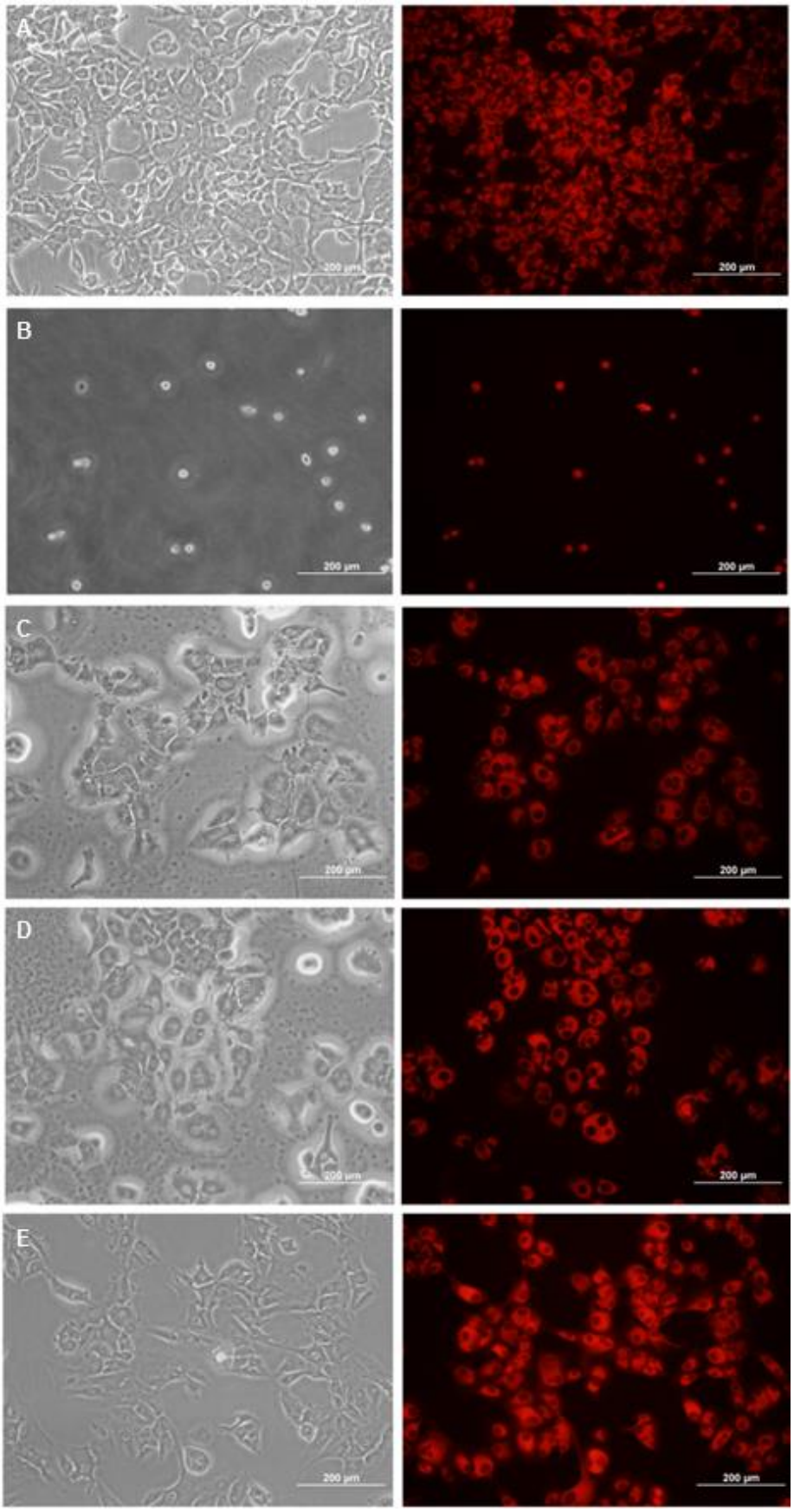


Figura 41. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial utilizando coloração com rodamina 123. A figura mostra cultura de glioma U87MG após o tratamento por 72 h com a sanguinarina (**B**) e com os análogos **3c** (**C**), **4a** (**D**) e **6e** (**E**). (**A**): controle (não tratado).

A figura 42 representa a quantificação da despolarização mitocondrial por citometria de fluxo. Conforme apresentado, o tratamento com os compostos induziu uma despolarização mitocondrial em torno de 15 % das células U87MG, sugerindo que os mesmos poderiam induzir apoptose por via intrínseca. Em conjunto, esses dados estão em acordo com as alterações morfológicas verificadas nas células U87MG expostas aos referidos compostos (Figura 39), onde o protótipo sanguinarina induziu uma extensiva citotoxidade, evidenciando-se na cultura a presença de restos celulares e de células com vacúolos, comportamento contrário às moléculas sintetizadas, onde a morte celular foi predominantemente induzida por apoptose.

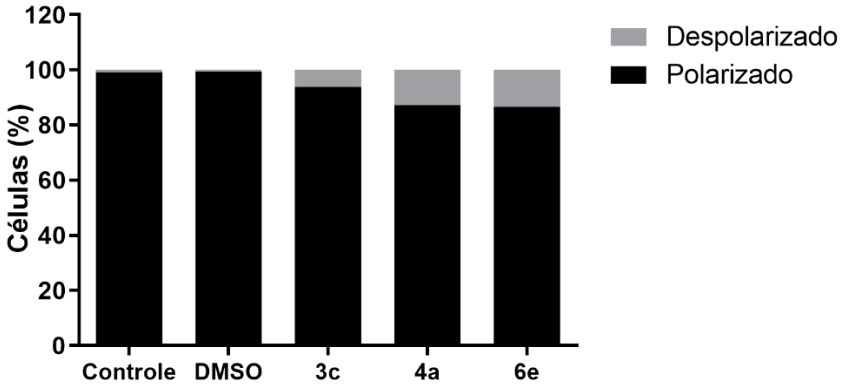


Figura 42. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial utilizando coloração com rodamina 123. O gráfico de barras ilustra o percentual de células despolarizadas após o tratamento com os respectivos valores de IC_{50} de **3c**, **4a** e **6e**.

A despolarização da membrana mitocondrial observada nos experimentos pode sugerir que os compostos **4a** e **6e** induziriam morte apoptótica pela via intrínseca, corroborando o mecanismo proposto para os análogos planejados, que são potencialmente capazes de inibir a proteína antiapoptótica Bcl-x_L. Entretanto, outros ensaios, como por exemplo, de liberação de citocromo *c*, são necessários para atestar a via apoptótica.

5.3.4 Análise do ciclo celular

Eventos relacionados ao ciclo celular representam uma barreira à replicação de células mutadas (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008). No processo de proliferação celular, a progressão pelas diversas fases do ciclo celular é regulada por uma rede bioquímica de sinalização para assegurar a replicação correta do material genético,

segregação dos cromossomos e coordenar a diferenciação, senescência e morte celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009; OGINO et al., 2005; SOUZA, 2011).

O ciclo celular ocorre em quatro fases (figura 43), iniciando-se na fase G_1 (gap 1, interfase), na qual a célula aumenta de tamanho, preparando-se para copiar seu DNA. Na fase seguinte, de síntese (fase S), ocorre a replicação do DNA. Após duplicados os cromossomos, inicia-se a fase G_2 (gap 2), onde a célula cresce mais e sintetiza proteínas e organelas, se preparando para a mitose. Na mitose (fase M), a célula-mãe finalmente se divide ao meio, para produzir duas células filhas. As células-filhas imediatamente entram em fase G_1 e podem reiniciar o ciclo celular ou interromper o ciclo de forma temporária ou definitiva (RIVOIRE et al., 2001).

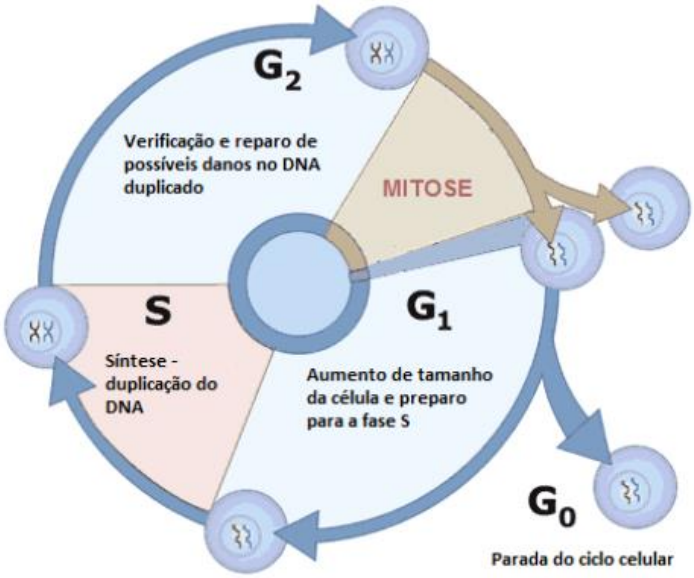


Figura 43. Esquema do ciclo celular normal (adaptado de University of Leicester, 2019).

Durante o ciclo celular, as vias de sinalização, principalmente envolvendo quinases dependentes de ciclinas, monitoram o sucesso de uma fase completada antes de prosseguir para a próxima etapa, processo denominado *check point*. Neste processo, as células podem interromper temporariamente o ciclo celular para reparar danos celulares. Quando o dano não é reparado adequadamente, a sinalização no *check point* pode resultar na ativação da morte celular programada (CHEN, 2016; PIETENPOL; STEWART, 2002; PUCCI; KASTEN; GIORDANO, 2000).

Análise do ciclo celular em linhagem U87MG foi realizada em relação aos compostos com atividade antitumoral mais destacada, de acordo com os dados de IC_{50} previamente determinados, **3c**, **4a** e **6e**. A figura 44 apresenta os histogramas

representativos das análises de ciclo, realizadas em glioma U87MG ao longo de 24, 48 e 72 h de tratamento.

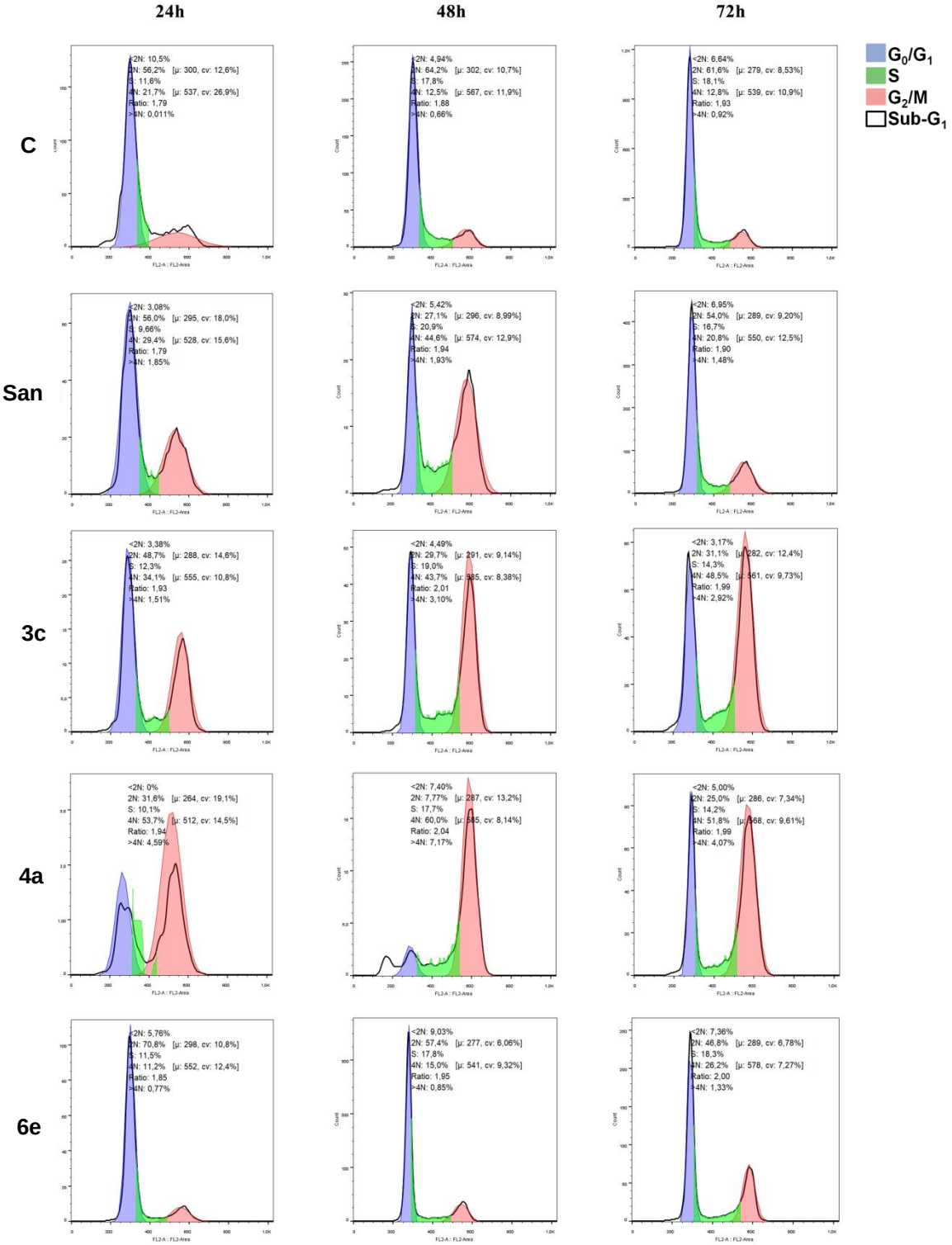


Figura 44. Efeito da sanguinarina, **3c**, **4a** e **6e** sobre a progressão do ciclo celular de linhagem U87MG. As células foram tratadas com concentrações relativas aos valores de IC_{50} do protótipo sanguinarina (San) e com os compostos desenvolvidos **3c**, **4a** e **6e** por 24, 48 e 72h. As fases do ciclo celular são mostradas em histogramas representativos obtidos a partir de citometria de fluxo. **C** = controle (não tratado)

Inicialmente, o protótipo sanguinarina induziu um bloqueio das células U87MG na fase G_2/M do ciclo celular nas primeiras 24 e 48 h de tratamento (figura 45). Entretanto, ao final do tratamento (72 h) esse perfil foi modificado e parte das células ficaram bloqueadas em G_0/G_1 e um percentual menor na fase G_2/M. Importante destacar que o bloqueio do ciclo celular na fase G_0/G_1 foi relatado para a sanguinarina em linhagens DU145 e LNCap (ADHAMI et al., 2004; MALIKOVA; ZDARILOVA; HLOBILKOVA, 2006) e a interrupção do ciclo celular nesta fase é observada para inibidores de proteínas da família Bcl-2 (LIN et al., 2017).

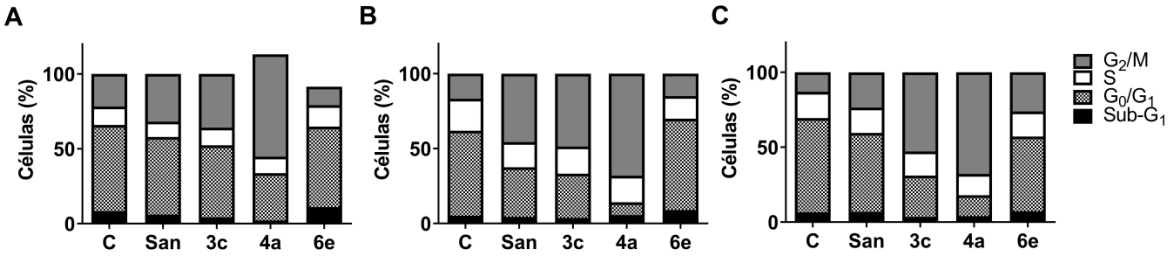


Figura 45. Efeito da sanguinarina (San), **3c**, **4a** e **6e** sobre a progressão do ciclo celular de linhagem U87MG. O gráfico de barras ilustra o percentual de células em cada fase do ciclo celular após 24 (**A**), 48 (**B**) e 72 h (**C**). **C** = controle (não tratado).

Os compostos **3c**, **4a** e **6e**, esse último em menor proporção, levaram as células U87MG a um bloqueio progressivo na fase G_2/M do ciclo celular (Figuras 44 e 45). Interrupção do ciclo celular na fase M é característica de fármacos que atuam em tubulina, como taxanos e alcaloides da vinca, enquanto inibidores de topoisomerase, como etoposídeo e camptotecina, interrompem ciclo celular na fase G_2 (ATTENELLO et al., 2012; CLIFFORD et al., 2003). Não foram encontradas na literatura evidências de que a sanguinarina iniba topoisomerase, embora depleção da enzima esteja associada ao uso do composto (HOLY; LAMONT; PERKINS, 2006). Outros alcaloides benzofenantridínicos, como nitidina e fagaronina, são conhecidamente inibidores de topoisomerase, que interrompem o ciclo celular na fase G_2 (LÉOPOLD COMOË et al., 1988; PRADO et al., 2004; WANG; JOHNSON; HECHT, 1993). É plausível sugerir que **3c** e **4a** podem atuar por um mecanismo de ação distinto do protótipo, ou ainda, que seriam compostos multi-alvo, e que seu efeito citotóxico poderia envolver ação em topoisomerase ou tubulina.

Os achados biológicos, particularmente a atividade em U87MG, os dados de seletividade e de mecanismo de indução de morte celular, trazem os compostos **4a** e **6e** como os análogos mais promissores. Tais compostos foram, portanto, selecionados para os estudos de modelagem molecular.

6 MODELAGEM MOLECULAR

Os métodos *in silico* foram realizados em colaboração com o Dr. Glaucio Monteiro Ferreira, pós doutorando do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP. O detalhamento dos métodos *in silico* é descrito em "parte experimental".

6.1 INTRODUÇÃO

Ferramentas computacionais são atualmente muito úteis e bastante empregadas no desenvolvimento de fármacos. Estas podem ser aplicadas, por exemplo, no planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD – *Computer-Assisted Drug Design*), que é definido como o uso de técnicas computacionais para descobrir, planejar e otimizar compostos biologicamente ativos (SANT'ANNA, 2002).

A modelagem molecular, em planejamento de fármacos, utiliza-se de métodos computacionais para a construção de modelos de estruturas de ligantes e alvos, que fornecem informações sobre suas propriedades moleculares e interações, de grande valia no desenvolvimento de novos compostos bioativos e estudos de relação estrutura-atividade (NADENDLA, 2004; OOMS, 2000; SANT'ANNA, 2002).

Para a construção dos modelos moleculares e cálculo de propriedades, duas principais aproximações podem ser utilizadas: a aproximação clássica, que inclui métodos de mecânica molecular e dinâmica molecular (MD – *Molecular Dynamics*); e a aproximação quântica, que inclui os métodos *ab initio* e semiempírico. Estes métodos permitem otimizar uma estrutura e calcular suas propriedades, incluindo conformação, minimização de energia e propriedades físico-químicas como cargas e momento dipolo (CARVALHO et al., 2003).

A aproximação clássica se baseia no núcleo do átomo, sem considerar seus elétrons. Nela é desenvolvido um campo de força (ex.: AMBER - *Assisted Model Building with Energy Refinement* –, MMFF - *Merck Molecular Force Field*), calculando-se a energia de um sistema em função das posições dos núcleos dos átomos, considerando-se o estiramento de ligação, ângulo de ligação, ângulo de torsão e interações de átomos não ligados (interações eletrostáticas e de Van Der

Waals). Isto gera um conjunto de funções de energia que determinam penalidades energéticas para o afastamento da estrutura dos valores “normais” atribuídos a estes componentes (CARVALHO et al., 2003; LEACH, 2001; SANT’ANNA, 2009).

Médodos de mecânica molecular são úteis na otimização da geometria molecular, enquanto simulações de dinâmica molecular são aplicadas ao estudo do movimento de sistema ao longo do tempo. Embora menos precisos que os métodos quânticos, os métodos clássicos são vantajosos por demandarem um menor custo operacional (CARVALHO et al., 2003; LEACH, 2001; SANT’ANNA, 2009).

Na mecânica quântica, os cálculos são baseados em princípios de física quântica e consideram as interações entre os elétrons e os núcleos dos átomos de uma molécula, calculando-se os orbitais moleculares e propriedades eletrônicas como mapas de potencial elétrostático e momento dipolo (LEMKE; WILLIAMS, 2012; PATRICK, 2013). Enquanto métodos *ab initio* (ex.: Hartree-Fock) consideram toda a população eletrônica da molécula e utilizam-se de equações exatas, sem aproximações, métodos semi-empíricos (ex.: AM1 - *Austin Model 1* -, PM3 - *Parametric Method 3*) consideram apenas os elétrons de valência e se utilizam de aproximações e parâmetros armazenados, a partir de simplificações baseadas em resultados experimentais e em outros resultados teóricos (LEACH, 2001; PATRICK, 2013; SANT’ANNA, 2009; STEWART, 2008, 2009).

Face ao exposto, aproximações quânticas tornam-se úteis no contexto da otimização e cálculo de propriedades dos ligantes sintetizados, enquanto aproximações clássicas, mais especificamente a dinâmica molecular, são aplicáveis às simulações das interações ligante-alvo.

6.2 MÉTODO

As etapas envolvidas nos estudos de modelagem molecular são esquematizadas na figura 46, a seguir. As estruturas da sanguinarina e dos análogos sintetizados foram construídas e otimizadas por métodos semi-empírico PM3 e *ab initio* Hartree-Fock 6-31G** no programa Spartan’14 (WaveFunc., 2014) (FERNANDES et al., 2018). As interações entre Bcl-x_L humana (código PDB: 3SP7, resolução = 1,4 Å) e sanguinarina, e os compostos mais promissores, **4a** e **6e**, foram

calculadas por simulações de dinâmica molecular, utilizando-se o GROMACS (BJELKMAR et al., 2010; DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993; VAN DER SPOEL et al., 2005; VANOMMESLAEGHE et al., 2009; VERMAAS et al., 2016; ZHOU et al., 2012). Para tanto, a conformação inicial do sistema foi estabelecida por ancoramento molecular, o qual foi validado por *crossdocking* no programa GOLD 5.4 (CCDC software limited, 2015) (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

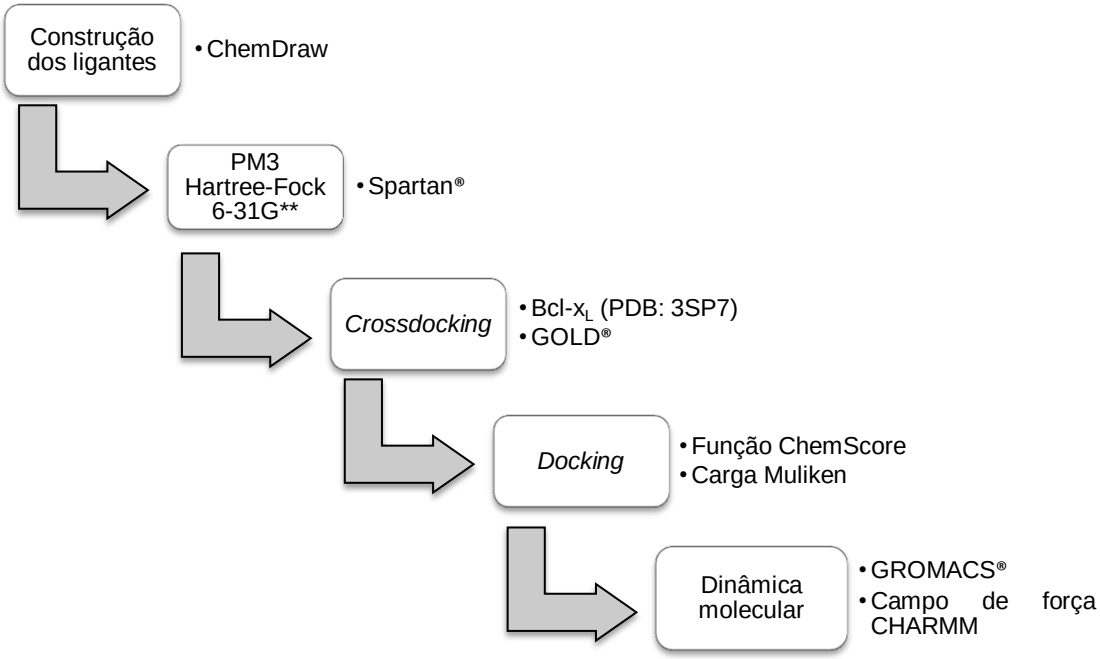


Figura 46. Fluxograma simplificado das etapas desenvolvidas nos estudos de modelagem molecular.

As estruturas dos ligantes previamente construídas e otimizadas tiveram calculadas suas propriedades eletrônicas (mapa de potencial eletrostático, mapas dos orbitais moleculares HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia) e LUMO (orbital molecular não ocupado de menor energia), e vetor de momento dipolo) e lipofílicas (logaritmo do coeficiente de partição calculado – cLog P) no programa Spartan'14 (WaveFun., 2014), a fim de correlacioná-las com os achados biológicos e a simulação de dinâmica molecular (FERNANDES et al., 2018). Adicionalmente, a sanguinarina, **4a** e **6e** tiveram seu perfil farmacocinético predito através do aplicativo SwissADME (DAINA; O; ZOETE, 2017).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Dinâmica Molecular

As proteínas da família Bcl-2 se dividem em três subclasses (proteínas

antiapoptóticas, proteínas proapoptóticas efetoras – ou promotoras de morte – e proteínas proapoptóticas BH3-*only*), de acordo com a sua função na via apoptótica. Proteínas antiapoptóticas e promotoras de morte da família Bcl-2 apresentam em sua estrutura química quatro regiões conservadas de homologia de sequência de aminoácidos, conhecidas como domínios de homologia Bcl-2 (BH – *Bcl-2 Homology*) 1 a 4, além de uma região *C*-terminal hidrofóbica prevista para atuar como uma âncora transmembranar. Enquanto os domínios BH1 e BH2 são essenciais para a atividade das proteínas antiapoptóticas, o domínio BH3 é fundamental para a atividade das proteínas promotoras de morte. A região BH4 pode eventualmente atuar estabilizando outras hélices da proteína por meio de interações hidrofóbicas. A terceira subclasse da família Bcl-2 compreende as proteínas proapoptóticas BH3-*only*, que possuem apenas o domínio BH3, embora algumas delas também apresentem uma âncora transmembrana na porção *C*-terminal (LEE; DOUGLAS FAIRLIE, 2019; MUCHMORE et al., 1996).

Como as demais proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, a estrutura da Bcl-x_L é subdividida em quatro regiões de homologia, sendo funcionalmente as mais importantes BH1, BH2 e BH3. Tais regiões encontram-se espacialmente bastante próximas (figura 47) e formam uma fenda hidrofóbica alongada, que representa um sítio de ligação para membros proapoptóticos da família Bcl-2 (MUCHMORE et al., 1996).

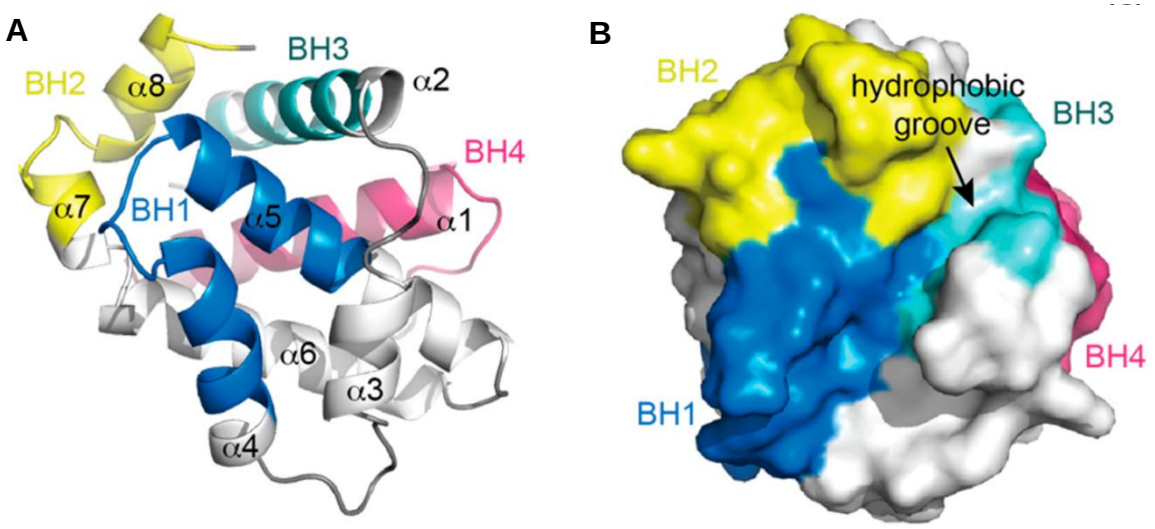


Figura 47. Estrutura da proteína Bcl-xL. (**A**) Representação helicoidal da forma *apo* da Bcl-xL (PDB: 1MAZ), indicando as α-hélices 1 a 7 e destacando os domínios de homologia BH1 (azul), BH2 (amarelo), BH3 (ciano) e BH4 (rosa). (**B**) Representação da superfície da forma *apo* da Bcl-xL, desmonstrando o *groove* hidrofóbico canônico de ligação, constituído principalmente pelas hélices α3 e α5, que é essencial para as interações com as proteínas Bcl-2 proapoptóticas (LEE, 2019).

Diversos estudos envolvendo potenciais inibidores de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 focam principalmente em compostos peptídicos ou pequenas moléculas peptídeo-miméticas, que interagem com o *groove* hidrofóbico onde atuam os ligantes endógenos. Entretanto, estudos de Zhang e colaboradores (2006) sugerem que a sanguinarina se comportaria como um inibidor alostérico da Bcl-x_L, que interage prioritariamente em outros resíduos na região BH1 e causa uma alteração conformacional que impede a ligação de proteínas efetoras na fenda hidrofóbica.

Zhang verificou por métodos HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence* – Coerência Quântica Única Heteronuclear*)* de ressonância magnética nuclear que a ligação da sanguinarina na Bcl-x_L causa alterações nos sinais principalmente referentes aos resíduos Arg100, Glu129 e Gly134. Variações também foram verificadas para Ser106, Ile114, Arg132, Asp133, Val135, Trp137, Gly138, Tyr173 e His177, que compõem principalmente a região BH1. Perturbações menos significativas em resíduos do *groove* hidrofóbico também foram observadas (Leu99, Tyr101, Arg103, Asp107 e Trp109). Adicionalmente, a ligação da sanguinarina na Bcl-x_L foi afetada na presença de variantes na região BH1, particularmente as variantes que resultam na troca dos aminoácidos Glu129, Leu130 e Asp133, o que reforça a importância do resíduo Glu129 para a ligação do alcaloide à proteína.

Corroborando suas análises por HSQC, Zhang (2006) realizou estudos de *docking* molecular, verificando que a sanguinarina ancorou na região BH1, em uma porção próximo ao *groove* hidrofóbico de ligação BH3. Interação foi observada com o resíduo Glu129, bem como com Leu130, com o qual foram verificadas interações hidrofóbicas (figura 48). Asp133, por sua vez, ficou próximo à carga positiva do átomo de nitrogênio. Outro ponto importante descrito pelos autores foi o grupo metilenodioxi da porção fenantridínica orientado para as cadeias laterais alifáticas de Arg132, enquanto o –OCH_2O– ligado ao benzeno ficou flanqueado entre os resíduos aromáticos Phe97 e Phe105.

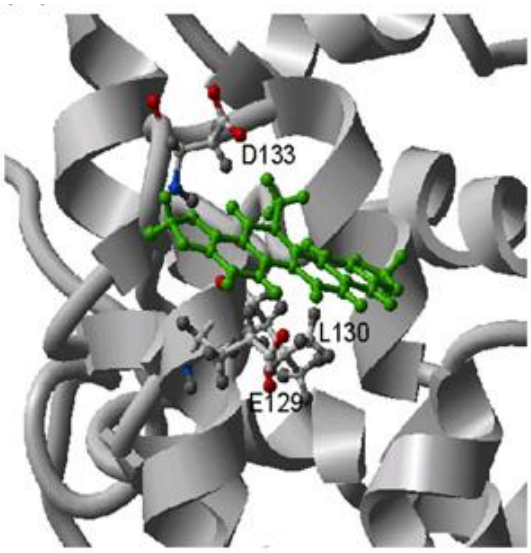


Figura 48. Modelo de interação da sanguinarina com Bcl-xL, proposto por Zhang e colaboradores (2006), destacando os resíduos Glu129 (E129), Leu130 (L130) e Asp133 (D133), próximos ao ligante.

Os dados apresentados por Zhang sugerem que Glu129 representa um resíduo-chave para as interações entre a sanguinarina e Bcl-x_L. Por este motivo, Glu129 foi selecionado como centroide para o ancoramento molecular do presente trabalho. Este corresponde a uma etapa prévia às simulações de dinâmica molecular (MD – *Molecular Dynamics*), realizada para gerar a conformação inicial do sistema.

A MD permitiu simular as interações entre os compostos em estudo e seu respectivo alvo. De acordo com os resultados de MD, a sanguinarina e os análogos estudados (**4a** e **6e**), seriam capazes de interagir na região BH1. A figura 49, a seguir, apresenta a estrutura representativa de cada complexo (sanguinarina, **4a** e **6e**) e ilustra seu modo de interação com a referida região do alvo, sendo possível observar que as estruturas dos análogos adentra *o groove* hidrofóbico canônico de ligação BH3.

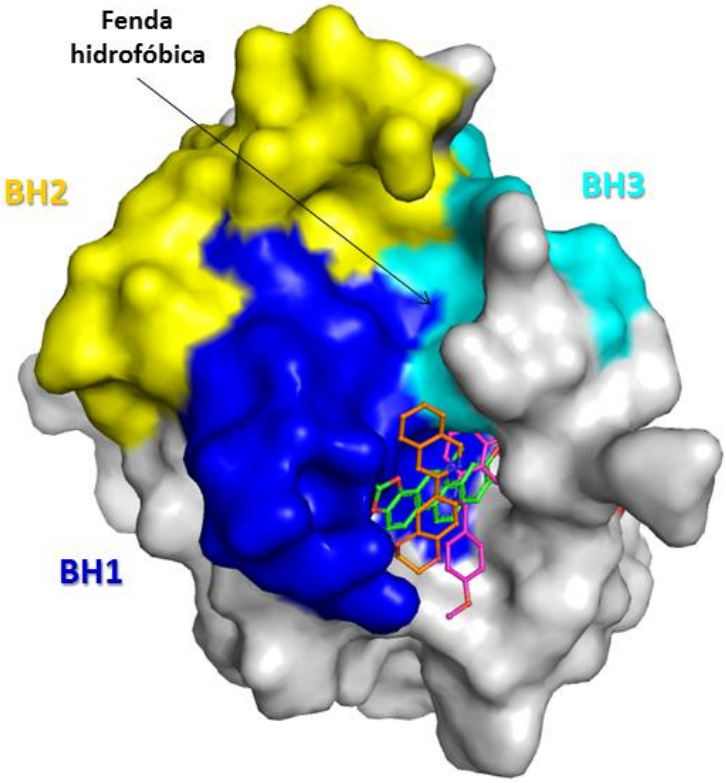


Figura 49. Representação da superfície da Bcl-xL, desmonstrando o modo de interação da sanguinarina (verde), **4a** (magenta) e **6e** (laranja).

A análise de trajetória da dinâmica molecular sugere que a sanguinarina pode realizar algumas das interações previamente sugeridas por Zhang (2006), com os resíduos Phe97, Phe105, Glu129, Leu130 e Arg132 (figura 50A). Estas interações correspondem, predominantemente, a interações hidrofóbicas, visto que tanto a sanguinarina como a região de interação são significativamente apolares, embora o grupo metilenodioxi da porção fenantridínica pareça importante para ligação de hidrogênio e íon-dipolo com Arg132. Ademais, outras interações polares (ex.: Ala104), especialmente para as conformações de maior estabilidade, também foram observadas, além de interações hidrofóbicas com Leu108 e Phe146.

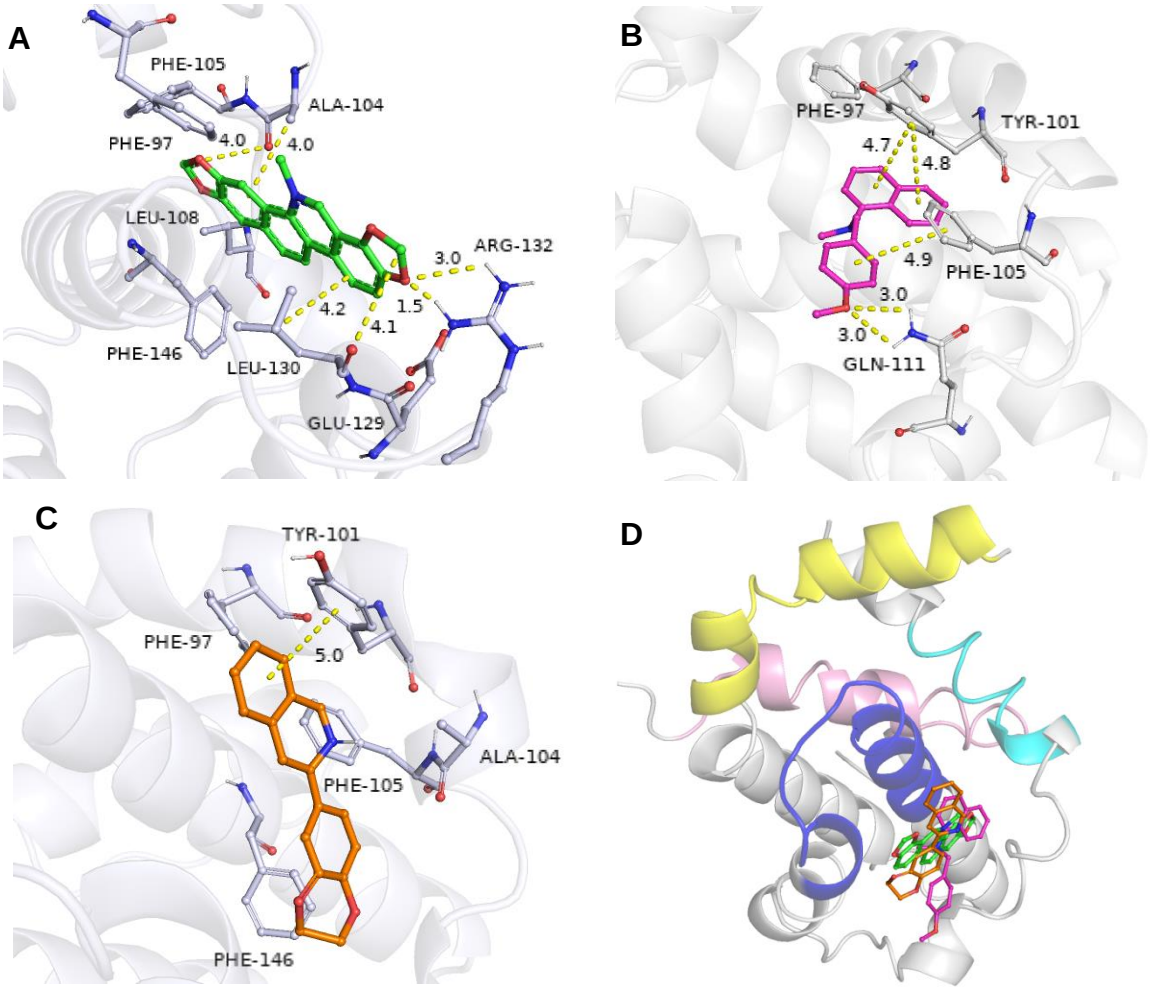


Figura 50. Interações entre a proteína Bcl-x_L (PDB 3SP7) e os ligantes sanguinarina, **4a** e **6e**, observadas nas trajetórias de dinâmica molecular. As linhas amarelas pontilhadas destacam as distâncias das interações observadas para as respectivas conformações de maior estabilidade.(**A**) Interação sanguinarina-Bcl-x_L. (**B**) Interação **4a**-Bcl-x_L. (**C**) Interação **6e**-Bcl-x_L. (**D**) Orientação da sanguinarina (verde), **4a** (magenta) e **6e** (laranja) no sítio de interação da Bcl-x_L. Os resíduos Phe97, Tyr101, Ala104, Phe105, Leu108, Gln111 e Phe146, destacados nas figuras, estão envolvidos em interações com proteínas proapoptóticas, que se ligam ao *groove* hidrofóbico (CZABOTAR et al., 2011; LEE et al., 2009; RAJAN et al., 2015).

É importante ressaltar que, como os próprios autores criticam, perturbações no deslocamento químico da amida do *backbone* podem ser causadas tanto por interações diretas com o ligante como por alterações estruturais da proteína induzidas pelo ligante, e, portanto, não é possível definir o local exato de interação da sanguinarina com base nos achados de Zhang. Isto poderia justificar eventuais diferenças nos resultados obtidos na MD e no que é discutido por estes autores .

O composto **4a** teve o nitrogênio posicionado em coordenada próxima à do nitrogênio da sanguinarina, embora tenham sido observadas interações hidrofóbicas com resíduos distintos (Tyr101 e Phe105) (figura 50B). Ligação de hidrogênio entre a metoxila e o resíduo Gln111 também foi verificada, indicando que este grupo pode

ser importante para a atividade biológica. Para o composto **6e**, por outro lado, não se observou ligações de hidrogênio, o que poderia justificar a atividade inferior, uma vez que interações hidrofóbicas, realizadas pelo composto (figura 50C), são mais fracas (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010). Ademais, verifica-se certa sobreposição de anéis do composto **4a** em relação a anéis da sanguinarina, o que não é observado para **6e** (figura 50D).

O gráfico da variação do desvio médio da raiz quadrada (RMSD – *Root Mean Square Deviation*) (figura 51A) mostra que o complexo ligante-alvo estabilizou a partir de 50 ns e que a variação dos RMSD da sanguinarina e análogo **4a** foi similar, sugerindo que estes compostos apresentariam afinidade semelhante com o alvo. Entretanto, a sanguinarina foi cerca de dez vezes mais ativa do que os análogos frente às células U87MG, o que pode ser justificado pelo fato de que a mesma induz morte celular por diferentes mecanismos, e não somente por inibição de Bcl-x_L, conforme previamente discutido (ex.: intercalação de DNA, inibição de di-idrofolato redutase). A avaliação biológica na proteína isolada ou análise cristalográfica do complexo ligante-alvo seriam necessárias para validar os resultados observados na MD.

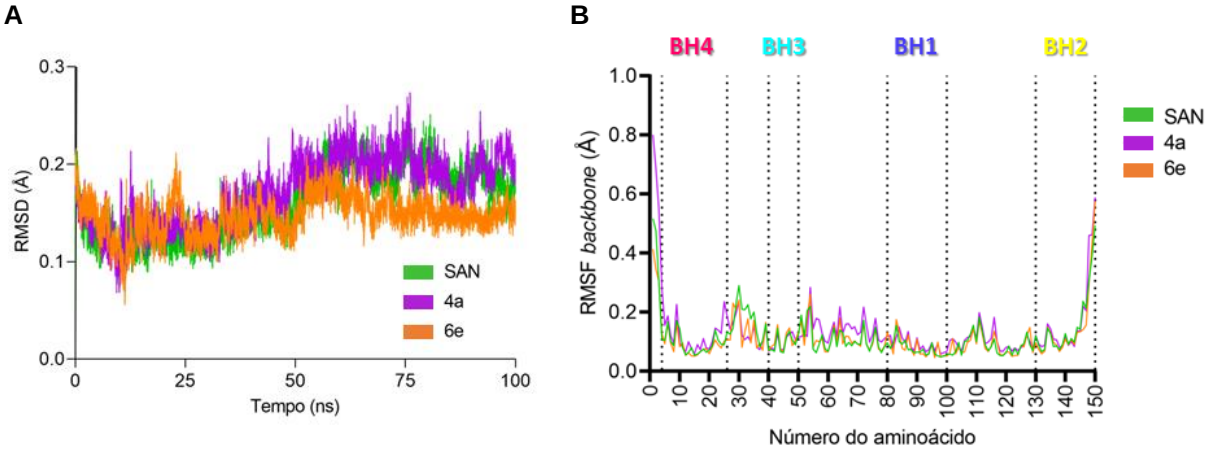


Figura 51. Análise da trajetória da dinâmica molecular. (**A**) Variação do desvio da raiz quadrada média (RMSD) (**B**) Variação da flutuação da flutuação da raiz quadrada média (RMSF).

A flutuação da raiz quadrada média (RMSF - *Root Mean Square Flutuation*) expressa a flutuação de cada um dos aminoácidos individualmente mediante à conformação de maior estabilidade da proteína, indicando a influência da interação ligante-alvo em resíduos que compõem outras regiões além do sítio de interação. Isto permite observar a maneira como os ligantes (sanguinarina, **4a** e **6e**) afetam, por exemplo, resíduos do *groove* hidrofóbico de interação BH3. Discreta variação do

RMSF nos resíduos 105 a 120, que compõem o *groove* hidrofóbico, é observada (figura 51B). O RMSF sugere que a interação com os compostos causa perturbações principalmente nos resíduos 25 a 35, que inclui alguns aminoácidos dominio BH4 da proteína Bcl-x_L, sendo esta mais pronunciada para a sanguinarina, seguida de **4a** e **6e**, em menor intensidade (MUCHMORE et al., 1996).

Tomados em conjunto, os resultados sugerem que a sanguinarina e os análogos **4a** e **6e** poderiam interagir com a proteína Bcl-x_L na região BH1. Interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos dos compostos e diferentes resíduos apolares da região se caracterizam como as mais frequentes na análise de trajetória da MD. Isto reforça a relevância dos sistemas anelares para atividade biológica dos compostos.

Interações polares também foram observadas para a conformação de maior estabilidade da sanguinarina, que foram mais frequentes em comparação com os análogos. Tais interações, mais fortes que interações hidrofóbicas, podem implicar em maior afinidade pelo alvo e explicar sua atividade superior (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010). A ligação de hidrogênio observada para a metoxila de **4a** e sua atividade superior ao composto **6e** reforçam a importância de grupos aceptores de ligação de hidrogênio na molécula. Embora o composto **6e** apresente um grupo etilenodioxi, a orientação no sítio de interação adotada pelo composto parece não possibilitar ligações de hidrogênio e pode justificar sua atividade inferior.

6.3.2 Determinação de propriedades físico-químicas

No contexto das interações ligante-alvo, a distribuição eletrônica da molécula é um fator determinante na complementaridade molecular (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010). No intuito de corroborar as interações observadas na MD e fornecer informações a respeito da relação estrutura-atividade, os mapas de orbital molecular e vetor de momento dipolar (μ) foram calculados.

Os mapas de distribuição de HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital* – orbital molecular ocupado de maior energia) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* – orbital molecular desocupado de menor energia) da sanguinarina e do composto **6e** foram semelhantes (figura 52). Entretanto, diferenças significativas nos

valores apresentados pela sanguinarina em relação aos análogos podem justificar diferenças no perfil de interação. Um menor valor de HOMO (sanguinarina = -10,69 eV; **4a** = -7,73 eV; **6e** = -7,45 eV) parece estar relacionado com uma maior atividade biológica, tendo em vista que a sanguinarina foi o composto mais ativo, seguido de **4a** e **6e**.

O mapa de distribuição de HOMO encontra-se bem distribuído para as moléculas da sanguinarina e **6e**, enquanto no composto **4a** encontra-se concentrado na região correspondente aos anéis B e C, onde também se verifica seu respectivo mapa de LUMO. Para a sanguinarina e **6e** observa-se que o mapa de LUMO encontra-se na região referente aos anéis D e E.

A ausência de orbital LUMO significativo no carbono metilênico ligado à porção fenantridínica da sanguinarina sugere que a interação de Van Der Waals observada entre o mesmo e o oxigênio da Leu130 na MD seria do tipo dipolo induzido. Entretanto, a carga eletrostática deste carbono corresponde a + 0,190 e pode justificar uma interação dipolo permanente. A mesma inferência pode ser aplicada ao metileno da porção benzênica (carga eletrostática = 0,219), que parece interagir com o oxigênio de Ala104.

Outras observações relacionadas aos mapas de orbital molecular parecem não corroborar as interações observadas na MD. Por exemplo, não foi observado HOMO significativo na metoxila de **4a**, que foi tida na MD como um grupo aceptor de ligação de hidrogênio. Entretanto, sua carga eletrostática (-0,360) justifica a ligação de hidrogênio com o resíduo Gln111. O composto **6e**, por sua vez, apresentou HOMO distribuído sobre os oxigênios, que correspondem a grupos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA), porém estes parecem não realizar ligações de hidrogênio com o alvo.

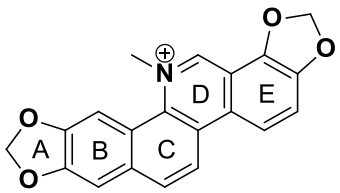
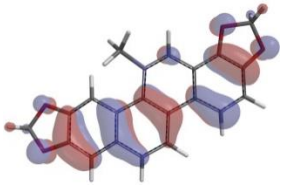
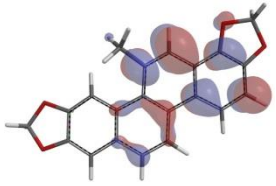
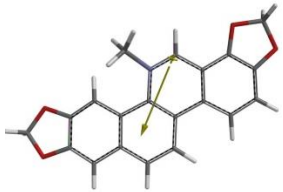
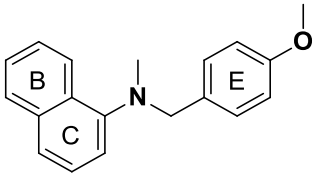
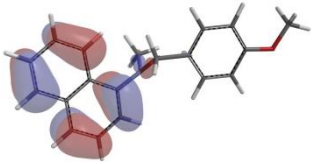
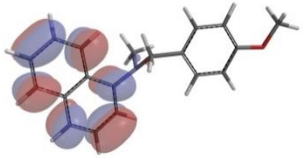
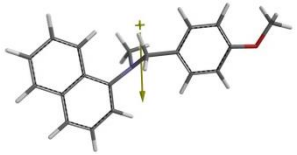
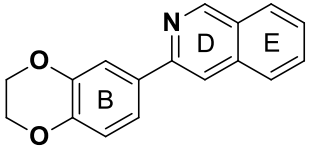
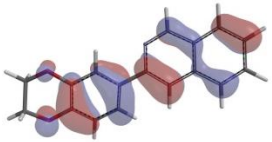
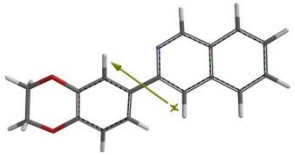
	Estrutura	Mapa de orbital molecular HOMO	Mapa de orbital molecular LUMO	Vetor de momento de dipolo
Sanguinarina		 -10,69 eV	 -2,47 eV	 3,95 Debye
4a		 -7,73 eV	 2,79 eV	 1,58 Debye
6e		 -7,45 eV	2,36 eV	 1,01 Debye

Figura 52. Representação das estruturas da sanguinarina, **4a** e **6e**, destacando os anéis **A**, **B**, **C**, **D** e **E**, e seus respectivos mapas de orbital molecular e vetor de momento de dipolo.

O vetor de momento dipolo consiste no produto da soma total de cargas positivas ou negativas e a distância entre seus centroides (SÁ JUNIOR et al., 2013). Os vetores de momento de dipolo da sanguinarina e **4a** estão orientados de uma maneira semelhante, partindo carbono adjacente ao nitrogênio em direção ao anel C. Isto se refletiu em uma conformação similar dentro do sítio de interação, onde os anéis B e C dos dois compostos se encaixam na mesma região. Apesar desta semelhança, vale ressaltar que a sanguinarina apresentou valor superior de μ e valores superiores parecem favorecer a atividade biológica. O composto **6e**, por sua vez, apresenta orientação do momento dipolar distinta, assim como um encaixe no alvo que não se sobrepõe à estrutura da sanguinarina.

6.3.3 Predição do perfil farmacocinético *in silico*

Enquanto propriedades eletrônicas e estéricas são particularmente importantes para a interação fármaco-alvo, propriedades hidrofóbicas impactam de maneira significativa na farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção – ADME) de um composto (TESTA et al., 2000; TSOPELAS; GIAGINIS; TSANTILI-KAKOULIDOU, 2017).

O perfil de distribuição do fármaco, bem como absorção, metabolismo e excreção são altamente relevantes no desenvolvimento de fármacos, visto que muitos candidatos a fármacos fracassam em sua eficácia terapêutica por razões farmacocinéticas. Análise *in silico* do ADME torna-se, portanto, uma ferramenta útil na previsão destes parâmetros e contribui para a otimização de compostos bioativos (PATEL; PATEL, 2017; SMITH et al., 2018).

No intuito de determinar a lipofilicidade dos compostos, as moléculas construídas e otimizadas para fins de cálculo de propriedades eletrônicas na seção anterior (6.3.2) foram também submetidas a cálculo de Log P no programa Spartan’14. Foi verificado que os compostos analisados apresentam valores de cLogP relativamente elevados (tabela 9), o que expressa uma característica lipofílica destas moléculas. Isto é particularmante importante no contexto de um tumor encefálico, onde o fármaco necessita ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) para atingir o seu local de ação (FERNANDES et al., 2016; VAN TELLINGEN et al., 2015).

Tabela 9. Predição *in silico* do perfil farmacocinético da sanguinarina, **4a** e **6e**.

	Sanguinarina	4a	6e
cLog P	4,08	4,92	3,30
Permeia BHE	sim	sim	sim
Absorção pelo TGI	alta	alta	alta
Hidrossolubilidade	baixa	baixa	baixa
Substrato para P-gp	sim	não	sim

No intuito de corroborar a inferência em relação à permeabilidade dos compostos pela BHE, as estruturas da sanguinarina, **4a** e **6e** foram analisadas no aplicativo SwissADME, que calcula propriedades físico-químicas de moléculas e simula seu perfil farmacocinético (DAINA; O; ZOETE, 2017). A análise (tabela 9) indicou que as três substâncias seriam capazes de permear a BHE, reforçando que as mesmas apresentariam um perfil de distribuição favorável.

Além da permeação pela BHE, outras propriedades e parâmetros farmacocinéticos foram avaliados. Alta absorção pelo trato gastrintestinal (TGI) foi prevista para as moléculas, indicando potencial uso por via oral. Em contrapartida, baixa hidrossolubilidade é sugerida para os compostos, o que pode implicar em problemas de dissolução no trato gastrintestinal ou em formulações. Vale ressaltar que baixa hidrossolubilidade é comumente observada em antitumorais de origem natural, como paclitaxel e etoposídeo (BRANDÃO et al., 2010).

A análise *in silico* também revelou que a sanguinarina e **6e** seriam substratos para a proteína de efluxo glicoproteína P (ABCB1). Esta proteína está relacionada com mecanismos de resistência das células tumorais frente aos quimioterápicos antineoplásicos. Proteínas transportadoras de efluxo ABC, como ABCB1 e ABCG2, estão relacionadas à resistência de glioblastoma frente à quimioterapia e menor sobrevida do paciente (EMERY et al., 2017; MUNOZ et al., 2014; SCHAICH et al., 2009; WIJAYA; FUKUDA; SCHUETZ, 2017). Estes transportadores estão presentes tanto na célula tumoral como na BHE. Assim, além da própria BHE limitar a distribuição dos fármacos para o SNC, transportadores presentes na mesma representam mais um bloqueio neste sentido e dificultam o tratamento de tumores do SNC.

Embora inicialmente este dado pareça negativo, Saeed e colaboradores (2018) relatam que a sanguinarina atua como um inibidor de transportador ABCB1, propriedade que eventualmente poderia ser verificada em seus análogos. A inibição

destes transportadores pode contribuir para uma melhor eficácia do tratamento quimioterápico frente ao glioblastoma tanto no que se refere à distribuição do fármaco como na sua ação sobre a célula tumoral (FALLACARA et al., 2019; PERAZZOLI et al., 2015)**.** Adicionalmente, inibidores de transportadores de efluxo podem ser empregados como adjuvantes na terapia antitumoral, proporcionando maior eficácia do tratamento (PEÑA-SOLÓRZANO et al., 2018; SAEED et al., 2018). Portanto, a interação da sanguinarina e, eventualmente, de **6e** com esta proteína, pode ser explorada como uma vantagem destes compostos no contexto da terapia antineoplásica.

Ao mesmo tempo, a simulação indicou que o composto **4a** não seria substrato para a glicoproteína P e, portanto, o mesmo não teria sua eficácia prejudicada por este tipo de mecanismo de resistência. Isto representa uma vantagem do composto, que somada à sua citotoxicidade, seletividade e mecanismo de indução de morte celular (apoptose), enaltece o seu potencial como antitumoral e o sucesso da simplificação molecular da sanguinarina na obtenção de compostos úteis à pesquisa e desenvolvimento de novos antineoplásicos.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente projeto consistiu no planejamento e síntese de análogos simplificados da sanguinarina e avaliação do seu potencial antitumoral. Três séries de análogos foram propostas, a saber, *N*-benzil-naftil-amina (série I), aril-isoquinolina (série II) e benzofenantridina (série III). As séries I e II tiveram estabelecidas as respectivas condições reacionais, sendo obtidos dez análogos para cada uma, a partir de métodos clássicos de condensação, redução, acoplamento cruzado e substituição nucleofílica. Para a série III, foram obtidos intermediários de síntese iniciais, porém a síntese dos compostos benzofenantridínicos foi impossibilitada pelo insucesso na etapa de ciclização para obtenção dos intermediários tetracíclicos através de reação Heck-*type.* Dentre os vinte compostos finais obtidos, dez são inéditos, e os mesmos foram caracterizados por RMN ^{1}H e ^{13}C, faixa de fusão e cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises corroboraram a obtenção e pureza dos compostos, que foram então submetidos à avaliação biológica. Os compostos foram testados em linhagem U87MG de glioblastoma e apresentaram valores de IC_{50} entre 26 e 93 µM, inferiores à temozolamida (> 100 µM), reforçando o potencial antitumoral dos compostos. Verificou-se que a série *N*-naftil-benzil-amina gerou os compostos mais ativos, embora outros padrões de relação estrutura-atividade não tenham sido observados.

Apesar da sanguinarina ter apresentado atividade superior nesta linhagem, os análogos foram otimizados no que se refere à seletividade, o que foi verificado pela avaliação da citotoxicidade em linhagem não tumorigênica MRC-5, sendo que os compostos avaliados apresentaram um valor de índice de seletividade (~ 2,0) que corresponde ao dobro do valor encontrado para a sanguinarina. Estudos dos mecanismos de indução de morte celular demonstraram que a sanguinarina induziu morte celular por necrose, enquanto os compostos mais promissores, **4a** (*N*-benzilnaftil-amina) e **6e** (aril-isoquinolina) induzem morte celular por apoptose, representando uma vantagem valiosa dos análogos em relação ao protótipo. Adicionalmente, o composto **4a** promoveu interrupção do ciclo celular na fase G_2/M, o que o caracteriza como um agente ciclo celular específico e indica que o composto pode apresentar outros mecanismos para sua ação citotóxica, visto que para a

inibição de Bcl-x_L seria esperado aumento da população de células nas fases G_0/G_1 ou sub-G_1.

Em relação à modelagem molecular, as simulações de dinâmica molecular sugerem que a sanguinarina, bem como os análogos **4a** e **6e**, interagem com a Bcl-xL na região BH1, principalmente através de interações hidrofóbicas, e que a afinidade do composto **4a** pela proteína é semelhante à sanguinarina, embora esta apresente atividade superior, possivelmente devido sua ação sobre outros alvos. Os valores de cLog P, associados à predição *in silico* do perfil farmacocinético, sugerem que os compostos são capazes de permear a BHE, propriedade fundamental no contexto do tratamento de glioblastoma.

Embora os objetivos tenham sido parcialmente atingidos, é possível concluir que a estratégia de simplificação molecular da sanguinarina permitiu a obtenção de compostos com potencial antitumoral relevante, e que os mesmos representam um arcabouço que merece a atenção dos químicos medicinais no sentido de otimizar sua atividade e desenvolver candidatos a antitumorais.

Perspectivas para o trabalho incluem o aprofundamento da avaliação biológica, tendo em vista que os resultados obtidos evidenciam o potencial antitumoral dos análogos. Estudos que confirmem morte celular apoptótica por via extrínseca podem gerar evidências da ação dos compostos no alvo sugerido (Bcl-x_L). Almeja-se, ainda, a expansão do painel de células, que poderia revelar uma ação superior dos análogos em outras linhagens tumorais.

8 PARTE EXPERIMENTAL

8.1 QUÍMICA

8.1.1 Reagentes e solventes utilizados

Os reagentes empregados na síntese das *N*-benzil-naftil-aminas, aril-isoquinolinas e intermediários de síntese das benzofenantridinas foram fornecidos pela Sigma-Aldrich ou Oakwood. Os solventes utilizados são provenientes da Synth, dos quais o CH_2Cl_2 e MeCN foram tratados com CaH_2, THF foi tratado com sódio e benzofenona, e DMF foi tratado com sulfato de magnésio. O hexano foi tratado por destilação simples. Os demais solventes e reagentes foram utilizados sem tratamento prévio.

8.1.2 Métodos cromatográficos

O acompanhamento das reações foi realizado por CCD (cromatografia em camada delgada), utilizando cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica GF_{254} (Merck). A revelação das placas foi feita por luz de ultravioleta (UV) e soluções reveladoras de ninidrina, molibdato e vanilina.

Para a separação e purificação dos produtos obtidos foram utilizadas colunas de vidro preenchidas com sílica-gel 60 (Merck). Os eluentes utilizados na fase móvel são descritos em “procedimento experimental”.

Na determinação da pureza dos compostos sintetizados foi aplicada a cromatografia líquida de alta eficiência, empregando-se o cromatógrafo Shimadzu Proeminence com coluna analítica C-18 da marca Gemini® (5µ, 150 x 4,6 mm). A detecção foi conduzida por ultravioleta (UV) em 254 nm. Como sistema eluente utilizou-se água deionizada e acetonitrila, ambos com 0,1 % de ácido trifluoracético. A corrida cromatográfica iniciou com 5 % de acetonitrila e em 10 minutos passou a 100 % do mesmo. O tempo total de corrida foi de 25 minutos e o volume de injeção foi 20 µL.

8.1.3 Métodos espectrométricos por ressonância magnética nuclear

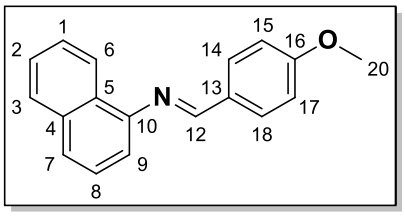
As amostras avaliadas foram diluídas em clorofórmio ou DMSO deuterados (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). As análises espectroscópicas de RMN ^{1}H e de ^{13}C foram realizadas em espectrômetro Bruker® 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, disponível na FCF-USP. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm). Abreviações para denotar a multiplicidade de um sinal em particular são: s (singleto); d (dubleto); q (quarteto); quint (quinteto), sx (sexteto e m (multipleto).

8.1.4 Métodos sintéticos

8.1.4.1 Obtenção das *N*-benzil-naftil-iminas

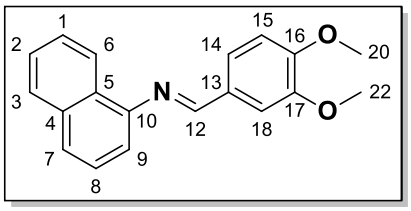
3 mmol de nafitil-amina (429 mg) e 3 mmol do benzaldeído substituído (**1a**-**e**) foram dissolvidos em 15 mL de metanol. A reação foi mantida em agitação à temperatura ambiente e abrigo da luz. Após 24 h de reação, o precipitado formado (**2a**-**e**) foi filtrado à vácuo e lavado com metanol gelado.

(*E*)-1-(4-metoxifenil)-*N*-(naftalen-1-il)metanimina (**2a**)



Sólido amarelo claro. η = 94 %. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8,45 (s, 1H, 12-CH), 8,33 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 6-ArH); 7,95 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, 14, 18-ArH); 7,83 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 3-ArH); 7,68 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, 7-ArH); 7,50-7,41 (m, 3H, 1, 2, 8-ArH); 7,02-6,99 (m, 3H, 9, 15, 17-ArH); 3,87 (s, 3H, 20-CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 162,3 (C12); 159,6 (C16); 149,6 (C10); 133,9 (C4); 130,6 (C14, C18); 129,6 (C3); 128,9 (C5); 127,6 (C13); 126,3 (C5); 126,0 (C1); 125,6 (C8); 125,3 (C2); 124,0 (C6); 114,2 (C15, C17); 112,7 (C9); 55,4 (C20).

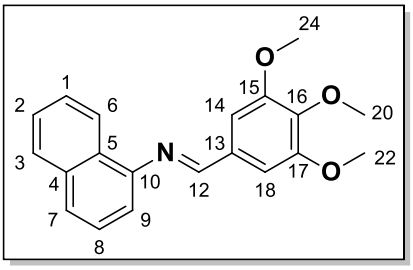
(*E*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-(naftalen-1-il)metanimina (**2b**)



Sólido amarelo. η = 77 %. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8,49 (s, 1H, 12-CH); 8,37 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 6-ArH); 7,89 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 3-ArH); 7,79 (d, 1H, *J* = 1,6 Hz, 18-ArH); 7,73 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH); 7,56-

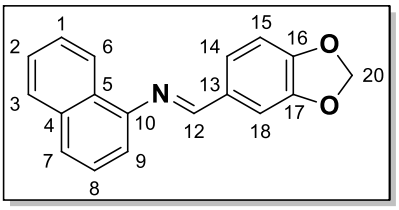
7,52 (m, 2H, 1,2-ArH); 7,49 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH) 7,43 (dd, 1H, *J* = 1,6 Hz, *J* = 8,0 Hz, 14-ArH); 7,07 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH); 7,00 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, 15-ArH); 4,06 (s, 3H, 20-CH_3); 4,01 (s, 3H, 22-CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 159,8 (C12); 152;2 (C16); 149,6 (C17); 133,9 (C10); 129,8 (C4); 128,8 (C13); 127,6 (C3); 126,5 (C5); 126,4 (C7); 126,3 (C2); 125,6 (C14); 125,4 (C8); 124,4 (C2); 123,9 (C6); 112,8 (C9); 110,6 (C15); 109,3 (C18); 56,0 (C20, C22).

(*E*)-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-*N*-(naftalen-1-il)metanimina (**2c**)



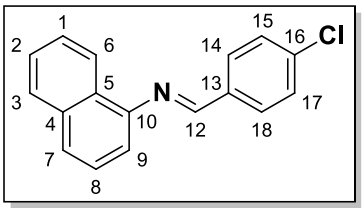
Sólido amarelo. η = 87 %. RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8,43 (s, 1H, 12-CH); 8,31 (t, 1H, *J* = 4,66 Hz, 6-ArH); 7,85 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 3-ArH); 7,70 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH); 7,52-7,49 (m, 2H, 1,2-ArH); 7,45 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), 7,26 (s, 2H, 14, 18-ArH); 7,02 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, 9-ArH); 3,97 (s, 6H, 22, 24-ArH); 3,94 (s, 3H, 20-ArH). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 159,9 (C12); 153,6 (C10); 149,3 (C16); 141,2 (C4); 133,9 (C13); 131,9 (C3); 128,7 (C5); 127,6 (C7); 126,4 (C1, C2); 126,0 (C8); 125,7 (C15, C17); 123,9 (C6); 112,8 (C9); 106,0 (C14, C18); 61,0 (C20); 56,3 (C22, C24).

(*E*)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-*N*-(naftalen-1-il)metanimina (**2d**)



Sólido amarelo. η = 72 %. RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8,40 (s, 1H, 12-CH); 8,33 (t, 1H, *J* = 6 Hz, 6-ArH); 7,84 – 7,81 (m, 1H, 3-ArH); 7,68 (d, 1H, *J* = 7 Hz, 7-ArH); 7,67 (s, 1H, 18-ArH); 7,50-7,48 (m, 2H, 1,2-ArH); 7,46 (t, 1H, t, 1H, *J* = 7 Hz, 8-ArH), 7,32 (d, 1H, *J* = 8 Hz; 14-ArH); 7,01 (d, 1H, *J* = 7 Hz, 9-ArH); 6,89 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 15-ArH); 6,03 (s, 2H, 20-CH_2). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 159,3 (C12); 50,6 (C16); 149,3 (C17); 148,5 (C10); 133,9 (C4); 131,5 (C13); 128,9 (C3); 127,6 (C5); 126,3 (C7); 126,0 (C1); 125,8 (C14); 125,6 (C8); 125,5 (C2); 124,0 (C6); 112,6 (C9); 108,2 (C18); 107,0 (C15); 101,6 (C20).

(*E*)-1-(4-clorofenil)-*N*-(naftalen-1-il)metanimina (**2e**)

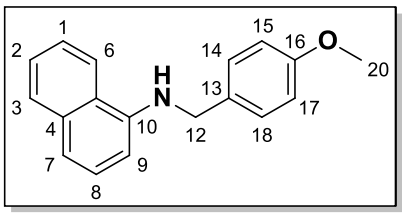


Sólido amarelo. η = 88 %. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8,50 (s, 1H, 12-CH); 8,31 (t, 1H, *J* = 6 Hz, 6-ArH); 7,94 (d, 2H, *J* = 8 Hz, 14, 18-ArH); 7,86-7,83 (m, 1H, 3-ArH); 7,72 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-ArH); 7,52-7,45 (m, 5H, 1, 2, 8, 15, 17-ArH); 7,03 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, 9-ArH). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 158,8 (C12); 148,9 (C10); 137,5 (C16); 134,9 (C13); 133,9 (C4); 130,1 (C14, C18); 129,1 (C15, C17); 128,8 (C3); 127,6 (C5); 126,4 (C7); 126,0 (C1); 126,0 (C8); 125,8 (C2); 123,8 (C6); 11,6 (C9).

9.1.4.2 Obtenção das *N*- metil-benzil-naftilaminas

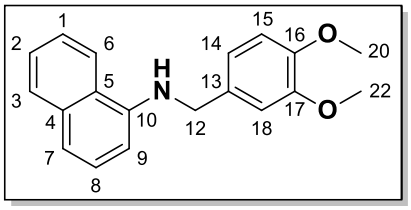
2 mmol da aril-imina (**2a**-**e**) foram dissolvidos em 10 mL de THF. 10 mmol de $NaBH_4$ (378,3 mg) foram dissolvidos em 10 mL de etanol. As duas soluções foram reunidas e mantidas em agitação, à temperatura ambiente e abrigo da luz. Após 48 h de reação, o solvente foi evaporado e o produto extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente foi evaporado. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna, empregando-se eluente hexano/ dioxano (2% trietilamina) em proporções variáveis de acordo com o composto.

N-(4-metoxibenzil)naftalen-1-amina (**3a**)



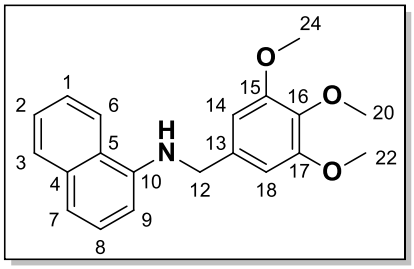
Sólido branco. η = 81 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,23 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 6-ArH), 7,74 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 3-ArH), 7,45-7,38 (m, 2H, 1, 2-ArH), 7,32 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, 14, 18-ArH), 7,17 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz 8-ArH), 7,05 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), 6,86 (d, 3H, *J* = 8,5 Hz, 11-NH, 15, 17-ArH), 6,38 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH), 4,42 (s, 2H, 12-CH_2), 3,70 (s, 3H, 20-OCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 158,0 (C16), 143,6 (C10), 134,0 (C4), 131,1 (C13), 128,0 (C14, C18), 127,9 (C3), 126,6 (C8), 125,5 (C1), 123,9 (C5), 123,0 (C2), 121,5 (C6), 115,3 (C7), 113,6 (C15, C17), 103,6 (C9), 54,9 (C20), 45,9 (C12). Faixa de fusão: 72 – 73 ºC.

N-(3,4-dimetoxibenzil)naftalen-1-amina (**3b**)



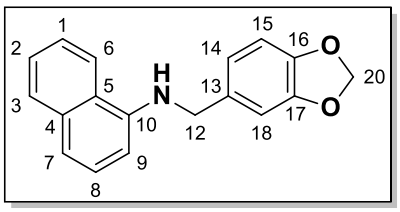
Sólido amarelo claro. η = 79 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,31 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 6-ArH), 7,90 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 3-ArH), 7,59 – 7,54 (m, 3H, 1,2,14-ArH), 7,37 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, 8-ArH), 7,14 – 7,11 (m, 2H, 7,18-ArH), 6,87 – 6,81 (m, 2H, 9,15-ArH), 4,51 (s, 2H, 12-CH_2), 3,70 (s, 3H, 20-CH_3), 3,68 (s, 3H, 22-CH_3). 148,5 (C16, C17), 147,8 (C10), 134,3 (C4), 130,6 (C13), 128,6 (C3), 128,2 (C8), 125,8 (C1), 125,7 (C2), 125,3 (C5), 123,2 (C6), 122,8 (C7), 120,1 (C14), 115,9 (C18), 111,8 (C15), 111,6 (C9), 59,9 (C12), 55,4 (C20), 55,2 (22C), 41,7 (C12). Faixa de fusão: 122 – 124 ºC.

N-(3,4,5-trimetoxibenzil)naftalen-1-amina (**3c**)



Sólido amarelo. η = 87 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,25 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 6-ArH), 7,75 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 3-ArH), 7,44 – 7,41 (m, 2H, 1,2-ArH), 7,21 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), 7,08 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), 6,80 (d, 1H, *J* = 3 Hz, 11-NH), 6,77 (s, 2H, 14,18-ArH), 6,45 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH), 4,42 (d, 1H, *J* = 3 Hz, 12-CH_2), 3,78 (s, 6H, 22,24-CH_3), 3,63 (s, 3H, 20-CH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 152,8 (C15, C17), 143,8 (C10), 136,2 (C16), 135,8 (C13), 134,0 (C4), 127,9 (C3), 126,6 (C8), 125,5 (C1), 124,0 (C2), 123,1 (C5), 121,6 (C6), 115,6 (C7), 104,3 (C14, C18), 103,8 (C9), 59,9 (C20), 55,8 (C22, C24), 47,0 (C12). Faixa de fusão: 126 – 128 ºC.

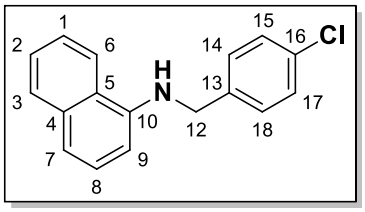
N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)naftalen-1-amina (**3d**)



Sólido amarelo. η = 72 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,22 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 6-ArH), 7,74 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 3-ArH), 7,44-7,41 (m, 2H, 1,2-ArH), 7,18 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), 7,06 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), 6,96 (s, 1H, 18-ArH), 6,90 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 14-ArH), 6,82 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 15-ArH), 6,40 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH), 5,95 (s, 1H, 12-CH_2), 4,40 (s, 1H, 20-CH_2). RMN ^{13}C (DMSO- d_6, 75 MHz): (C10), 134,0 (C4, C13),

127,9 (C3), 126,6 (C8), 125,5 (C5), 123,9 (C1), 123,0 (C2), 121,5 (C6), 119,9 (C14), 115,4 (C7), 107,9 (C15), 107,3 (C18), 103,7 (C9), 100,6 (C20), 46,1 (C12).

N-(4-clorobenzil)naftalen-1-amina (**3e**)

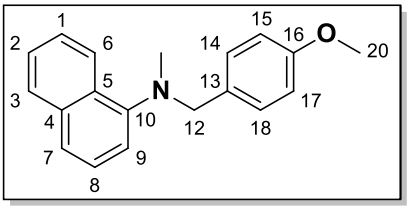


Sólido amarelo. η = 88 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,24 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 6-ArH), 7,75 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, 3-ArH), 7,45 – 7,41 (m, 4H, 1,2,15,17-ArH), 7,35 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, 14,18-ArH), 7,17 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), 7,08 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), 6,34 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH), 4,49 (s, 2H, 12-CH_2). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 143,4 (C13), 139,1 (C4), 134,0 (C10), 131,0 (C16), 128,7 (C14, C18), 128,1 (C15, C17), 127,9 (C3), 126,5 (C8), 125,5 (C5), 124,0 (C1), 123,0 (C2), 121,5 (C6), 115,6 (C7), 103,6 (C9), 45,7 (C12). Faixa de fusão: 71 – 73 ºC.

8.1.4.3 Obtenção das *N,N*-metil-benzil-naftilaminas

A uma solução de da amina secundária (**3a**-**e**) (1 mmol) e formaldeído aquoso 37% (10 mmol, 812,5 mg) em actonitrila (12 mL)adicionou-se ácido acético (2 mmol, 120 mg). A mistura foi mantida em agitação, à temperatura ambiente. Após 30 min de reação, a mistura foi resfriada à 0 ºC, e adicionou-se $NaBH_3CN$ (1,5 mmol, 94,26 mg) em duas porções, a cada 30 min. Após 4 h de reação, o solvente foi evaporado e o produto extraído com diclorometano e solução saturada de $NaHCO_3$ (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna, empregando-se eluente hexano/ acetato de etila (2% trietilamina) em proporções variáveis de acordo com o composto.

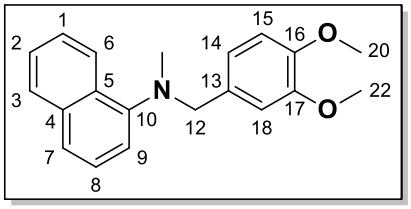
N-(4-metoxibenzil)-*N*-metilnaftalen-1-amina (**4a**)



Sólido branco. η = 79 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,28 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz, 6-ArH), 7,88 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 3-ArH), 7,57 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH) , 7,52-7,49 (m, 2H, 1, 2-ArH), 7,43 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), 7,28 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, 14, 18-ArH), 7,13 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH), 6,90 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, 15, 17-ArH), 4,18 (s, 2H, 12-CH_2),

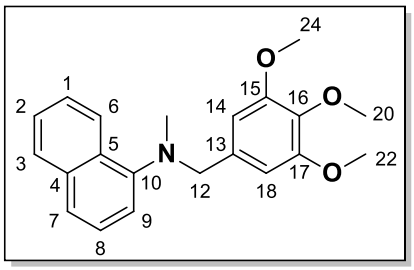
3,73 (s, 3H, 20-OCH_3), 2,70 (s, 3H, 11-NCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 158,8 (C16), 149,9 (C10), 134,8 (C4), 130,6 (C13), 129,7 (C14, C18), 129,1 (C5), 128,7 (C8), 126,3 (C1), 126,2 (C2), 125,8 (C6), 123,7 (C5), 123,3 (C7), 116,3 (C9), 114,1 (C15, C17), 60,1 (C11), 55,4 (C20), 42,2 (C12). Faixa de fusão: 63 – 65 ºC.

N-(3,4-dimetoxibenzil)-*N*-metilnaftalen-1-amina (**4b**)



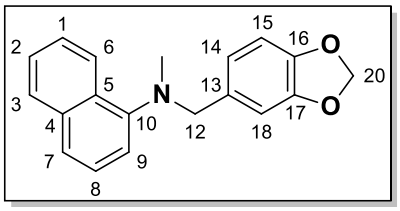
Sólido branco. η = 69 %. RMN ^1H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,29 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 6-ArH), 7,89 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 3-ArH), 7,58 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 14-ArH), 7,53 – 7,47 (m, 2H, 1,2-ArH), 7,40 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), 7,13 (d, 1H *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), 6,89 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, 9,15-ArH), 6,90 (s, 1H, 18-ArH), 4,19 (s, 2H, 12-CH_2), 3,73 (s, 3H, 20-CH_3), 3,67 (s, 3H, 22-CH_3), 2,72 (s, 3H, 11-NCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 149,3 (C17), 148,5 (C16), 147,8 (C10), 134,3 (C4), 130,6 (C13), 128,6 (C3), 128,2 (C8), 125,8 (C1), 125,7 (C2), 125,3 (C5), 123,2 (C6), 122,8 (C7), 120,1 (C14), 115,9 (C18), 111,8 (C15), 111,6 (C9), 59,9 (C11), 55,4 (C20), 55,2 (22C), 41,7 (C12). Faixa de fusão: 81 – 83 ºC.

N-(3,4,5-trimetoxibenzil)-*N*-metilnaftalen-1-amina (**4c**)



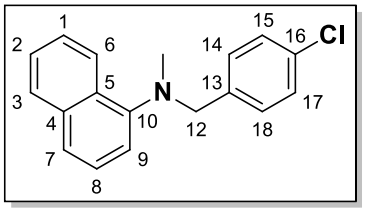
Sólido branco. η = 55 %. RMN ^1H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,32 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 6-ArH), 7,93 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 3-ArH), 7,63 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), 7,60 – 7,52 (m, 2H, 1,2-ArH), 7,46 (t, 1H *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), 7,21 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH), 6,70 (s, 2H, 14,18-ArH), 4,25 (s, 2H, 12-CH2), 3,75 (s, 6H, 22,24-CH3), 3,68 (s, 3H, 20-CH_3), 2,80 (s, 3H, 11-NCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 152,7 (C15, C17), 149,3 (C10), 136,3 (C16), 134,3 (C13), 134,0 (C4),128,5 (C3), 128,3 (C8), 125,8 (C1), 125,4 (C2), 123,2 (C5), 122,9 (C6), 115,8 (C7), 105,0 (C9, C14, C18), 60,2 (C20), 59,9 (C11), 55,7 (C22, C24), 41,9 (C12). Faixa de fusão: 81 – 83 ºC.

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-*N*-metilnaftalen-1-amina (**4d**)



Óleo laranja claro. η = 65 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,26 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 6-ArH), 7,88 (dd, 1H, *J* = 1,8 Hz, *J* = 7,5 Hz, 3-ArH), 7,58 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), 7,54-7,49 (m, 2H, 1,2-ArH), 7,40 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 8-ArH), 7,14 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH), 6,91 – 6,95 (m, 3H, 14,15,18-ArH), 5,98 (s, 1H, 20-CH_2), 4,16 (s, 1H, 12-CH_2), 2,71 (s, 3H, 11-NCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 149,2 (C15), 147,2 (C16), 146,18 (C10), 134,3 (C4), 132,2 (C13), 126,5 (C3), 128,2 (C8), 125,8 (C1), 125,7 (C2), 125,4 (C5), 123,2 (C6), 122,9 (C7), 121,2 (C14), 115,9 (C18), 108,2 (C15), 107,9 (C9), 100,7 (C20), 59,8 (C11), 46,1 (C12).

N-(4-clorobenzil)-*N*-metilnaftalen-1-amina (**4e**)

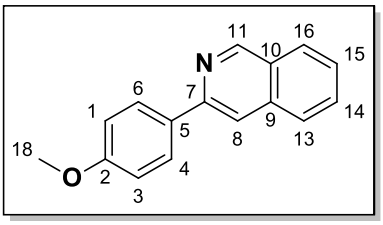


Sólido amarelo. η = 75 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,25 (dd, 1H, *J* = 2,0 Hz, *J* = 6,5 Hz, 6-ArH), 7,89 (dd, 1H, *J* = 2,0 Hz, *J* = 6,5 Hz, 3-ArH), 7,59 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 7-ArH), 7,54 – 7,49 (m, 2H, 1,2-ArH), 7,43 – 7,36 (m, 5H, 8,14,15,17,18-ArH), 7,16 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 9-ArH), 4,25 (s, 2H, 12-CH_2), 2,72 (s, 3H, 11-NCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 149,0 (C10), 137,4 (C13), 134,3 (C4), 131,4 (C16), 129,8 (C14, C18), 128,5 (C3), 128,3 (C8), 128,2 (C15, C17), 125,8 (C1), 125,7 (C2), 125,4 (C5), 123,1 (C6), 123,0 (7C), 115,9 (C9), 59,2 (C11), 41,1 (C12).

8.1.4.4 Obtenção das aril-isoquinolinas

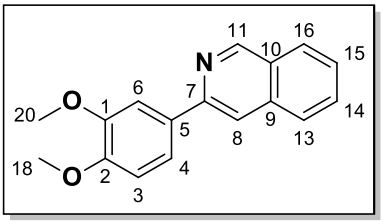
1 mmol de 3-bromoaril-isoquinolina e 1,5 mmol de ácido fenilborônico substituído (**5a**-**c**) foram dissolvidos em 12 mL de etanol e 4 mL de água. À mistura adicionou-se 1,7 mg de $Pd(OAc)_2$ (1,5 mol %) e 2 mmol de K_2CO_3 (276,41 mg). A reação foi mantida em agitação à 80 ºC durante 4 horas. A mistura foi filtrada em celite e o solvente evaporado à pressão reduzida. A amostra foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL) e a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna, empregando-se eluente hexano/ acetato de etila em proporções variáveis de acordo com o composto.

3-(4-metoxifenil)aril-isoquinolina (**6a**)



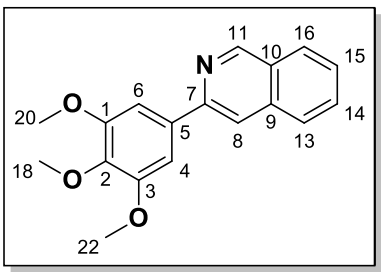
Sólido branco. η = 82 %. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 9,30 (s, 1H, 11-ArH), 8,08 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, 4, 6-ArH), 7,97 (s, 1H, 8-ArH), 7,95 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 16-ArH), 7,83 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 13-ArH), 7,66 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 14-ArH), 7,54 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 15-ArH), 7,03 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, 1, 3-ArH), 3,87 (s, 3H, 18-OCH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$ 75 MHz): δ 160,1 (C2), 152,2 (C11), 151,1 (C7), 136,7 (C9), 132,3 (C10), 130,4 (C14), 128,2 (C4, C6), 127,5 (C13), 127,4 (C5), 126,7 (C16), 126,6 (C15), 115,3 (C8), 114,2 (C1, C3), 55,3 (C18). Faixa de fusão: 98 – 99 ºC.

3-(3,4-dimetoxifenil)aril-isoquinolina (**6b**)



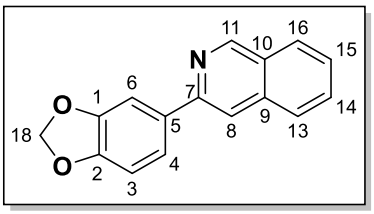
Sólido branco. η = 82 %. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 9,30 (s, 1H, 11-ArH), 8,00 (s, 1H, 8-ArH), 7,96 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 16-ArH), 7,85 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 13-ArH), 7,78 (s, 1H, 6-ArH), 7,67 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 15-ArH), 7,66 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 4-ArH), 7,56 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 14-ArH), 6,99 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 3-ArH), 4,03 (s, 3H, 18-CH_3), 3,95 (s, 3H, 20-CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$ 75 MHz): δ 152,2 (C7), 151,0 (C2), 149,7 (C11), 149,3 (C1), 136,7 (C9), 132,6 (C5), 130,4 (C14), 127,5 (C15), 127,5 (C10), 126,7 (C13, C16), 119,41 (C4), 115,5 (C8), 111,3 (C6), 110,2 (C3), 56,0 (C20), 56,0 (C18). Faixa de fusão: 76 – 77 ºC.

3-(3,4,5-trimetoxifenil)aril-isoquinolina (**6c**)



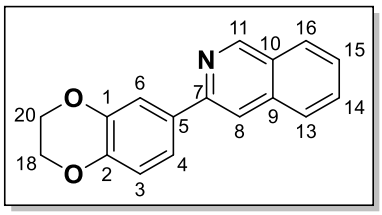
Sólido branco. η = 80 %. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 9,32 (s, 1H, 11-ArH), 8,01 (s, 1H, 8-ArH), 7,99 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 16-ArH), 7,88 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 13-ArH), 7,70 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 14-ArH), 7,58 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 15-ArH), 7,39 (s, 2H, 4,6-ArH), 4,00 (s, 6H, 20,22-CH_3), 3,92 (s, 3H, 18-CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$ 75 MHz): δ 153,6 (C1, C3), 153,4 (C7), 152,2 (C11), 150,9 (C2), 138,8 (C9), 136,6 (C5), 135,2 (C14), 130,6 (C13), 127,7 (C10), 127,5 (C16), 126,8 (C15), 116,1 (C8), 104,3 (C4, C6), 60,9 (C18), 56,3 (C20, C22). Faixa de fusão: 110 – 112 ºC.

3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)isoquinolina (**6d**)



Sólido amarelo. η = 54 %. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 9,27 (s, 1H, 11-ArH), 7,94 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, 13-ArH), 7,93 (s, 1H, 8-ArH), 7,82 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, 16-ArH), 7,68-7,62 (m, 3H, 4, 6, 15-ArH), 7,53 (t, 1H, *J* = 7,5, 14-ArH), 6,93 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, 3-ArH), 6,01 (s, 2H, 18-CH_2). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 152,1 (C11), 150,8 (C7), 148,3 (C2), 148,1 (C1), 136,7 (C9), 134,0 (C5), 130,5 (C14), 127,5 (C10, C13), 126,8 (C16), 126,7 (C15), 120,9 (C4), 115,7 (C8), 108,5 (C6), 107,4 (C3), 101,2 (C20). Faixa de fusão: 122 – 124 ºC.

3-(2,3-di-idrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-il)isoquinolina (**6e**)

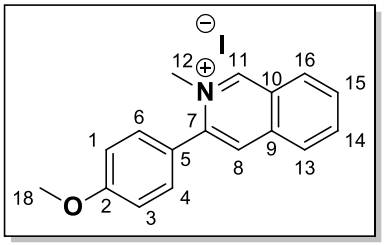


Sólido branco. η 66%. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 9,27 (s, 1H, 11-ArH), 7,94 (s, 1H, 8-ArH), 7,93 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 16-ArH), 7,81 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 13-ArH), 7,67-7,61 (m, 3H, 4,6,14-ArH), 7,52 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 15-ArH), 6,98 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 3-ArH), 4,29 (s, 4H, 18, 20-CH_2). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 152,2 (C7), 150,8 (C11), 144,2 (C2), 143,8 (C1), 136,7 (C9), 133,3 (C14), 130,4 (C5, C13), 127,5 (C16), 126,7 (C15), 126,7 (C10), 120,2 (C4), 117,5 (C8), 115,9 (C3), 115,5 (C6), 64,5 (C18), 64,3 (C20). Faixa de fusão: 103 – 105 ºC.

8.1.4.5 Obtenção das aril-*N*-metil-isoquinolinas

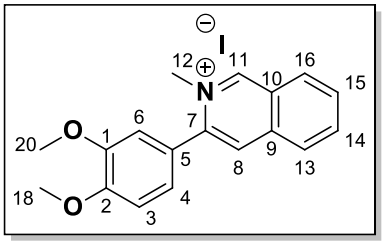
Em tubo de pressão, preparou-se uma solução de 3-fenilaril-isoquinolina substituída (**6a**-**c**) (0,5 mmol) em acetonitrila (4 mL), à qual foram adicionados 5 mmol de CH_3I (311 µL). A reação foi mantida em agitação à 60 º C. Após 24 h, o solvente e excesso de CH_3I foram evaporados sob pressão reduzida, e o sólido lavado com acetato e hexano, obtendo-se o produto metilado (**7a**-**c**).

Iodeto de 3-(4-metoxifenil)-2-metil-isoquinolin-2-ium (**7a**)



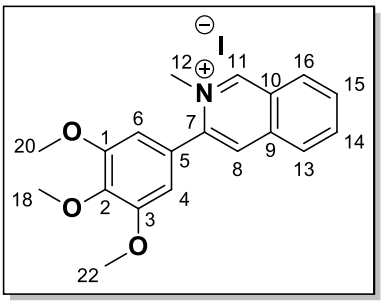
Sólido amarelo. η = 76 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 10,16 (s, 1H, 11-ArH), 8,51 (s, 1H, 8-ArH), 8,51 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, 16-ArH), 8,33 (d, 1H, *J* = 9 Hz, 13-ArH), 8,27 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 15-ArH), 8,08 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, 14-ArH), 7,67 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, 4, 6-ArH), 7,21 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, 1, 3-ArH), 4,23 (s, 1H, 18-NCH_3), 3,89 (s, 1H, 19-OCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 160,7 (C2), 151,6 (C7), 145,8 (C11), 137,4 (C9), 136,8 (C13), 131,3 (C4, C6), 130,9 (C14), 129,7 (C10), 127,0 (C16), 126,6 (C15), 126,3 (C5), 124,2 (C8), 114,4 (C1, C3), 55,5 (C19), 47,2 (C18). Faixa de fusão: 180 – 182 ºC.

Iodeto de 3-(3,4-dimetoxifenil)-2-metil-isoquinolin-2-ium (**7b**)



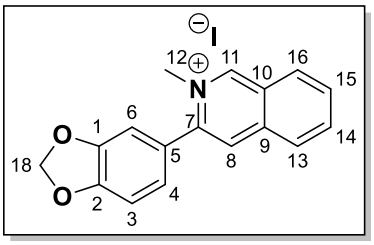
Sólido amarelo. η = 93 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 10,20 (s, 1H, 11-ArH), 8,54 (s, 1H, 8-ArH), 8,52 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 16-ArH), 7,35 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 13-ArH), 8,27 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 15-ArH), 8,08 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 14-ArH), 7,35 (s, 1H, 6-ArH), 7,28 – 7,21 (m, 2H, 3,4-ArH), 4,27 (s, 3H, 12-NCH3) 3,89 (s, 3H, 18-CH_3), 3,84 (s, 3H, 20-CH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 151,5 (C7), 150,4 (C2), 148,6 (C1), 145,8 (C11), 137,4 (C9), 136,8 (C13), 130,9 (C14), 129,7 (C10), 127,0 (C16), 126,6 (C15), 126,3 (C5), 124,2 (C4), 122,7 (C8), 113,3 (C6), 111,8 (C3), 55,8 (C18), 55,7 (C20), 47,3 (C12). Faixa de fusão: 213 – 215 ºC.

Iodeto de 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-metil-isoquinolin-2-ium (**7c**)



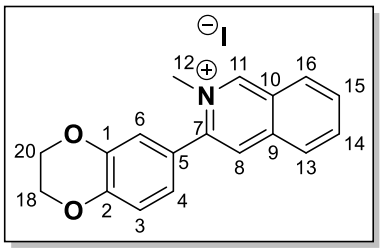
Sólido amarelo. η = 98 %. RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 10,20 (s, 1H, 11-ArH), 8,58 (s, 1H, 8-ArH), 8,53 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 16-ArH), 8,35 – 8,26 (m, 2H, 15, 13-ArH), 8,10 (t, 1H, *J* = 8 Hz, 14,-ArH), 7,07 (s, 2H, 4,6-ArH), 4,29 (s, 3H, 12-NCH_3), 3,86 (s, 6H, 20,22-CH_3), 3,79 (s, 3H, 18-CH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 153,0 (C1, C3), 151,4 (C7), 145,6 (C11), 138,9 (C2), 137,3 (C9), 136,9 (C13), 131,1 (C14), 129,8 (C5), 127,2 (C10), 127,0 (C16), 126,6 (C15), 126,4 (C8), 107,6 (C4, C6), 60,1 (C18), 56,3 (C20, C22), 47,3 (C12). Faixa de fusão: 219 – 221 ºC.

Iodeto de 3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-2-metilisoquinolin-2-ium (**7d**)



Sólido amarelo. η = 55%. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 10, 18 (s, 1H, 11-ArH), 8,51 (s, 1H, 8-ArH), 8,50 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 16-ArH), 8,34-8,24 (m, 2H, 15,13-ArH), 8,08 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 14-ArH), 7,32 (s, 1H, 6-ArH), 7,19 (s, 2H, 3,4-ArH), 6,19 (s, 2H, 18-CH_2). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 151,6 (C1), 149,0 (C2), 147,5 (C11), 145,4 (C9), 136,9 (C13), 131,0 (C14), 129,8 (C5), 127,0 (C10), 126,7 (C16), 126,4 (C15), 125,4 (C4), 124,4 (C8), 109,9 (C6), 108,7 (C3), 101,9 (C18), 47,1 (C12). Faixa de fusão: 213 – 215 ºC.

3-(2,3-di-idrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-il)isoquinolina (**6e**)

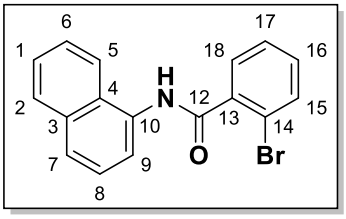


Sólido branco. η 66%. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 10,20 (s, 1H, 11-ArH), 8,52 (s, 1H, 8-ArH), 8,52 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 16-ArH), 8,32 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 15-ArH), 8,26 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, 13-ArH), 8,08 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 14-ArH), 7,28 (d, 1H, *J* = 1,8 Hz, 6-ArH), 7,19 (dd, 1H, *J* = 1,8 Hz, *J* = 8,3 Hz, 4-ArH), 7,13 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, 3-ArH), 4,37 (s, 4H, 18, 20-CH_2), 4,25 (s, 3H, 12-NCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): 151,5 (C7), 145,3 (C2), 145,2 (C11), 143,4 (C1), 137,4 (C6), 136,8 (C13), 131,0 (C14), 129,7 (C10), 127,0 (C16), 126,6 (C15), 126,3 (C4), 124,9 (C5), 122,9 (C8), 118,7 (C6), 117,5 (C3), 64,3 (C18), 64,1 (C20), 47,2 (C12). Faixa de fusão: 192 – 194 ºC.

8.1.4.6 Obtenção das *N*-naftil-benzamidas

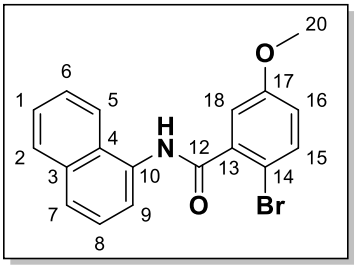
3 mmol de ácido 2-bromobenzoico (**8a-d**) foram suspendidos em 2,5 mL de diclorometano. À mistura adicionou-se 2 mmol de cloreto de oxalila e dimetilformamida (catalítico). A reação é mantida em agitação em atmosfera inerte (N_2) e temperatura ambiente durante 1 a 2 horas, para formação do cloreto de ácido, sendo observada formação de produto solúvel. Em seguida, 1 mmol de 1-naftil-amina foi dissolvido em 2,5 mL de diclorometado e adicionado à mistura, seguido de 3 mmol de trietilamina. A reação é mantida em agitação em atmosfera inerte (N_2) e temperatura ambiente, *overnight.* O produto precipita no meio reacional e é filtrado e lavado com diclorometano.

2-bromo-*N*-(naftalen-1-il)benzamida (**9a**)



Sólido branco. η = 82 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 10,53 (s, 1H, 11-NH), 8,22 (t, 1H, *J* = 4,5 Hz, 3-ArH), 7,98 (t, 1H, *J* = 4,5 Hz, 6-ArH), 7,87 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, 7-ArH), 7,77 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz, 15, 18-ArH), 7,73 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, 9-ArH), 7,59-7,53 (m, 4H, 1, 2, 16, 17–ArH), 7,46 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz, 8-ArH). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 166,8 (C12), 139,3 (C10), 133,7 (C13), 133,12 (C4), 132,6 (C15), 131,0 (C16), 128,9 (C3), 128,4 (C8), 128,0 (C5), 127,7 (C2), 126,0 (C17, C18), 125,9 (C7), 125,5 (C1), 123,1 (C6), 122,7 (C14), 119,0 (C9).

2-bromo-5-metoxi-*N*-(naftalen-1-il)benzamida (**9b**)

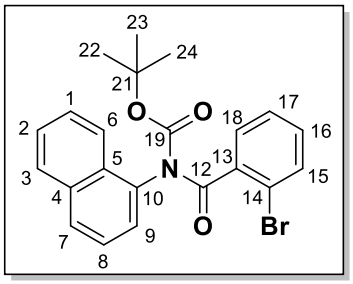


Sólido branco. η = 65 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 10,47 (s, 1H, 11-NH), 8,20 (t, 1H, *J* = 4,5 Hz, 6-ArH), 7,96 (t, 1H, *J* = 4,5 Hz, 3-ArH), 7,85 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-ArH), 7,75 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz, 9-ArH), 7,63 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, 15-ArH), 7,57-7,53 (m, 3H, 1,2,8-ArH), 7,27 (d, 1H, *J* = 2,6 Hz, 18-ArH), 7,03 (dd, 1H, *J* = 2,6 Hz, *J* = 8,8 Hz, 16-ArH), 3,85 (s, 3H, 20-OCH_3). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 166,4 (C12), 158,5 (C17), 140,0 (C10), 133,7 (C13), 133,5 (C15), 133,1 (C4), 128,4 (C5), 127,9 (C3), 126,0 (C8, C2), 125,9 (C7), 125,4 (C1), 123,2 (C6) 122,7 (C16), 116,9 (C9), 114,5 (C18), 109,2 (C14), 55,7 (C20).

8.1.4.7 Proteção das *N*-naftil-benzamidas

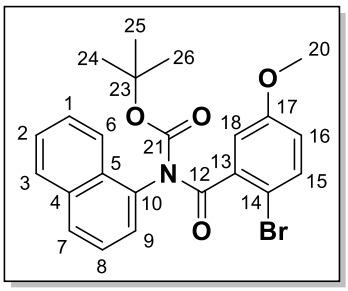
1 mmol da amida (**9a-b**) foi suspendido em 5 mL de acetonitrila. À mistura adicionou-se 0,25 mmol de DMAP, seguido de 2 mmol de Boc_2O. A reação foi mantida em agitação à temperatura ambiente e N_2 24 h. O solvente foi evaporado e o produto isolado por cromatografia em coluna, utilizando hexano/ acetato de etila 3:1.

terc-butil (2-bromo-benzoil)(naftalen-1-il)carbamato (**10a**)



Sólido branco. η = 71 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 7,97 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, 3, 6-ArH), 7,81 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, 7-ArH), 7,68 – 7,52 (m, 6H, 1, 2, 8, 9, 15, 18-ArH), 7,46 (td, 1H, *J* = 1,2 Hz, *J* = 7,5 Hz, 16-ArH), 7,37 (td, 1H, *J* = 1,5 Hz, *J* = 7,5 Hz, 17-ArH), 1,01 (s, 9H, *t*-Bu). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 169,3 (C12), 151,0 (C19), 139,7 (C13), 134,4 (C10), 133,8 (C4), 132,4 (C15), 130,9 (C16), 130,1 (C3), 128,8 (C18), 128,4 (C17), 127,9 (C5), 127,9 (C5), 127,6 (C2), 127,2 (C8), 126,5 (C7), 126,3 (C1), 125,7 (C6), 121,5 (C9), 118,0 (C14), 83,6 (C21), 26,8 (C22-24).

terc-butil (2-bromo-5-metoxibenzoil)(naftalen-1-il)carbamato (**10b**)



Sólido branco. η = 21 %. RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8,05 (t, 2H, *J* = 3,6 Hz, 3, 6-ArH), 7,90 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-ArH), 7,71-7,58 (m, 5H, 1, 2, 8, 9, 15-ArH), 7,63 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, 15-ArH), 7,30 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz, 18-ArH), 7,03 (dd, 1H, *J* = 2,8 Hz, *J* = 8,8 Hz, 16-ArH), 3,83 (s, 3H, 20-OCH_3), 1,12 (s, 9H, *t*-Bu). RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ 169,0 (C12), 158,6 (C17), 157,0 (C21), 140,5 (C10), 134,4 (C13), 133,8 (C15), 133,2 (C4), 130,1 (C5), 128,7 (C3), 128,3 (C2), 127,1 (C8), 126,5 (C7), 126,3 (C1), 125,7 (C6) 121,6 (C16), 116,8 (C9), 113,4 (C18), 108,3 (C14), 83,5 (C23), 55,7 (C20), 26,8 (C24-26).

8.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

8.2.1 Cultura de células

Foram utilizadas as células da linhagem de glioblastoma humano U87MG (*American Type Culture Collection* - ATCC®) e como linhagem não tumorigênica, fibroblastos de pulmão fetal MRC-5. As células foram cultivadas em DMEM com baixa glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e solução antibiótica/antimicótica (Sigma Aldrich®) e mantidas à 37 ºC e atmosfera com 5% de CO_2 (SOMENSI et al., 2017).

8.2.2 Avaliação da citotoxicidade por MTT

Células U87MG ou MRC-5 foram adicionadas em placas de 96 poços (5×10^3cél/ poço) e incubadas com diferentes concentrações dos compostos-teste diluídos em DMEM durante 72 h. Após esse período, adicionou-se 10 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/mL), mantendo-se sob incubação durante 1 hora e 30 minutos para a formação do formazan (precipitado). As placas foram centrifugadas, o meio de cultura removido, e o precipitado (formazan) dissolvido em 100 µL de DMSO (DENIZOT; LANG, 1986). A absorbância de cada poço foi lida em 538 nm utilizando espectrofotômetro SpectraMAX i3 (Molecular Devices). A viabilidade celular foi medida pela porcentagem de absorbância comparada ao controle (células não tratadas). Os experimentos foram realizados em triplicata intra e interexperimento e temozolamida foi utilizada como controle positivo. Os dados foram plotados no software GraphPad Prism7(GraphPad Software, versão 7.00 Inc, 2016), onde calculou-se a IC_{50} segundo o tutorial fornecido pelo Prism (ZANOTTO-FILHO et al., 2015).

8.2.3 Avaliação da citotoxicidade por sulforrodamina B

Células U87MG ou MRC-5 foram adicionadas em placas de 96 poços e ao atingir 70 % de confluência, o meio de cultura foi removido e as células tratadas e incubadas com diferentes concentrações dos compostos-teste diluídos. Após 72 h, o meio de cultura foi descartado e as células fixadas com 10 % de ácido trifluoracético por 1h a 4 ºC. As células foram então coradas com sulforrodamina B 0,4 % dissolvida em ácido acético 1%, durante 15 min. As células foram lavadas para remoção do corante excedente com ácido acético 1 %, até restar apenas o corante aderido às células. As células coradas foram dissolvidas em 100 µL de solução tampão Tris 10 mM (pH 10,5). A absorbância de cada poço foi lida em 515 nm utilizando espectrofotômetro SpectraMAX i3 (Molecular Devices). A viabilidade celular foi medida pela porcentagem de absorbância comparada ao controle (células não tratadas). Os experimentos foram realizados em triplicata e temozolamida foi utilizada como controle positivo. Os dados foram plotados no software GraphPad Prism7 (GraphPad Software, versão 7.00 Inc, 2016), onde calculou-se a IC_{50} segundo o tutorial fornecido pelo Prism (SOMENSI et al., 2017).

8.2.4 Estudo de indução apoptótica por anexina e iodeto de propídio

O aparecimento de células apoptóticas e necróticas foi monitorado por dupla marcação com os corantes anexina e iodeto de propídio (PI) (Sigma, St. Louis, MO) utilizando-se um citômetro de fluxo (FACSCalibur). Células de glioblastoma U87MG foram cultivadas em placas de 12 poços (5 x 10^4cél/ poço) e tratadas nas concentrações relativas aos valores de IC_{50} do composto a ser avaliado, diluídos em DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 72 h de incubação, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas por 5 min a 1000 RPM. As células foram incubadas com 5 µL anexina V e 5 µL de PI (50 µg/mL) por 15 minutos a temperatura ambiente, após esse período sendo adicionados 400 µL de tampão de ligação fornecido pelo fabricante. Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra no citômetro FACSCalibur. Os experimentos foram realizados em triplicata e a leitura dos dados realizada utilizando-se o software FlowJo (TresStar Inc., Ashland, OR, EUA) (SOMENSI et al., 2017).

8.2.5 Análise do ciclo celular

Células de glioblastoma humano U87MG foram cultivadas em placas de 12 poços (5 × 10^4 cel/ poço) e tratadas nas concentrações relativas aos valores de IC_{50} do composto a ser avaliado durante 24, 48 e 72 h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 1200 RPM por 6 min. As células foram ressuspendidas em 200 µL do tampão de ciclo (PBS 1x, citrato de sódio tribásico 3,5 mM, Tris 0,5 mM, IGEPAL 0,1%, iodeto de propídio 50 µg/mL, RNAse 100 µg/mL, pH 7,4). As células foram então incubadas por 15 min e o conteúdo do DNA determinado por citometria de fluxo. Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra no citômetro FACSCalibur. Os experimentos foram realizados em triplicata e a leitura dos dados realizada utilizando-se o software FlowJo (TresStar Inc., Ashland, OR, EUA) (SOMENSI et al., 2017).

8.2.6 Análise do potencial de membrana mitocondrial

Células de glioblastoma humano U87MG foram cultivadas em placas de 12 poços (1 × 10^5cél/ poço) e tratadas nas concentrações relativas aos valores de IC_{50} do composto a ser avaliado durante 72 h. Posteriormente, as células foram lavadas

com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 1200 RPM por 6 min. Células foram incubadas com 600 µL de PBS com 1 µM de rodamina 123 por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, as células foram centrifugadas (1200 RPM por 3 minutos), lavadas com PBS três vezes e ressuspendidas em 500 µL de PBS. A fluorescência emitida pela rodamina foi detectada pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (KANIPANDIAN; LI; KANNAN, 2019).

8.3 MODELAGEM MOLECULAR

Os estudos de modelagem molecular foram realizados em notebook Avell Linux Ubuntu 18.04, processador Intel® CoreTM i7-8750H Coffee Lake.

8.3.1 Ancoramento molecular

As estruturas tridimensionais da sanguinarina e seus respectivos análogos foram construídas e minimizadas energeticamente no programa Spartan'14 (Wavefunction Inc, 2014), empregando-se método semi-empírico PM3 e Hartree-Fock 3-31G**. As estruturas otimizadas foram verificadas e corrigidas no programa Sybyl versão 2.1.1 (Certara, L.P., 2012).

Para o desenvolvimento do *docking* molecular na Bcl-x_L utilizou-se o cocristal da proteína complexada ao inibidor BM903, disponível no *Protein Data Bank* (PDB), código PDB 3SP7, resolução 1,4 Å. A estrutura cristalográfica foi tratada para remoção do ligante, artefatos e moléculas de água, e adição dos átomos de hidrogênio no GOLD, versão 5.4 (CCDC Software Ltd., 2015).

Visto que não foi encontrado cristal da sanguinarina complexada com Bcl-x_L, o método foi validado e selecionado por *crossdocking*, utilizando-se o programa GOLD, versão 5.4 (CCDC Software Ltd., 2015). O ancoramento da sanguinarina foi realizado para a estrutura com cargas Eletrostática e Muliken, a partir de todas as funções disponíveis no programa (ASP, ChemPLP, GoldScore, ChemScore), realizando-se uma réplica "clusterizada" que gerou trinta poses para cada método, o que corresponde a um total de 240 poses. Foi utilizado como origem do sítio de ancoramento o carbono carboxílico do resíduo Glu129, com raio de 10 Å, baseado nas interações descritas por Zhang (2008), que avaliou as interações entre sanguinarina e Bcl-x_L por HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*).

Empregou-se velocidade de busca do algoritmo genético média, sem presença de moléculas de água cocristalizadas.

A seleção do método posteriormente aplicado para o *docking* dos análogos se deu por inspeção visual, comparando-se as poses da sanguinarina resultantes de cada método com a pose proposta por Zhang (2008). Os melhores resultados foram encontrados com a função ChemScore e carga Muliken, que foram então utilizadas para o ancoramento dos análogos propostos. Após inspeção visual, a pose fixada para sanguinarina foi selecionada a partir dos valores de escore.

8.3.2 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas utilizando GROMACS 2019 (rápida, flexível e livre) (VAN DER SPOEL et al., 2005) para Bcl-x_L (código PDB: 3SP7) em complexo com sanguinarina, **4a** e **6e**, empregando-se campo de força CHARMM (VANOMMESLAEGHE et al., 2009; VERMAAS et al., 2016). O sistema de simulação compreendeu o complexo proteína-ligante com modelo de água (TIP3P) (BJELKMAR et al., 2010) pré-definido como solvente e contra-íons (Na^+ ou Cl^- para neutralizar a carga do sistema).

O sistema foi tratado em uma caixa triclínica com divisão periódica, com forma e tamanho a 10 Å de distância de qualquer átomo da proteína. Empregou-se intervalo de tempo de 1 fs e as interações colômbicas de curto alcance foram tratadas utilizando valor de corte de 8 Å e método de curto alcance.

As interações colômbicas de longo alcance foram manipuladas através de um método brando de PME (*Particle Mesh Ewald* – Rede de Partículas Ewald) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993). Inicialmente, o relaxamento do sistema foi realizado utilizando-se os algorítmos *Steepes Descent* e Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno de memória limitada de maneira híbrida.

As simulações foram realizadas sob um conjunto isotérmico-isobárico (NPT) por 5 ns, utilizando métodos termostáticos e barostáticos Berendsen. A temperatura foi mantida em 310 K através de simulações utilizando algoritmo termostático Nose-Hoover. O algoritmo barostático Martyna-Tobias-Klein foi aplicado para manter 1 atm

de pressão durante os cálculos. Após a minimização de relaxamento do sistema, procedeu-se com uma etapa de produção única de 100 ns.

As estruturas representativas da Bcl-x_L e dos ligantes (sanguinarina, **4a** e **6e**) foram selecionadas pela clusterização das estruturas a partir dos valores de RMSD (*root-mean square deviation* – desvio da raiz quadrada média), utilizando 0,5 Å como valor de corte.

As interações e distâncias foram determinadas utilizando-se a análise de trajetória do GROMACS. Os critérios geométricos atuais para ligação de hidrogênio em proteínas são: i) distância ≤ 3,5 Å entre HBD (*hydrogen bond donor* – doador de ligação de hidrogênio) e HBA (*hydrogen bond aceptor* – aceptor de ligação de hidrogênio); ii) ângulo ≥ 120 ° entre o átomo eletronegativo do grupo HBD e o átomo aceptor de ligação de hidrogênio (D–H···A); iii) ângulo ≥ 90 ° entre o hidrogênio do HBD e o átomo ligado ao aceptor de ligação de hidrogênio. Similarmente, as ligações de hidrogênio proteína-água ou água-ligante requerem: iv) distância ≤ 3,0 Å entre os átomos do HBD e HBA; v) ângulo ≥ 110 ° entre o átomo eletronegativo do grupo HBD e o átomo aceptor de ligação de hidrogênio (D–H···A); vi) ângulo ≥ 90 ° entre o hidrogênio do HBD e o átomo ligado ao aceptor de ligação de hidrogênio. Interações hidrofóbicas não específicas foram definidas por cadeias laterais hidrofóbicas com distâncias de 4,5 Å entre carbonos aromáticos ou alifáticos e interações *π-π* foram definidas por dois grupos aromáticos empilhados frente-a-frente, com 5,0 Å de distância (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010).

8.3.3 Predição do perfil farmacocinético *in silico*

As estruturas da sanguinarina, **4a** e **6e** tiveram seu perfil farmacocinético simulado no aplicativo SwissADME, Swiss Institute of Bioinformatics, disponível *on line* em http://www.swissadme.ch/index.php.(DAINA; O; ZOETE, 2017).

9 REFERÊNCIAS

ABURAI, N. et al. Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 548–552, 2010.

ACHARYA, C. et al. Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 1, p. 10–22, 2011.

ADAMS, J. L. et al. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 603–621, 2015.

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324–1337, 2007.

ADHAMI, V. M. et al. Sanguinarine causes cell cyle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cylin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 8, p. 933–940, 2004.

AHMAD, N. et al. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 4, p. 1524–1528, 2000.

AHSAN, H. et al. Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins. **Cancer Letters**, v. 249, n. 2, p. 198–208, 2007.

ALINEZHAD, H.; TAJBAKHSH, M.; MAHDAVI, N. One-pot reductive amination of carbonyl compounds using sodium borohydride-amberlyst 15. **Synthetic Communications**, v. 40, n. 7, p. 951–956, 2010.

ALONSO, M. M. et al. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. **Cancer Research**, v. 67, n. 24, p. 11499–11504, 2007.

AMUNDSON, S. A et al. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. **Cancer Research**, n. 9, p. 6101–6110, 2000.

APAROY, P.; REDDY, K. K.; REDDANNA, P. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5-LOX inhibitors. **Current Medicinal**

Chemistry., v. 19, n. 22, p. 3763–3778, 2012.

ASHKENAZI, A. et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 4, p. 273–284, 2017.

AZIZ, D. M. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 1–2, p. 1–8, 2006.

BAER, J. C. et al. Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 6, p. 1299–1302, 1993.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1172–1180, 2002.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BAXTER, E. W.; REITZ, A. B. Reductive aminations of carbonyl compounds with borohydride and borane reducing agents. In: **Organic Reactions**. Pensilvania: John Wiley & Sons Inc., 2002. v. 59p. 3–660.

BEAUSOLEIL, E. et al. Structure-activity relationship of isoform selective inhibitors of Rac1/1b GTPase nucleotide binding. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 19, p. 5594–5598, 2009.

BERGANTINI, A. P. F.; SOUZA, A. M.; FETT-CONTE, A. C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 2, p. 120–125, 2005.

BERNARDO, P. H. et al. Structure-activity relationship studies of phenanthridine-based Bcl-XL inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 6699–6710, 2008.

BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061–5084, 2010.

BJELKMAR, P. et al. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: Analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 2, p. 459–466, 2010.

BRADSHER, C. K.; WALLIS, T. G. α-Acyl-o-tolunitriles as intermediates in the preparation of 3-substituted isoquinolines and 1-amino-2-benzopyrylium derivatives. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3817–3820, 1978.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRASIL. **Manual de bases técnicas da oncologia - SIA/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais**. 19. ed. [s.l.] Ministério da Saúde, 2015.

BROECKER-PREUSS, M. et al. Cell death induction by the BH3 mimetic GX15-070 in thyroid carcinoma cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, p. 69, 2015.

BROWN, K. C. et al. Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10243, 2010.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw-Hill, 2012.

CAO, F. J. et al. Pseudocyanides of sanguinarine and chelerythrine and their series of structurally simple analogues as new anticancer lead compounds: Cytotoxic activity, structure-activity relationship and apoptosis induction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, p. 45–54, 2015.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.

CHADWICK, R. C. et al. Metal-free reduction of secondary and tertiary N-phenyl amides by tris(pentafluorophenyl)boron-catalyzed hydrosilylation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 16, p. 7728–7733, 2014.

CHEN, J. et al. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. **Fitoterapia**, v. 103, p. 231–241, 2015.

CHEN, J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 3, p. a026104, 2016.

CHENG, P. et al. Synthesis of 5-methyl phenanthridium derivatives: a new class of human DOPA decarboxylase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**

Letters, v. 24, n. 12, p. 2712–2716, 2014.

CHO, B. T.; SANG, K. K. Direct and indirect reductive amination of aldehydes and ketones with solid acid-activated sodium borohydride under solvent-free conditions. **Tetrahedron**, v. 61, n. 24, p. 5725–5734, 2005.

CHO, W.-J. et al. Molecular modeling of 3-arylisoquinoline antitumor agents active against A-549. A comparative molecular field analysis study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 9, p. 2953–2961, 2002.

CHOI, W. Y. et al. Sanguinarine, a benzophenanthridine alkaloid, induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 279–287, 2008.

CHOI, W. Y. et al. Sanguinarine sensitizes human gastric adenocarcinoma AGS cells to TRAIL-mediated apoptosis via down-regulation of AKT and activation of caspase-3. **Anticancer Research**, v. 29, n. 11, p. 4457–4465, 2009.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2012.

CORBET, J. P.; MIGNANI, G. **Selected patented cross-coupling reaction technologiesChemical Reviews**, 2006.

CROAKER, A. et al. Sanguinaria canadensis: Traditional medicine, phytochemical composition, biological activities and current uses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1414, 2016.

CROSSLEY, M. L. et al. Chemotherapeutic dyes. I. 5-aralkylamino-9-alkylaminobenzo [a]phenoxazines1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 3, p. 573–578, 1952.

CZABOTAR, P. E. et al. Mutation to bax beyond the BH3 domain disrupts interactions with pro-survival proteins and promotes apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 9, p. 7123–7131, 2011.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 2014.

DAINA, A.; O, M.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42717, 2017.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method

for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993.

DE, S. et al. Expeditious approach to pyrrolophenanthridones, phenanthridines, and benzo[c]phenanthridines via organocatalytic direct biaryl-coupling promoted by potassium tert -butoxide. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 16, p. 7823–7844, 2013.

DE STEFANO, I. et al. Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 11, p. 1374–1381, 2009.

DEBITON, E. et al. Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 474–482, 2003.

DELLACQUA, M.; ABBIATI, G.; ROSSI, E. Palladium-catalyzed, microwave-enhanced three-component synthesis of isoquinolines with aqueous ammonia. **Synlett**, n. 17, p. 2672–2676, 2010.

DENG, A. J.; QIN, H. L. Cytotoxic dihydrobenzophenanthridine alkaloids from the roots of Macleaya microcarpa. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, p. 816–822, 2010.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Imunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986.

DI, L. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 1, p. 134–143, 2015.

DIKUSAR, E. A.; KOZLOV, N. G. Synthesis of Schiff Bases from 1-naphthylamine and vanilin, vanillal, and their o-acyl derivatives. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 369–375, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EMERY, I. F. et al. Expression and function of ABCG2 and XIAP in glioblastomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 133, n. 1, p. 47–57, 2017.

EVANS, D. A.; CHAPMAN, K. T.; CARREIRA, E. M. Directed reduction of beta-hydroxy ketones employing tetramethylammonium triacetoxyborohydride. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 11, p. 3560–3578, 1988.

FALLACARA, A. L. et al. A new strategy for glioblastoma treatment: In vitro and in

vivo preclinical characterization of Si306, a pyrazolo[3,4-d]pyrimidine dual Src/P-glycoprotein inhibitor. **Cancers**, v. 11, n. 6, p. 848, 2019.

FDA. **FDA approves new drug for chronic lymphocytic leukemia in patients with a specific chromosomal abnormality**. Silver Spring: [s.n.]. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm495253.htm>.

FERNANDES, T. B. et al. Analysis of the applicability and use of Lipinski's rule for central nervous system drugs. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 13, n. 10, p. 999–1006, 2016.

FERNANDES, T. B. et al. Arylsulfonylhydrazone induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 15, p. 1288–1298, 2018.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 329–344, 2015.

FUKUDA, H. et al. Phenanthridin-6-one derivatives as the first class of non-steroidal pharmacological chaperones for Niemann-Pick disease type C1 protein. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 12, p. 2781–2787, 2017.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1237–1243, 2007.

GARAY, A. et al. Comparison of N-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)naphthalen-1-amine and its reduction product N-(3,4,5-trimethoxybenzyl)naphthalen-1-amine. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 210–215, 2014.

GARRAWAY, L.; JÄNNE, P. Circumventing cancer drug rresistance in the era of personalized medicine. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 3, p. 214–226, 2012.

GHOSH, K.; RATHI, S.; KUSHWAHA, R. Sensing of Fe(III) ion via turn-on fluorescence by fluorescence probes derived from 1-naphthylamine. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 48, p. 6460–6463, 2013.

GIBSON, S. E.; MIDDLETON, R. J. The intramolecular Heck reaction. **Contemporary Organic Synthesis**, v. 3, n. 6, p. 447, 1996.

GILLESPIE, J. P.; AMOROS, L. G.; STERMITZ, F. R. Synthesis of fagaronine, an anticancer benzophenanthridine alkaloid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 39,

n. 22, p. 3239–3241, 1974.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN). **Cancer fact sheet 2018: all cancers**. 2019a Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 10 ago 2019.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN). **Population fact sheets 2018: Brazil**. 2019b. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>. Acesso em: 10 ago 2019.

GREHN, L. et al. **A simple method for tert-butoxycarbonylation of amidesActa Chemica Scandinavica**, 1986. Disponível em: <http://actachemscand.org/doi/10.3891/acta.chem.scand.40b-0745>

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. DA. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. **Molecular Docking**. Bioinformatics: from Biology to molecular flexibility. **Anais**...São Paulo: Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2014

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Revista Genética na Escola**, v. 3, p. 4–7, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119–136, 2017.

GUPTA, S. C. et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer metastasis reviews**, v. 29, n. 3, p. 405–34, 2010.

GUZEN, K. P. et al. Eco-friendly synthesis of imines by ultrasound irradiation. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 10, p. 1845–1848, 2007.

HAMMEROVÁ, J. et al. Benzo[c]phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. **Journal of Dermatological Science**, v. 62, n. 1, p. 22–35, 2011.

HAN, M. H.; YOO, Y. H.; CHOI, Y. H. Sanguinarine-induced apoptosis in human

leukemia U937 cells via Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. **Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 157–165, 2008.

HANADA, S. et al. Practical access to amines by platinum-catalyzed reduction of carboxamides with hydrosilanes: Synergy of dual Si-H groups leads to high efficiency and selectivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 41, p. 15032–15040, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARAYAMA, T. et al. Total synthesis of benzo[c]phenanthridine alkaloids, chelerythrine and 12-methoxydihydrochelerythrine, by a palladium-assisted internal biaryl coupling reaction. **Synthesis-Stuttgart**, n. 3, p. 444–450, 2001.

HARAYAMA, T. et al. Novel synthesis of a new skeletal compound benzonaphthazepine by regioselective C-H activation utilizing the intramolecular coordination of an amine to Pd. **Synthesis**, v. 3, n. 9, p. 1446–1456, 2004.

HECK, R. F. Arylation , methylation , and carboxyalkylation of olefins by group VIII metal derivatives. **Journal of American Chemical Society**, v. 90, n. 20, p. 5518–5526, 1968.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013.

HUANG, Q.; HUNTER, J. A.; LAROCK, R. C. Synthesis of substituted isoquinolines by electrophilic cyclization of iminoalkynes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 3437–3444, 2002.

HUO, Z.; YAMAMOTO, Y. Gold-catalyzed synthesis of isoquinolines via intramolecular cyclization of 2-alkynyl benzyl azides. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 26, p. 3651–3653, 2009.

INCA; CEDC. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 2. ed. [s.l.] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. organização Luiz Claudio Santos Thule, 2012.

INSTITUTE, N. C. **Gossypol in treating patients with progressive or recurrent glioblastoma multiforme**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00540722>. Acesso em: 10 set. 2019.

ISHIKAWA, T. et al. 2-Aryl-1,4-naphthoquinone-1-oxime methyl ethers: their cytotoxic

activity. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 59, n. 4, p. 472–475, 2011.

JAGTAP, S. Heck reaction — state of the art. **Catalysts**, v. 7, n. 9, p. 267, 2017.

JANG, B. C. et al. Sanguinarine induces apoptosis in A549 human lung cancer cells primarily via cellular glutathione depletion. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 2, p. 281–287, 2009.

JANIN, Y. L. et al. Synthesis and evaluation of new 6-amino-substituted benzo[c]phenanthridine derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 23, p. 3686–3692, 1993.

JENG, P. S.; CHENG, E. H. Cancer therapeutics: Pulling the plug on BCL-XL. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 6, p. 351–352, 2013.

JIANG, Z.; ZHENG, X.; RICH, K. M. Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, n. 2, p. 273–281, 2003.

KAJIYAMA, D. et al. A synthetic approach to carbazoles using electrochemically generated hypervalent iodine oxidant. **Tetrahedron**, v. 66, n. 52, p. 9779–9784, 2010.

KANIPANDIAN, N.; LI, D.; KANNAN, S. Induction of intrinsic apoptotic signaling pathway in A549 lung cancer cells using silver nanoparticles from Gossypium hirsutum and evaluation of in vivo toxicity. **Biotechnology Reports**, v. 23, p. e00339, 2019.

KANZAWA, T. et al. Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 5, p. 922–929, 2003.

KARAKI, F. et al. Structure-activity relationship study of non-steroidal NPC1L1 ligands identified through cell-based assay using pharmacological chaperone effect as a readout. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 14, p. 3587–3609, 2014.

KARPEL-MASSLER, G. et al. Combined inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and Usp9X/Bag3 overcomes apoptotic resistance in glioblastoma in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 6, n. 16, p. 14507–14521, 2015.

KAZI, A. et al. The BH3 α-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-XL, Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n.

11, p. 9382–9392, 2011.

KELLEY, C. et al. 3-Phenyl substituted 6,7-dimethoxyisoquinoline derivatives as FtsZ-targeting antibacterial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 24, p. 7012–7029, 2012.

KIM, S. et al. Sanguinarine-induced apoptosis: generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 3, p. 895–907, 2008.

KOCK, C. DE; SMITH, P. J.; CHIBALE, K. Anticancer potential of sanguinarine for various human malignancies. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 357–364, 2017.

KOCK, I. et al. Synthesis and biological evaluation of 11-substituted 6-aminobenzo[c]phenanthridine derivatives, a new class of antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 2772–2777, 2005.

KOHNO, K. et al. A new synthesis of the benzo[c]phenanthridines nornitidine, noravicine, and isodecarine, based on a microwave-assisted electrocyclic reaction of the aza 6π-electron system. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 5, p. 590–592, 2009.

KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415–1420, 1994.

KUMAR, G. S.; HAZRA, S. Sanguinarine, a promising anticancer therapeutic: photochemical and nucleic acid binding properties. **RSC Advanced**, v. 4, n. 99, p. 56518–56531, 2014.

LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 3, p. e1675, 2015.

LE, T. N.; GANG, S. G.; CHO, W. J. A facile synthesis of benzo[c]phenanthridine alkaloids: Oxynitidine and oxysanguinarine using lithiated toluamide-benzonitrile cycloaddition. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 13, p. 2763–2766, 2004.

LEACH, A. R. **Molecular Modeling - Principles and Applications**. 2. ed. Edinburgh: Pearson, 2001.

LEE, C.-H.; HUANG, H.-C.; JUAN, H.-F. Reviewing ligand-based rational drug design: the search for an ATP synthase inhibitor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 5304–5318, 2011.

LEE, E. F. et al. High-resolution structural characterization of a helical α/β-peptide foldamer bound to the anti-apoptotic protein Bcl-x L. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 24, p. 4318–4322, 2009.

LEE, E. F.; DOUGLAS FAIRLIE, W. The structural biology of Bcl-xL. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2234, 2019.

LEE, K. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 919, p. 500–516, 2010.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes and Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198–210, 2016.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, n. January, p. 188–196, 2018.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 7. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

LI, T. et al. Economical and efficient aqueous reductions of high melting-point imines and nitroarenes to amines: promotion effects of granular PTFE. **RSC Advances**, v. 4, n. 63, p. 33599, 2014a.

LI, W. et al. Pharmacokinetic and anti-inflammatory effects of sanguinarine solid lipid nanoparticles. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 632–638, 2014b.

LI, W. R.; LIN, Y. S.; HSU, N. M. New phenanthridine linkers for the solid-phase synthesis of acid-containing compounds. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 634–642, 2001.

LIU, Q.; WANG, H.-G. Anti-cancer drug discovery and development: Bcl-2 family small molecule inhibitors. **Communicative & integrative biology**, v. 5, n. 6, p. 557–65, 2012.

LIU, Y. et al. Metal-free transamidation of secondary amides via selective N-C cleavage under mild conditions. **Organic Letters**, v. 19, n. 7, p. 1614–1617, 2017.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 6, p. 957–962, 2015.

MACHADO, S. M.; SAWADA, N. O. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico adjuvante. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 750–757, 2008.

MAKHEY, D. et al. Substituted benzo[i]phenanthridines as mammalian topoisomerase-targeting agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1809–1820, 2003.

MALÍKOVÁ, J. et al. The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. **Cell Biology and Toxicology**, v. 22, n. 6, p. 439–453, 2006.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.

MATKAR, S. S.; WRISCHNIK, L. A.; HELLMANN-BLUMBERG, U. Production of hydrogen peroxide and redox cycling can explain how sanguinarine and chelerythrine induce rapid apoptosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 477, n. 1, p. 43–52, 2008.

MCMURRY, J. E. **Organic Chemistry**. 8. ed. Belmont: Brooks Cole, 2011.

MENA, S. et al. Glutathione and Bcl-2 targeting facilitates elimination by chemoradiotherapy of human A375 melanoma xenografts overexpressing bcl-xl, bcl-2, and mcl-1. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 8, 2012.

MENG, G.; LEI, P.; SZOSTAK, M. A general method for two-step transamidation of secondary amides using commercially available, air- and moisture-stable palladium/NHC (N-heterocyclic carbene) complexes. **Organic Letters**, v. 19, n. 8, p. 2158–2161, 2017.

MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 7, p. 2457–2483, 1995.

MOLANDER, G. A.; TRICE, S. L. J.; TSCHAEN, B. A modified procedure for the palladium catalyzed borylation/Suzuki-Miyaura cross-coupling of aryl and heteroaryl halides utilizing bis-boronic acid. **Tetrahedron**, v. 71, n. 35, p. 5758–5764, 2015.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827–10852, 2005.

MORENO, I. et al. Novel applications of hypervalent iodine: PIFA mediated synthesis of benzo[c]phenanthiridines and benzo[c]phenanthridinones. **Tetrahedron**, v. 57, n. 25, p. 5403–5411, 2001.

MUCHMORE, S. W. et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL an inhibitor of programmed cell death. **Nature**, v. 381, p. 335–341, 1996.

MULLARD, A. Pioneering apoptosis-targeted cancer drug poised for FDA approval. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 3, p. 147–149, 2016.

MUNOZ, J. L. et al. Temozolomide induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 10, p. 2399–2411, 2014.

MUTHAYALA, M. K.; KUMAR, A. Ionic liquid-supported aldehyde: A highly efficient scavenger for primary amines. **ACS Combinatorial Science**, v. 14, n. 1, p. 5–9, 2012.

NADENDLA, R. R. Molecular modeling: A powerful tool for drug design and molecular docking. **Resonance**, v. 9, n. 5, p. 51–60, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OBSERVATORY, G. C. **Brain, nervous system**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/31-Brain-central-nervous-system-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 9 out. 2019.

OGINO, A. et al. The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 64, n. 5, p. 398–403, 2005.

OH, S. J. et al. Human U87 glioblastoma cells with stemness features display enhanced sensitivity to natural killer cell cytotoxicity through altered expression of NKG2D ligand. **Cancer Cell International**, v. 17, n. 22, p. 1–9, 2017.

OOMS, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 141–158, 2000.

OPYDO-CHANEK, M.; GONZALO, O.; MARZO, I. Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects. **Biochemical Pharmacology**, v. 136, p. 12–23, 2017.

ORELLANA, E. A.; KASINSKI1, A. L. Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. **Bio Protocol**, v. 6, n. 21, p. e1984, 2016.

PAGLIARO, M. et al. A new class of heterogeneous Pd catalysts for synthetic organic chemistry. **Catalysis Science & Technology**, v. 1, n. 5, p. 736, 2011.

PARHI, A. et al. Antibacterial activity of substituted 5-methylbenzo[c]phenanthridinium derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**

Letters, v. 22, p. 7080–7083, 2012.

PATEL, M. M.; PATEL, B. M. Crossing the blood–brain barrier: recent advances in drug delivery to the brain. **CNS Drugs**, v. 31, n. 2, p. 109–133, 2017.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5. ed. New York: Oxford University Press, 2013.

PEÑA-SOLÓRZANO, D. et al. Tariquidar-related chalcones and ketones as ABCG2 modulators. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 8, p. 854–859, 2018.

PERAZZOLI, G. et al. Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: Implication of MGMT, MMR, P-glycoprotein and CD133 expression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0140131, 2015.

PIETENPOL, J. A.; STEWART, Z. A. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181–182, p. 475–481, 2002.

PINE, S. H.; SANCHEZ, B. L. The formic acid-formaldehyde methylation of amines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 829–832, 1971.

PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

PRADO, S. et al. Synthesis and cytotoxic activity of benzo[c][1,7] and [1,8]phenanthrolines analogues of nitidine and fagaronine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 14, p. 3943–3953, 2004.

PRADO, S.; MICHEL, S.; KOCH, M. Synthesis of benzo[c][1, 8]phenanthrolin-6-one through cyclization of N-(isoquinol-5-yl) -2-bromo-benzamide derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1261–1265, 2006.

PUCCI, B.; KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cell cycle and apoptosis. **Neoplasia**, v. 2, n. 4, p. 291–299, 2000.

RAGHAV, P. K.; VERMA, Y. K.; GANGENAHALLI, G. U. Peptide screening to knockdown Bcl-2's anti-apoptotic activity: implications in cancer treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 796–814, 2012.

RAJAN, S. et al. Structural transition in Bcl-xL and its potential association with mitochondrial calcium ion transport. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10609, 2015.

RAO, X. et al. A highly efficient and aerobic protocol for the synthesis of N-heteroaryl substituted 9-arylcarbazolyl derivatives via a palladium-catalyzed ligand-free Suzuki reaction. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 39, p. 7875, 2012.

RILEY, J. S. et al. DED or alive: assembly and regulation of the death effector domain complexes. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 8, p. e1866, 2015.

RIVOIRE, W. A. et al. Molecular Basis of Cervical Oncogenesis. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179–184, 2001.

RUBIN, E. **Patologia: As bases patológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SÁ JUNIOR, P. L. et al. RPF101 , a new capsaicin-like analogue , disrupts the microtubule network accompanied by arrest in the G2 / M phase , inducing apoptosis and mitotic catastrophe in the MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, p. 385–398, 2013.

SAEED, M. E. M. et al. Molecular determinants of sensitivity or resistance of cancer cells toward sanguinarine. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 136, p. 3919–3927, 2018.

SAINSBURY, M.; DYKE, S. F.; MOON, B. J. 1,2-dihydroisoquinolines. Part XIII. Synthesis of sanguinarine chloride. **Journal of the Chemical Society**, v. 13, p. 1797–1800, 1970.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 505–512, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 49–57, 2009.

SCHAICH, M. et al. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 1, p. 175–181, 2009.

SCHOOL, T. M. M. **Gossypol combined with docetaxel and cisplatin scheme in advanced Non small-cell lung cancers with APE1 high expression (GTCA)**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01977209?term=gossypol&cond=cancer&phase=2&rank=1>. Acesso em: 10 set. 2019.

ŞERBETÇI, T. et al. Synthesis and biological evaluation of dialkylaminoalkylamino benzo[c][1,7] and [1,8]phenanthrolines as antiproliferative agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2547–2558, 2010.

SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 4, p. 526–539, 2015.

SHARMA, S. et al. A study of anti-inflammatory activity of some novel alpha-amino naphthalene and beta-amino naphthalene derivatives. **Archiv der Pharmazie**, v. 339, n. 3, p. 145–52, 2006.

SILVA, I. N. DE C. J. A. G. DA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 5. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrometrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SLANINOVÁ, I. et al. Screening of minor benzo[c]phenanthridine alkaloids for antiproliferative and apoptotic activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 2, p. 131–139, 2007.

SLANINOVÁ, I. et al. Antitumour activities of sanguinarine and related alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 51–68, 2014.

SLOVITER, H. A. Halogenated benzophenoxazine dyes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 10, p. 3360–3362, 1949.

SMIDRKAL, J. Synthesis of fagaronine. **Collection Czechoslovak Chemical Comunications**, v. 53, p. 3184–3192, 1988.

ŠMIDRKAL, J. Synthesis of sanguinarine, chelerythrine and oxysanguinarine. **Colecction of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 49, n. 6, p. 1412–1420, 1984.

SMITH, D. A. et al. Relevance of half-life in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 10, p. 4273–4282, 2018.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's Advanced Organic Chemistry**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007.

SOMENSI, N. et al. Extracellular HSP70 activates ERK1/2, NF-κB and pro-inflammatory gene transcription through binding with RAGE in A549 human lung cancer cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 2507–2522, 2017.

SOUZA, F. DA C. **Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16INK4A replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

SPENCER-NETTO, F. A. C.; FERRAZ, E. M. Apoptose , neutrófilos e o cirurgião. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 28, n. 1, p. 56–61, 2000.

STEWART, J. J. P. Application of the PM6 method to modeling the solid state. **Journal of Molecular Modeling**, v. 14, p. 499–535, 2008.

STEWART, J. J. P. Application of the PM6 method to modeling proteins. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, p. 765–805, 2009.

STOKES, B. J. et al. Rh 2(II)-catalyzed synthesis of carbazoles from biaryl azides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 3225–3228, 2009.

STÝSKALA, J.; HLAVÁČ, J.; CANKAŘ, P. Synthesis of oxidative dihydroxy metabolites of benzo[c]phenanthridines. **Tetrahedron**, v. 69, n. 23, p. 4670–4678, 2013.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. **Methods in Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press Inc, 1991.

SUN, M. et al. Sanguinarine suppresses prostate tumor growth and inhibits survivin expression. **Genes & Cancer**, v. 1, n. 3, p. 283–292, 2010.

SUVARNA, V.; SINGH, V.; MURAHARI, M. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. **European Journal of Pharmacology**, v. 862, n. May, p. 172655, 2019.

SUZUKI, A. Recent advances in the cross-coupling reactions of organoboron derivatives with organic electrophiles, 1995–1998. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 576, n. 1–2, p. 147–168, 1999.

TATTON, M. R.; SIMPSON, I.; DONOHOE, T. J. New methods for the synthesis of naphthyl amines; application to the synthesis of dihydrosanguinarine, sanguinarine, oxysanguinarine and (±)-maclekarpines B and C. **Chemical Communications**, v. 50, n. 77, p. 11314–11316, 2014.

TESTA, B. et al. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 19, p. 179–211, 2000.

TOVAR, J. D.; SWAGER, T. M. Pyrylium salts via electrophilic cyclization: Applications for novel 3- arylisoquinoline syntheses. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 17, p. 6499–6504, 1999.

TRIPATHI, R. et al. Recent development on catalytic reductive amination and applications. **Current Organic Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1093–1115, 2008.

TSOPELAS, F.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 9, p. 885–896, 2017.

VAKKILA, J.; LOTZE, M. T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. August, p. 641–648, 2004.

VALDÉS-RIVES, S. A. et al. Apoptotic signaling pathways in glioblastoma and therapeutic implications. **BioMed Research International**, v. 2017, p. ID 7403747, 2017.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

VAN TELLINGEN, O. et al. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. **Drug Resistance Updates**, v. 19, p. 1–12, 2015.

VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-Like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671–690, 2009.

VELDHUIZEN, A. VAN; DIJK, M. VAN; SANDERS, G. M. 13C NMR spectra of some 1- , 3- and 4-monosubstituted and disubstituted isoquinolines. **Organic Magnetic Resonance**, v. 13, n. 2, p. 105–109, 1980.

VERMAAS, J. V. et al. TopoGromacs: Automated Topology Conversion from CHARMM to GROMACS within VMD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 6, p. 1112–1116, 2016.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VLEESCHOUWER, S. DE. **Glioblastoma**. 1. ed. Brisbane: Codon Publications, 2017.

VOGLER, M. et al. Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 7, p. 1030–1039, 2009.

WEICHET, J.; HODROVÁ, J.; BLÁHA, L. Reduktive aminierung von phenylacetylcarbinolen mittels natriumborhydrid j. **Collection Czechoslovak Chemical Communications**, v. 26, p. 2040–2044, 1961.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3. ed. New York: Academic Press, 2008.

WETZEL, A. et al. Selective alkylation of amines with alcohols by Cp*- iridium(III)

half-sandwich complexes. **Organic Letters**, v. 15, n. 2, p. 266–269, 2013.

WIJAYA, J.; FUKUDA, Y.; SCHUETZ, J. D. Obstacles to brain tumor therapy: Key ABC transporters. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2544, 2017.

WU, G. et al. Overcoming treatment resistance in cancer: Current understanding and tactics. **Cancer Letters**, v. 387, p. 69–76, 2017.

WUTS, P. G. M. **Greene's Protective Groups in Organic Synthesis**. 5. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2014.

XU, G.; SHI, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. **Cell Research**, v. 17, n. 9, p. 759–71, 2007.

YANG, D. et al. Microwave-assisted one-pot synthesis of isoquinolines, furopyridines, and thienopyridines by palladium-catalyzed sequential coupling-imination-annulation of 2-bromoarylaldehydes with terminal acetylenes and ammonium acetate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 9, p. 4466–4472, 2012.

YANG, R. et al. Toward chelerythrine optimization: analogues designed by molecular simplification exhibit selective growth inhibition in non-small-cell lung cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 19, p. 4600–4610, 2016.

YU, X. et al. Alkaloids from the Tribe Bocconieae (Papaveraceae): a chemical and biological review. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13042–13060, 2014.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. **Cancer Letters**, v. 358, n. 2, p. 220–231, 2015.

ZECHMEISTER, L.; TRUKA, J. Notiz über die reduktion von Schiffschen basen. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 2883–2884, 1930.

ZHANG, D.-S. et al. NQO1 involves in the imine bond reduction of sanguinarine and recombinant adeno-associated virus mediated NQO1 overexpression decreases sanguinarine-induced cytotoxicity in rat BRL cells. **Toxicology Letters**, v. 225, n. 1, p. 119–129, 2014.

ZHANG, D.-S. et al. BCL2 promotor methylation and miR-15a/16-1 upregulation is associated with sanguinarine-induced apoptotic death in rat HSC-T6 cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 135–144, 2015.

ZHANG, Y. H. et al. Chelerythrine and sanguinarine dock at distinct sites on Bcl-XL that are not the classic BH3 binding cleft. **Journal of Molecular Biology**, v. 364,

n. 3, p. 536–549, 2006.

ZHAO, C. J. et al. Methanol-promoted borylation of arylamines: A simple and green synthetic method to arylboronic acids and arylboronates. **Synlett**, v. 25, n. 11, p. 1577–1584, 2014.

ZHIKHARKO, Y. D.; KOZLOV, N. G.; BASALAEVA, L. I. Synthesis of (E,E)-N1,N5-disubstituted benzylidenenaphthalene-1,5-diamine. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 82, n. 9, p. 1596–1598, 2012.

ZHOU, H. et al. Structure-based design of potent Bcl-2/Bcl-xL inhibitors with strong in vivo antitumor activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 6149–6161, 2012.

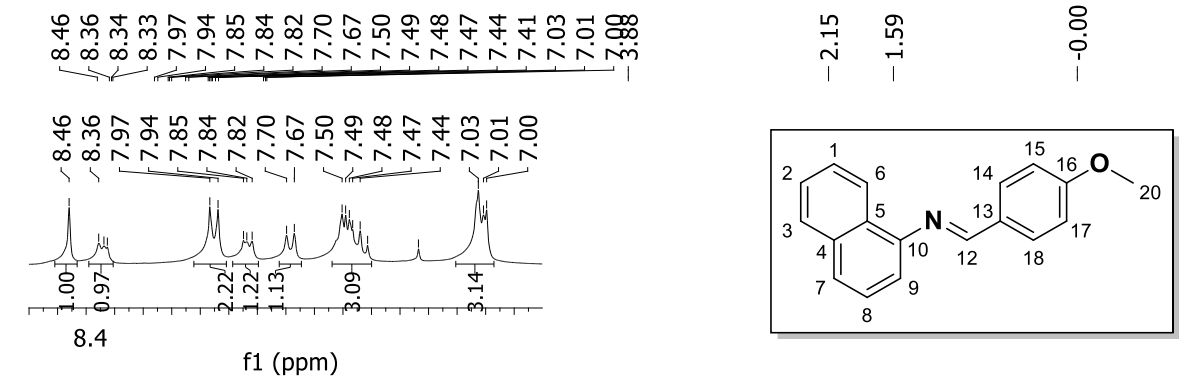
ZHOU, W. et al. Inhibition of Bcl-xL overcomes polyploidy resistance and leads to apoptotic cell death in acute myeloid leukemia cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 21557–21571, 2015.

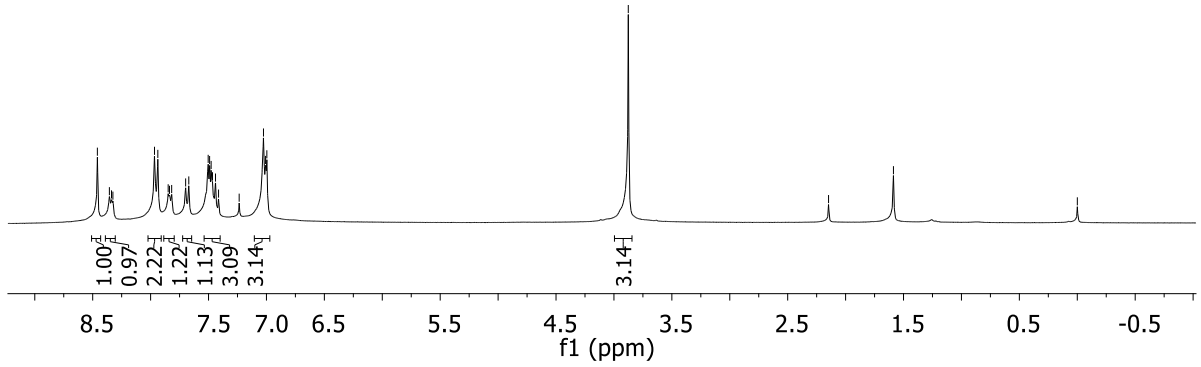
ZOU, Y. et al. Synthesis of anthracene and azaanthracene fluorophores via [2 + 2 + 2] cyclotrimerization reactions. **Organic Letters**, v. 10, n. 20, p. 4661–4664, 2008.

ANEXOS

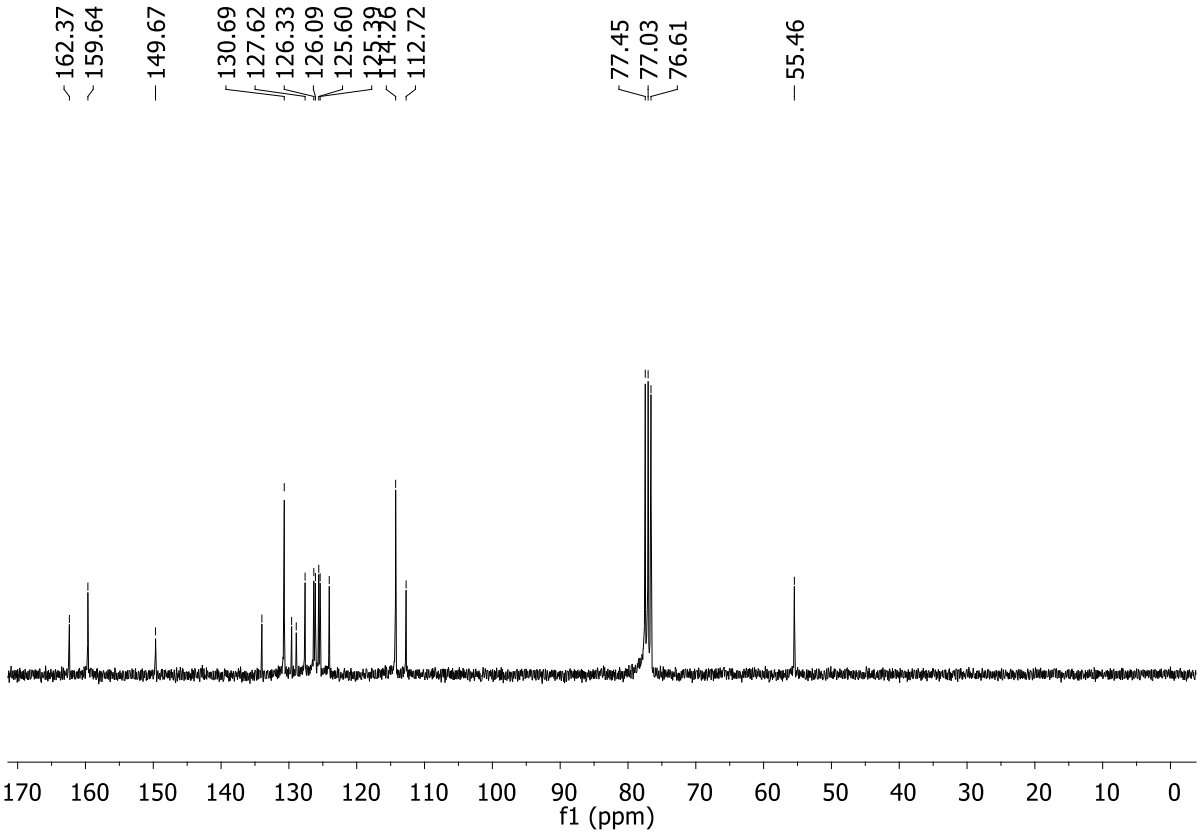
Anexo 1

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatogramas (CLAE)

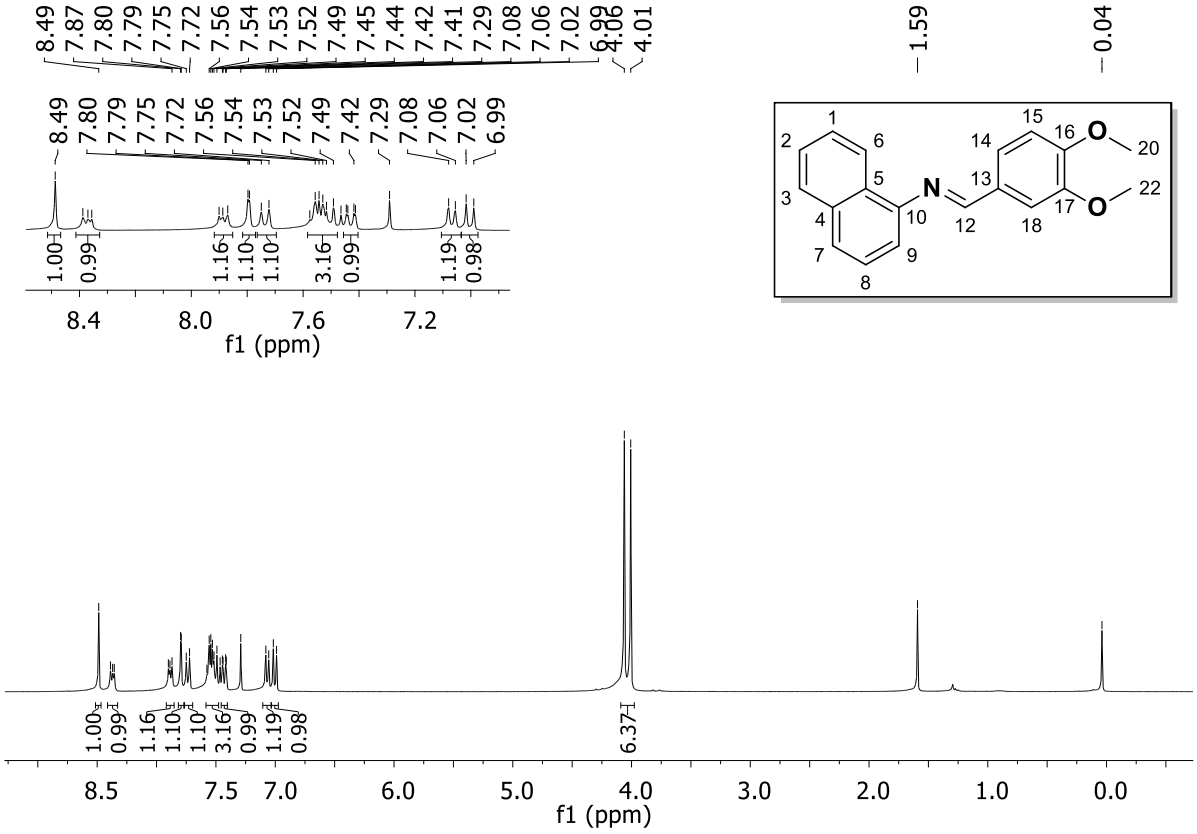




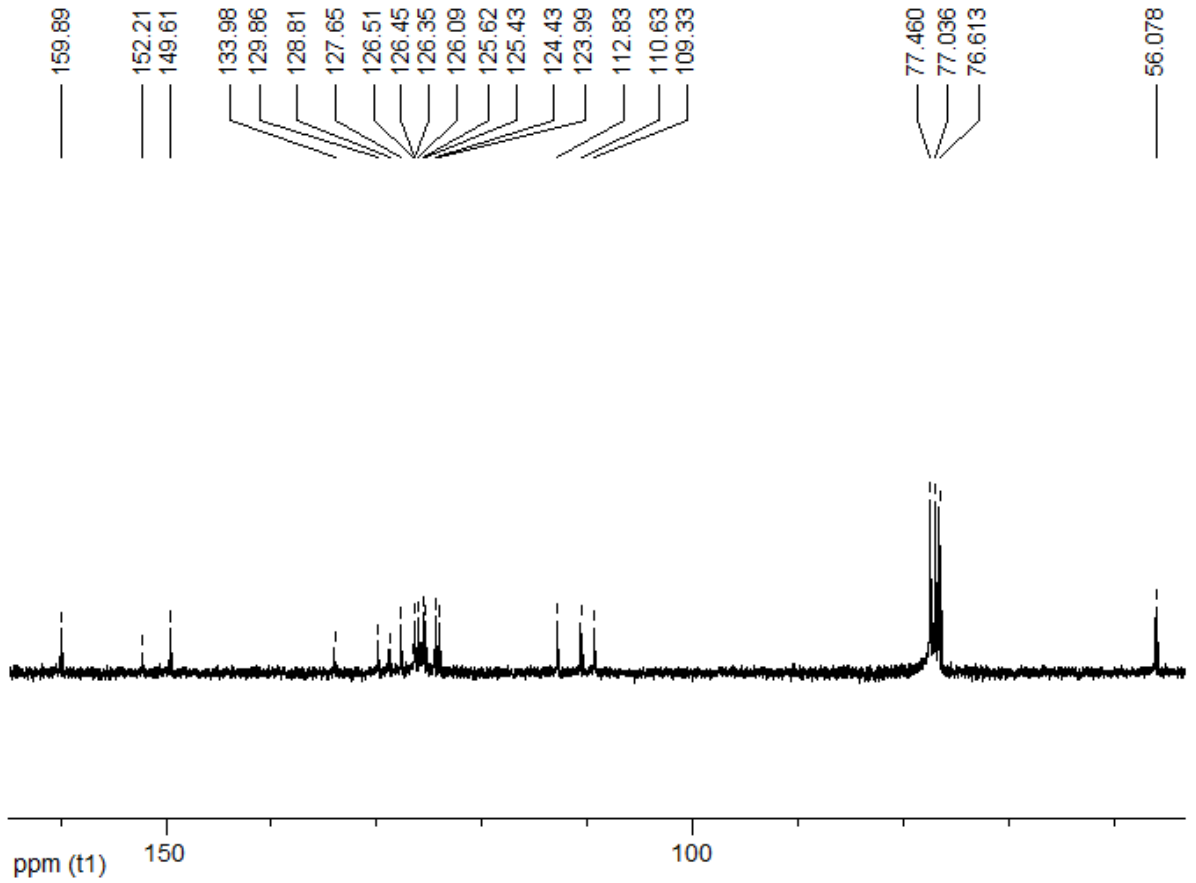
RMN ^{1}H do composto **2a** em $CDCl_3$



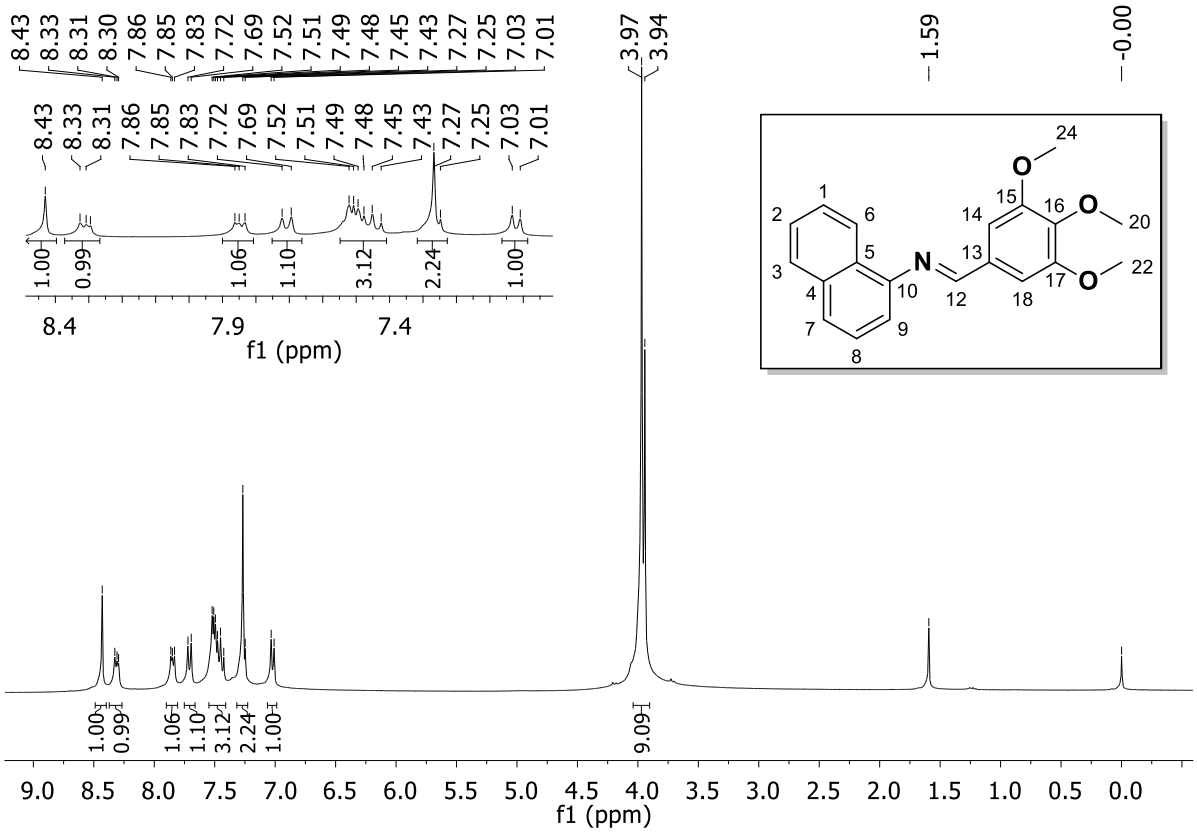
RMN ^{13}C do composto **2a** em $CDCl_3$



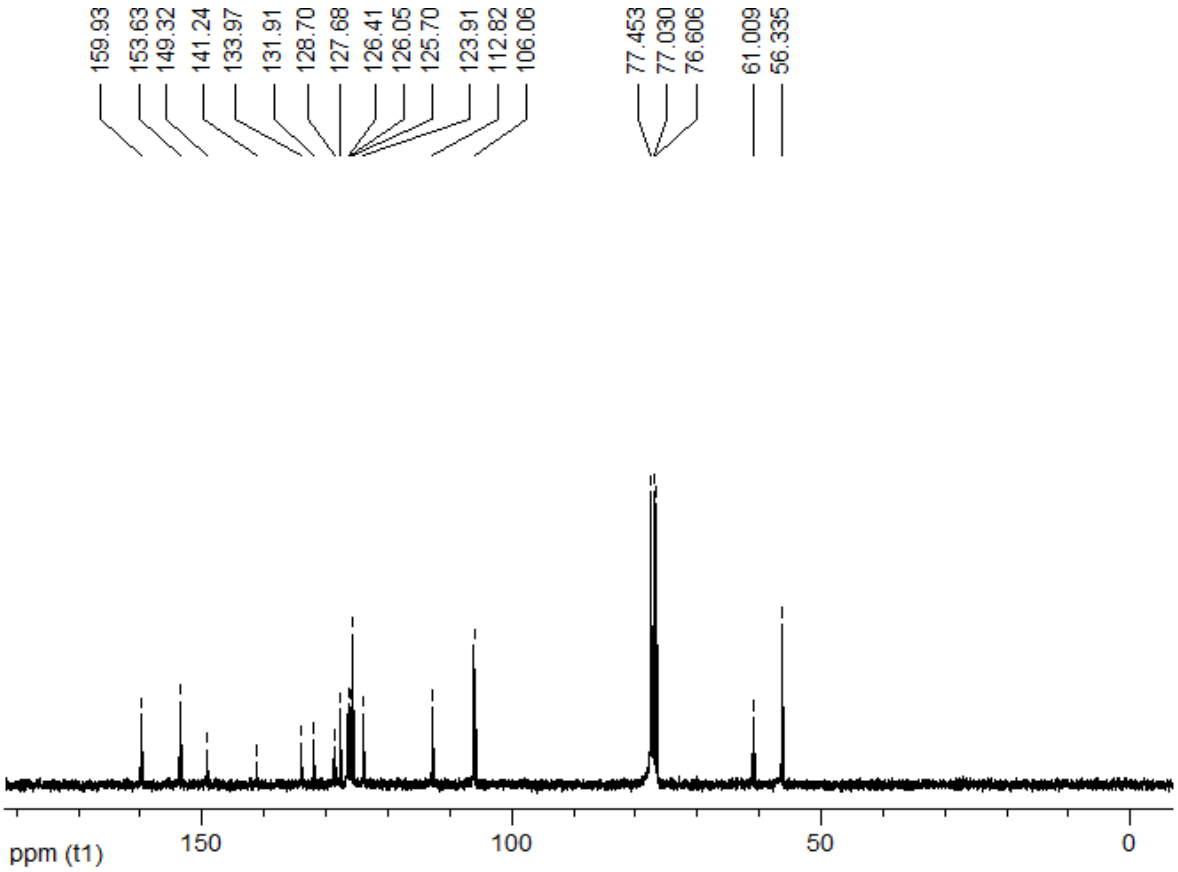
RMN ^{1}H do composto **2b** em $CDCl_3$



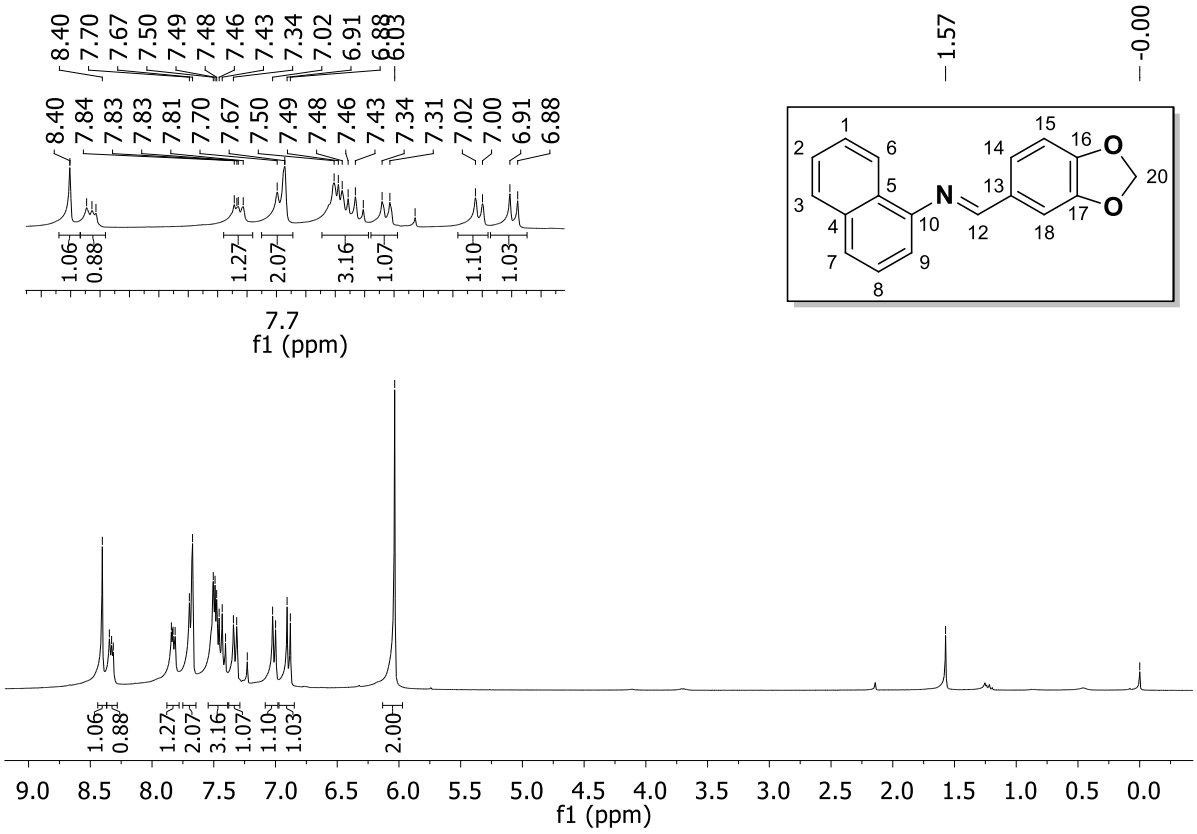
RMN ^{13}C do composto **2b** em $CDCl_3$



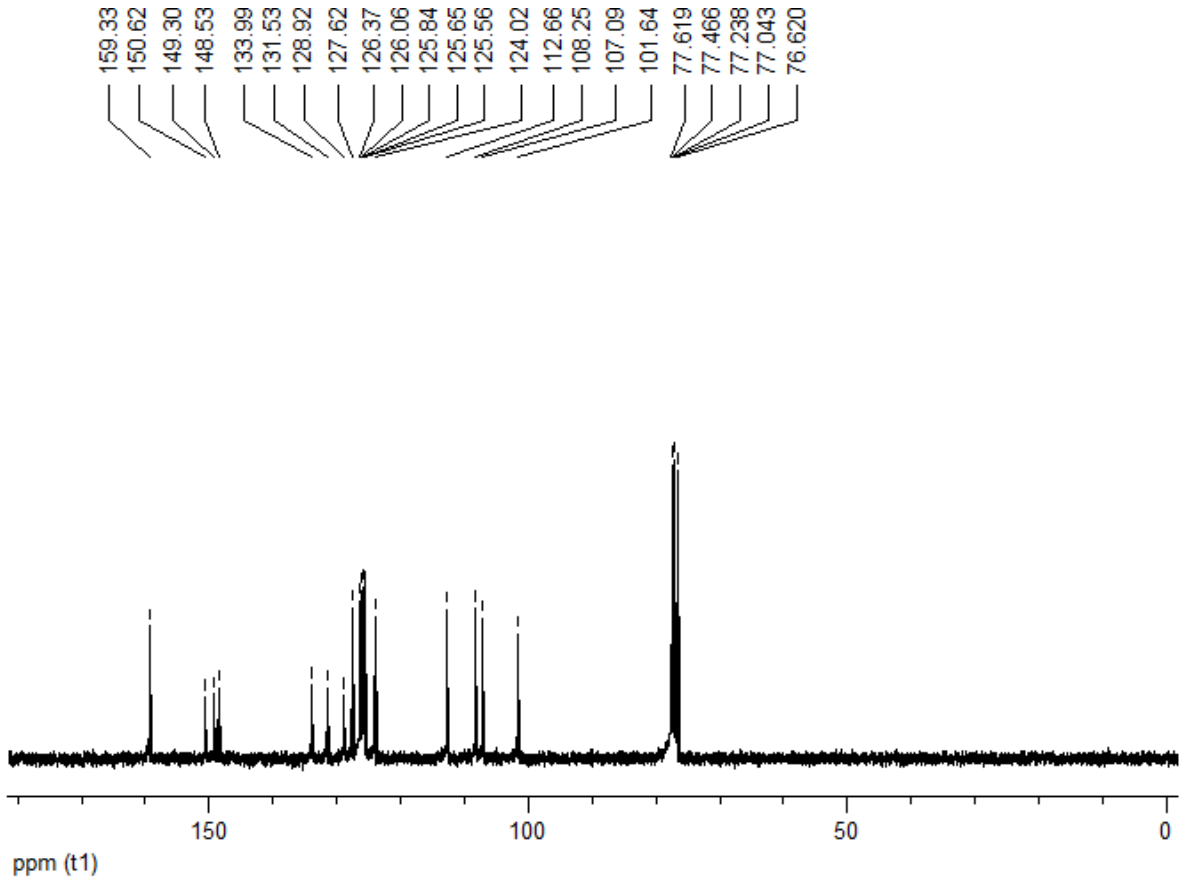
RMN ^{1}H do composto **2c** em $CDCl_3$



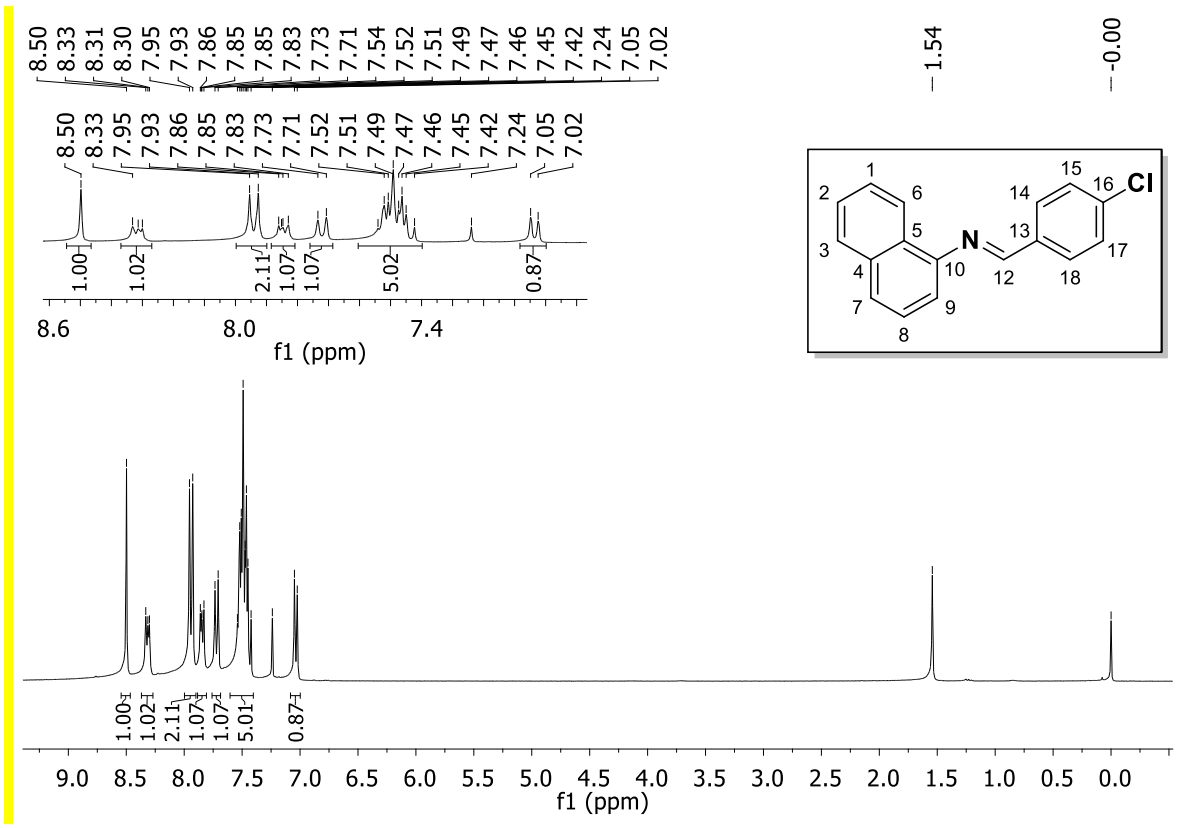
RMN ^{13}C do composto **2c** em $CDCl_3$



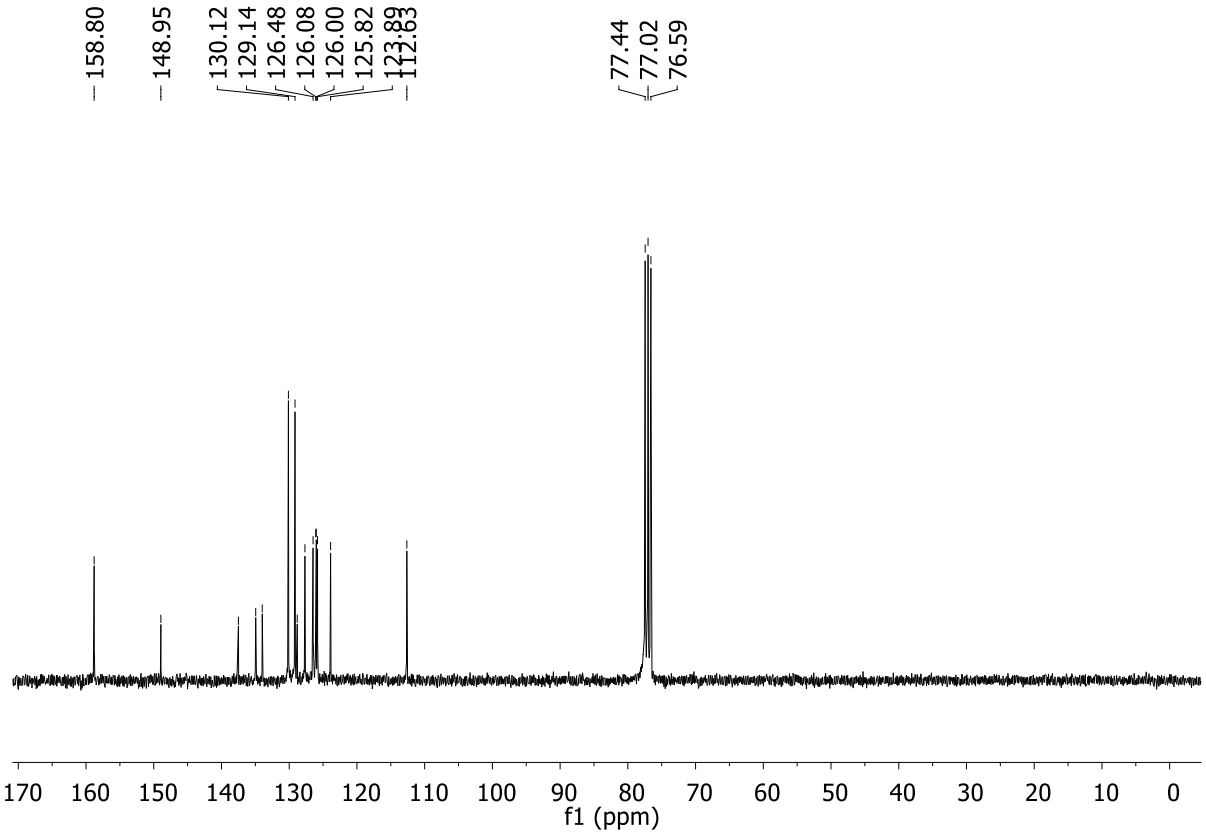
RMN ^{1}H do composto **2d** em $CDCl_3$



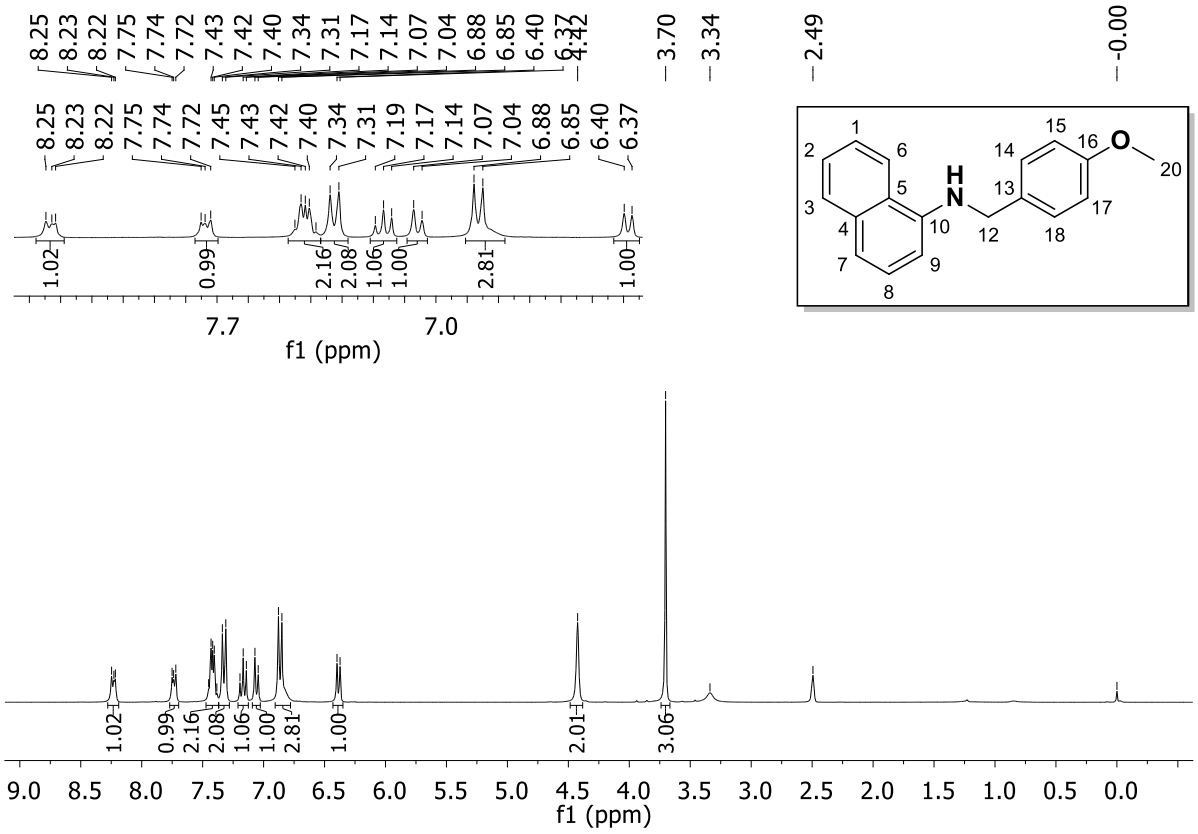
RMN ^{13}C do composto **2d** em $CDCl_3$



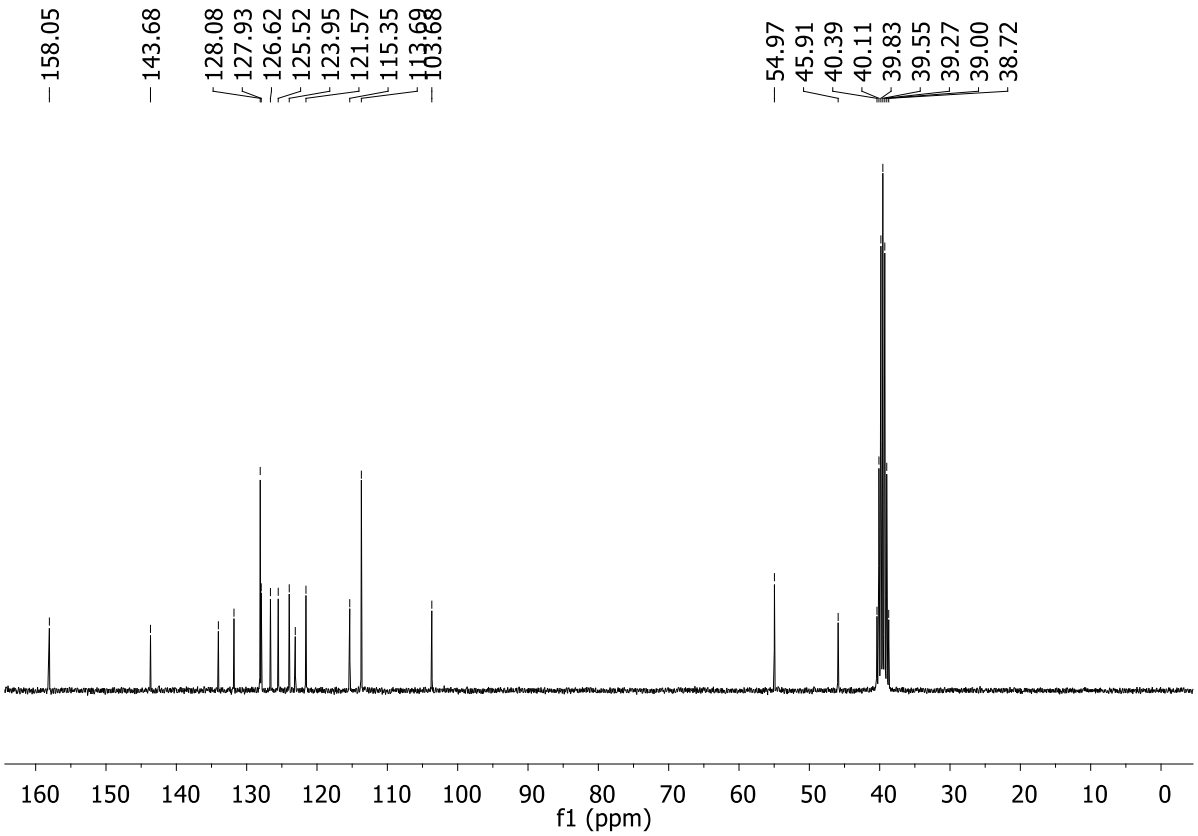
RMN ^{1}H do composto **2e** em $CDCl_3$



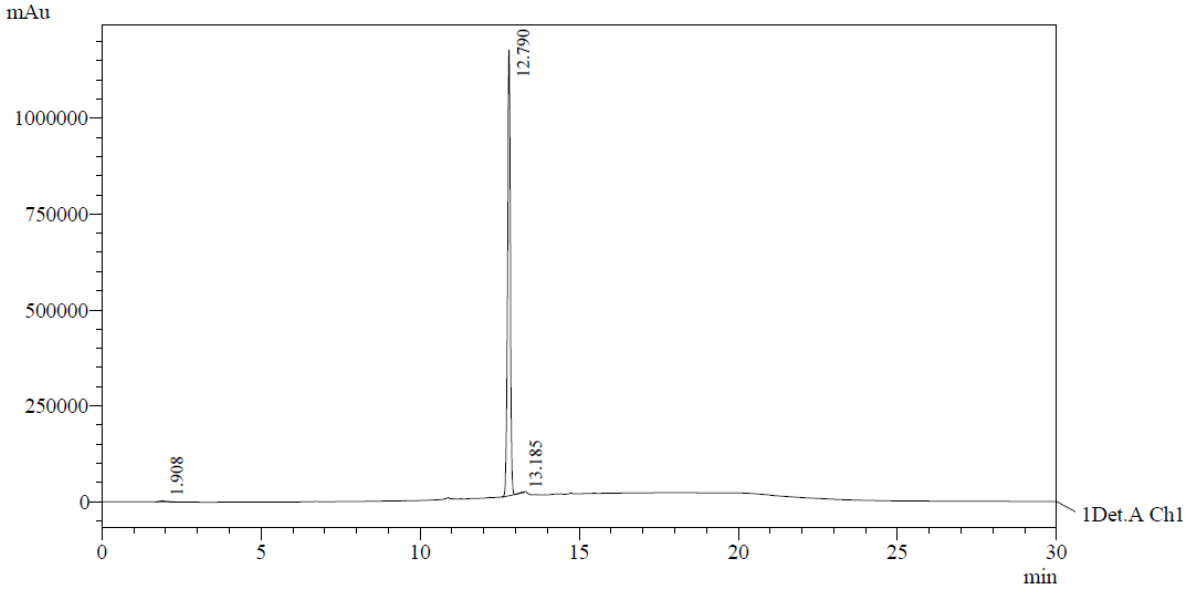
RMN ^{13}C do composto **2d** em $CDCl_3$



RMN ^{1}H do composto **3a** em DMSO-d_6

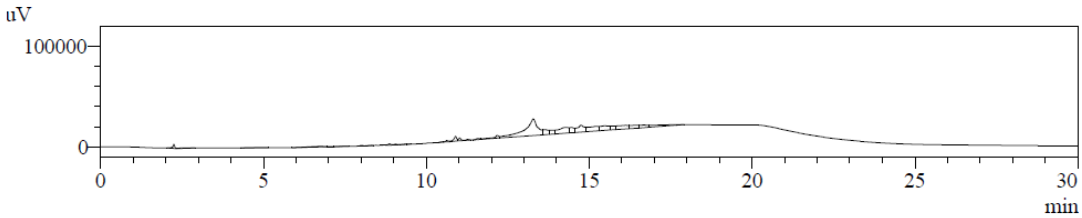


RMN ^{13}C do composto **3a** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



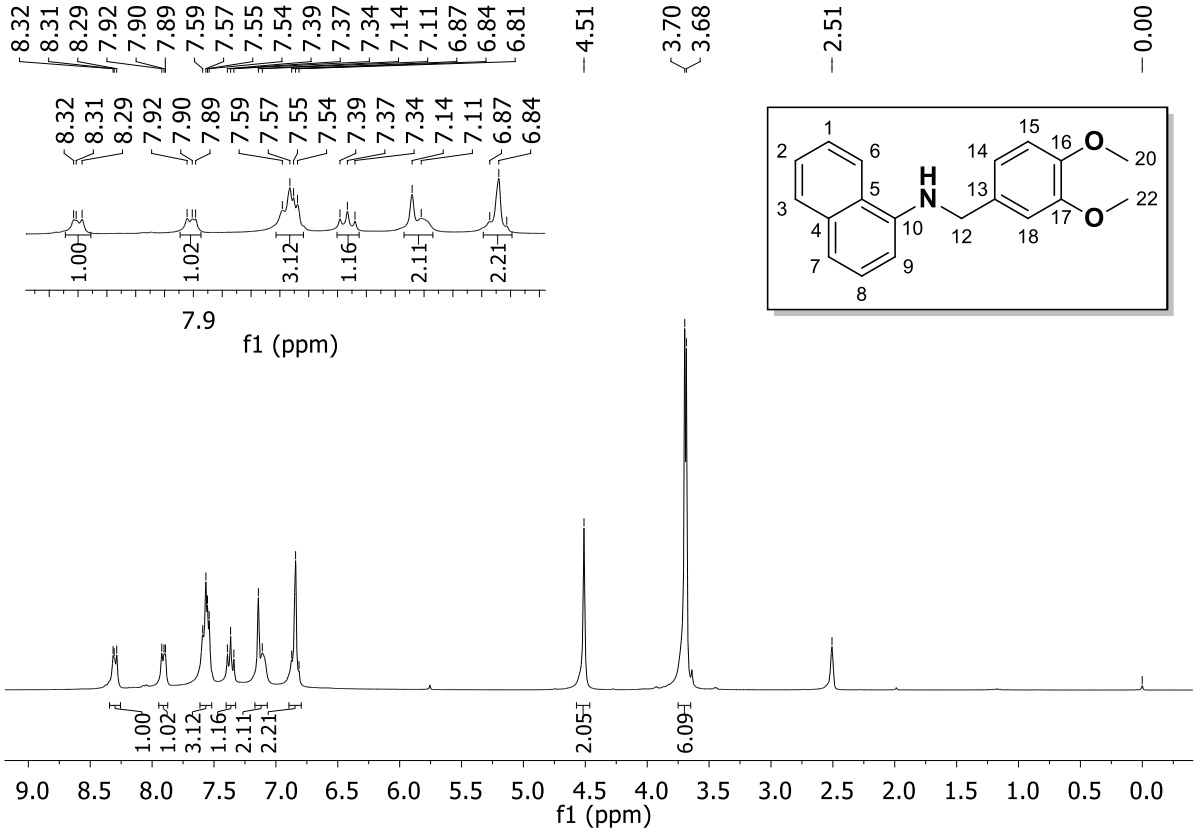
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

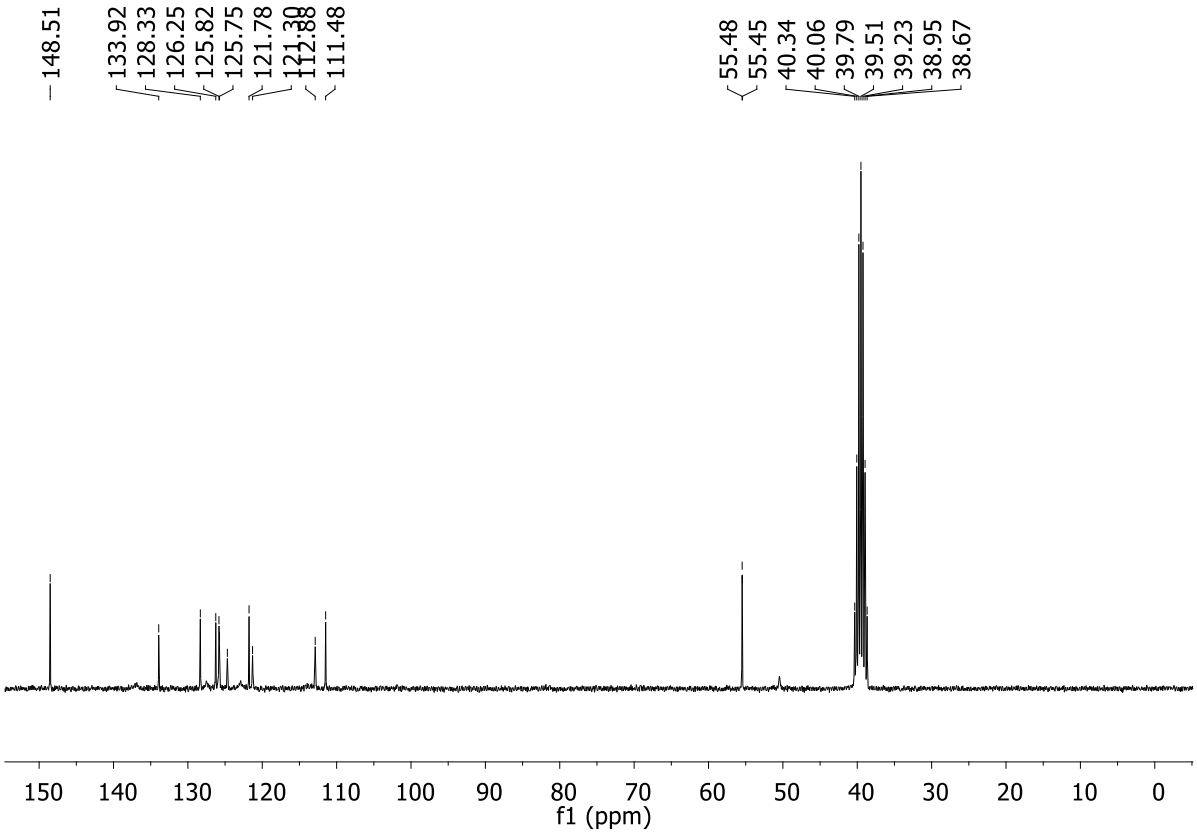
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	1.908	35107	0.000	0.491	0.491
2	12.790	7103970	37.993	99.334	99.334
3	13.185	12547	2.344	0.175	0.175
Total		7151624		100.000	

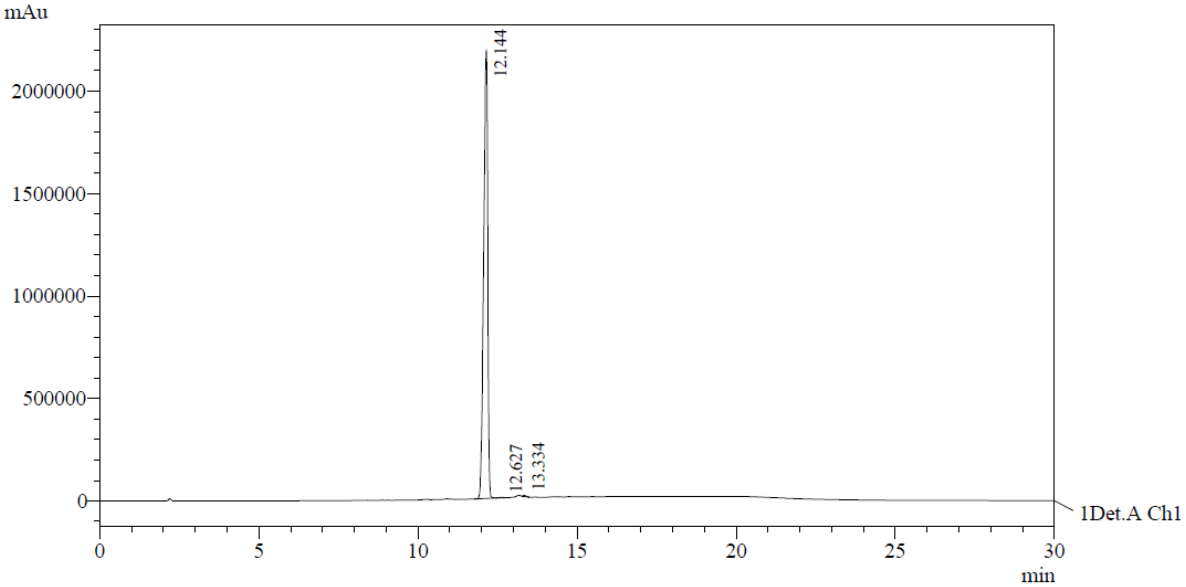
Cromatograma do composto **3a**



RMN ^{1}H do composto **3b** em DMSO-d_6

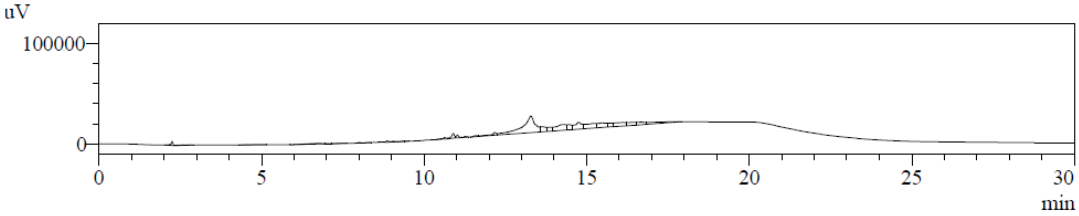


RMN ^{13}C do composto **3b** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



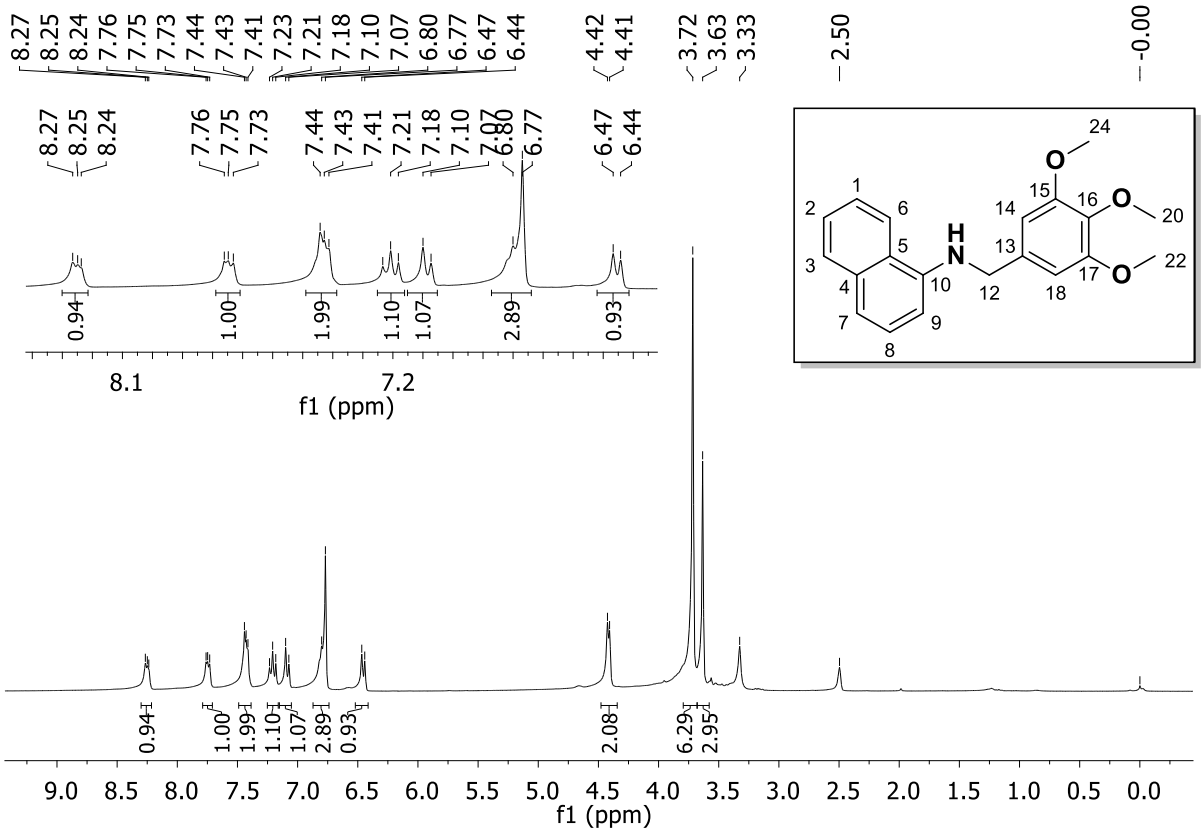
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

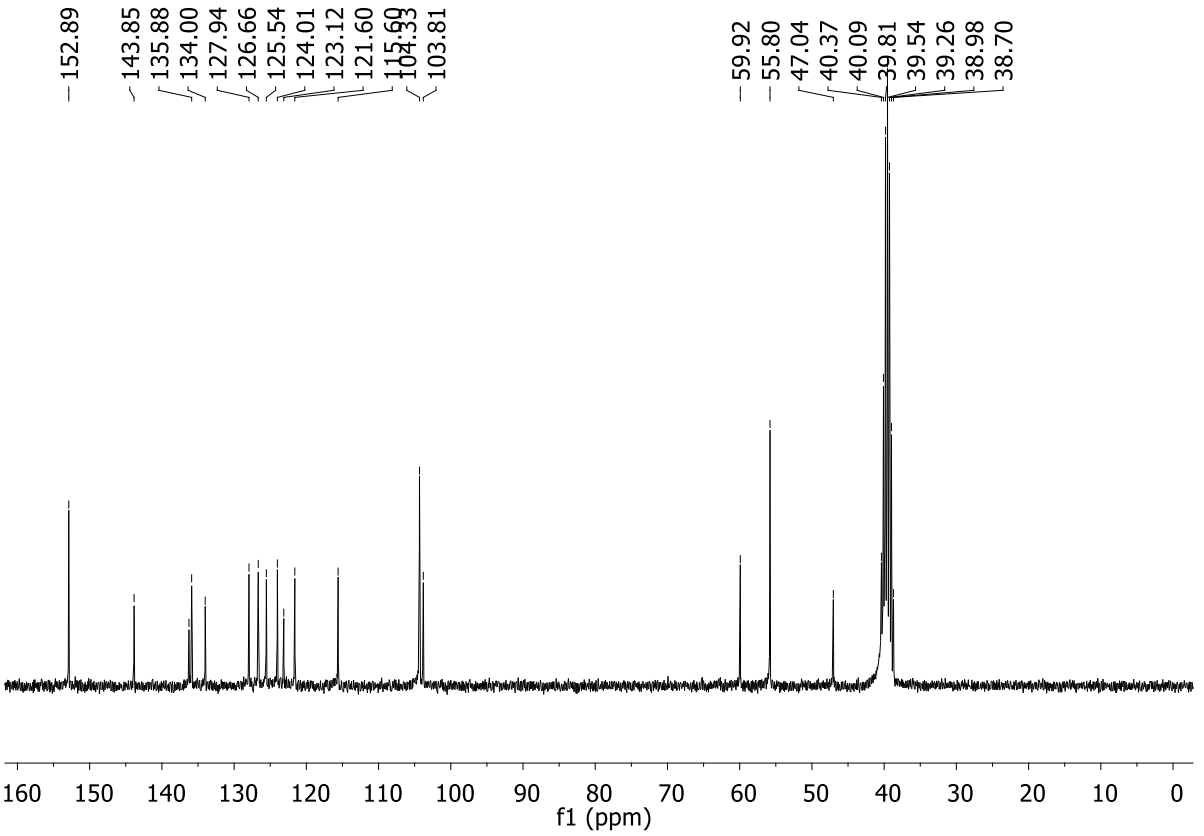
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	12.144	19285569	0.000	99.726	99.726
2	12.627	17472	2.255	0.090	0.090
3	13.334	35441	3.980	0.183	0.183
Total		19338483		100.000	

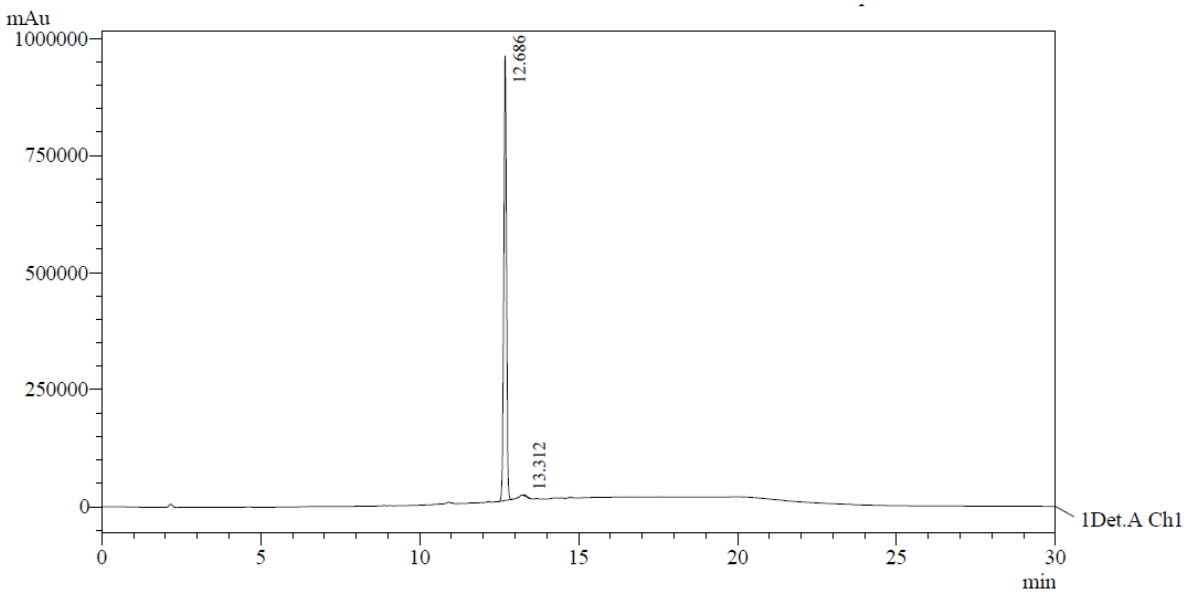
Cromatograma composto **3b**



RMN ^{1}H do composto **3c** em DMSO-d_6

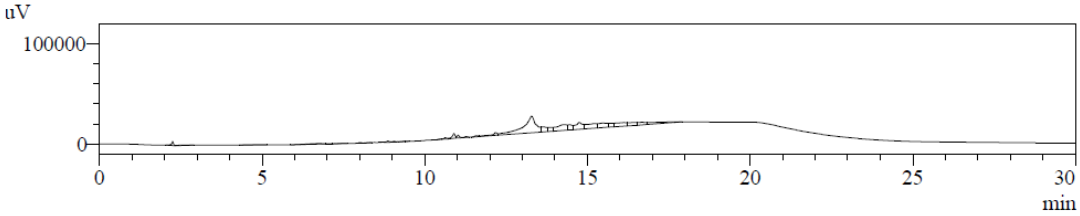


RMN ^{13}C do composto **3c** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



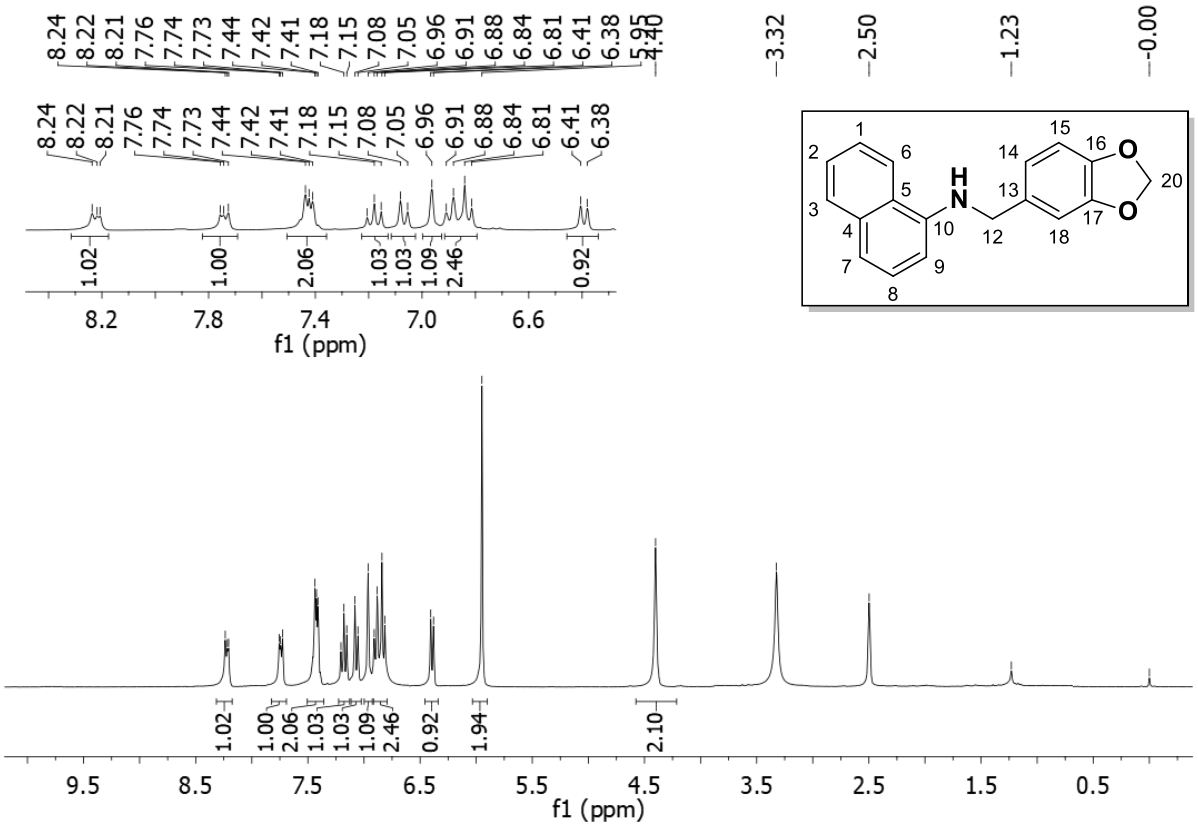
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

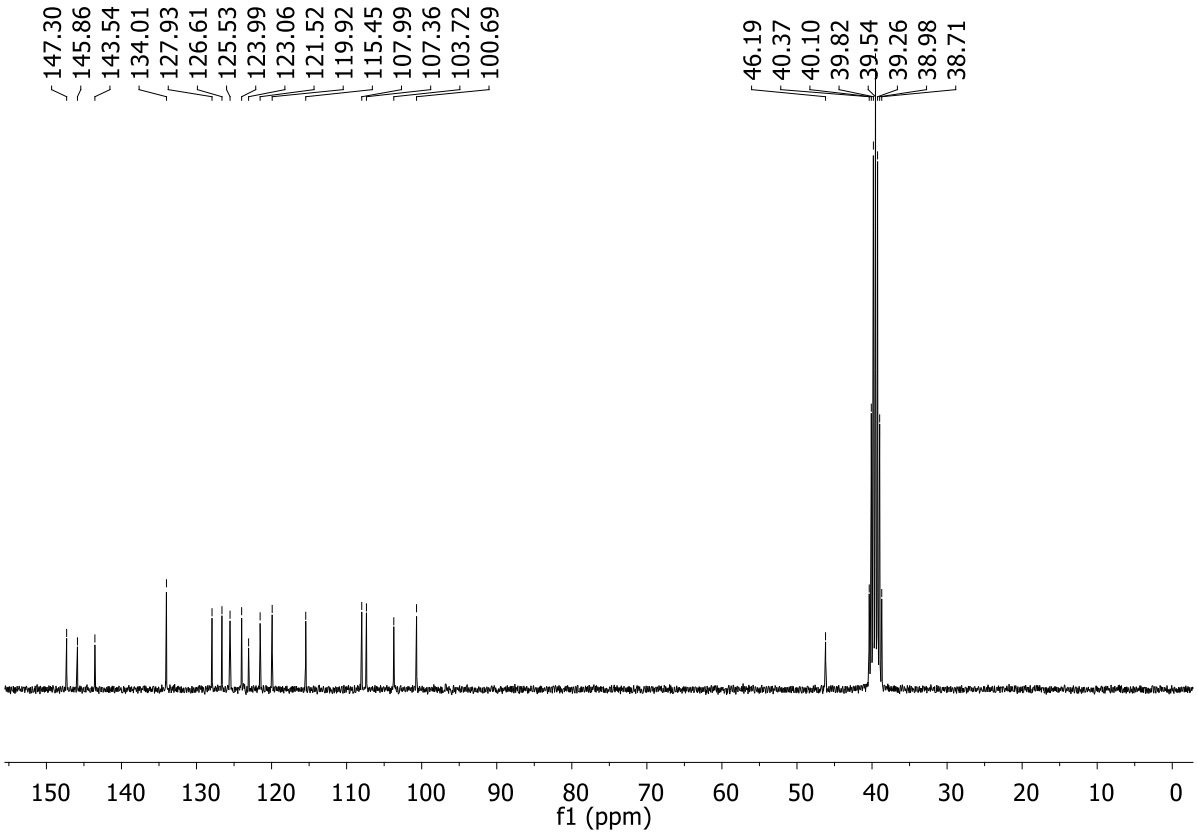
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	12.686	5677821	0.000	99.794	99.794
2	13.312	11713	4.004	0.206	0.206
Total		5689534		100.000	

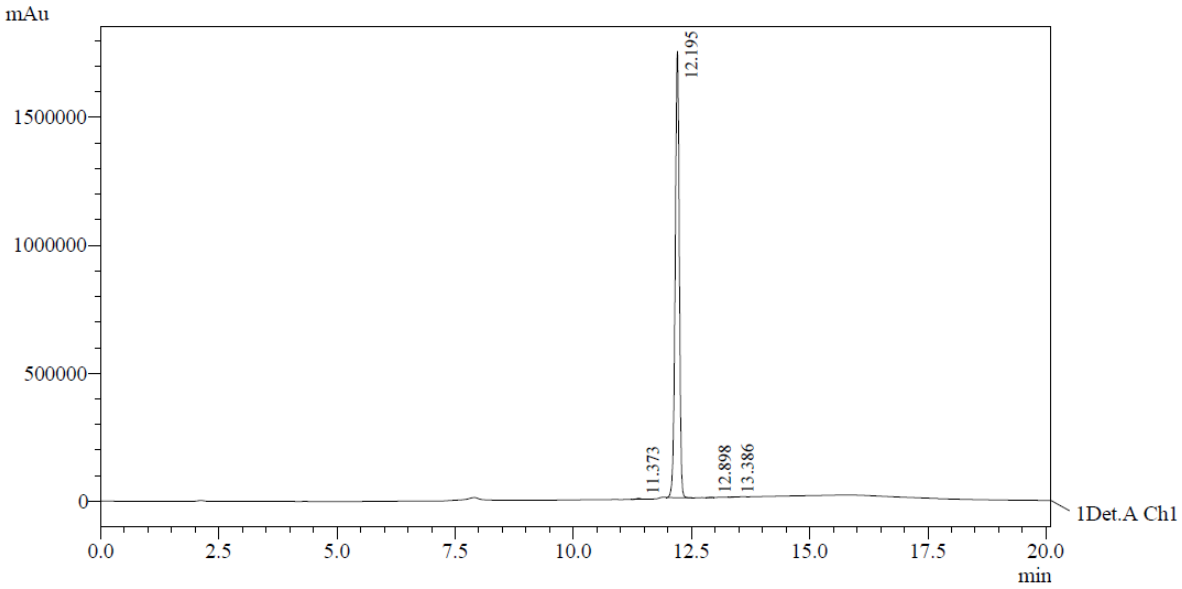
Cromatograma do composto **3c**



RMN ^{1}H do composto **3d** em DMSO-d_6

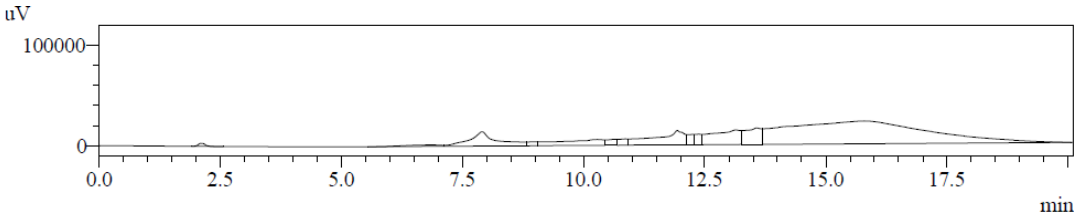


RMN ^{13}C do composto **3d** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



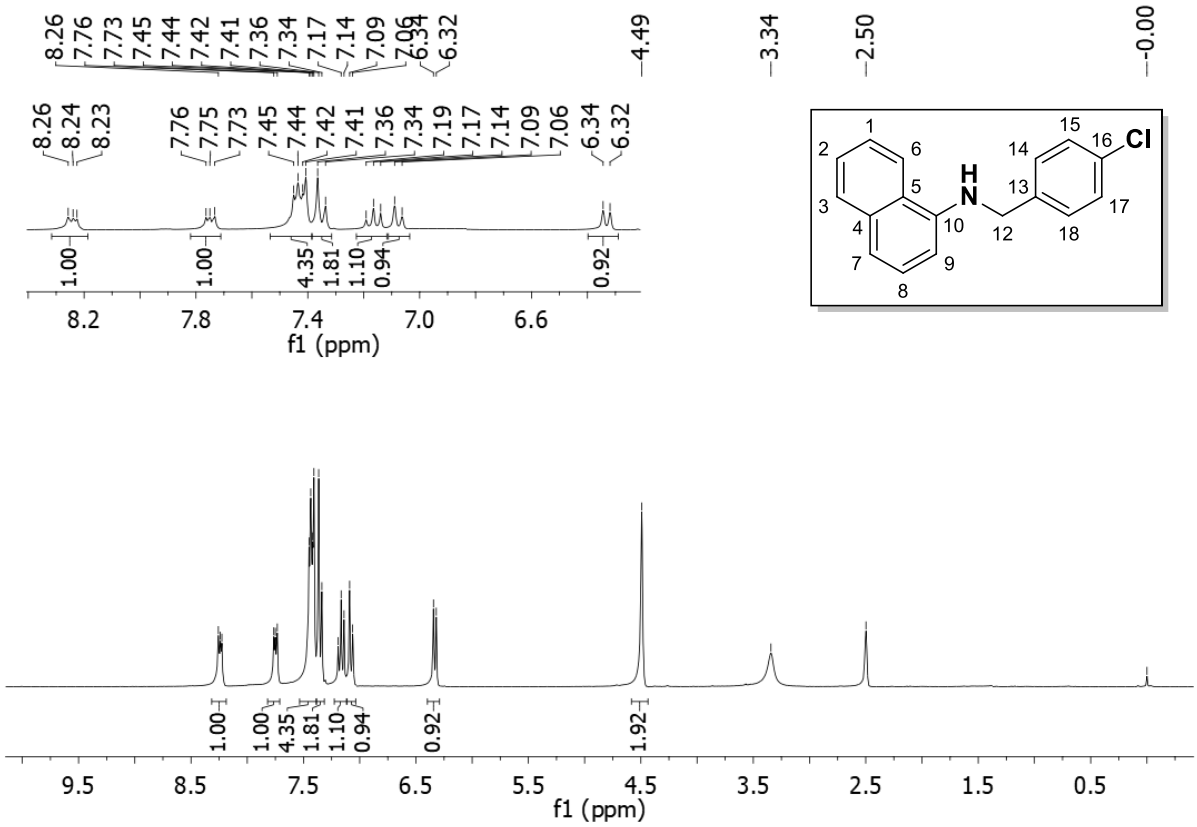
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

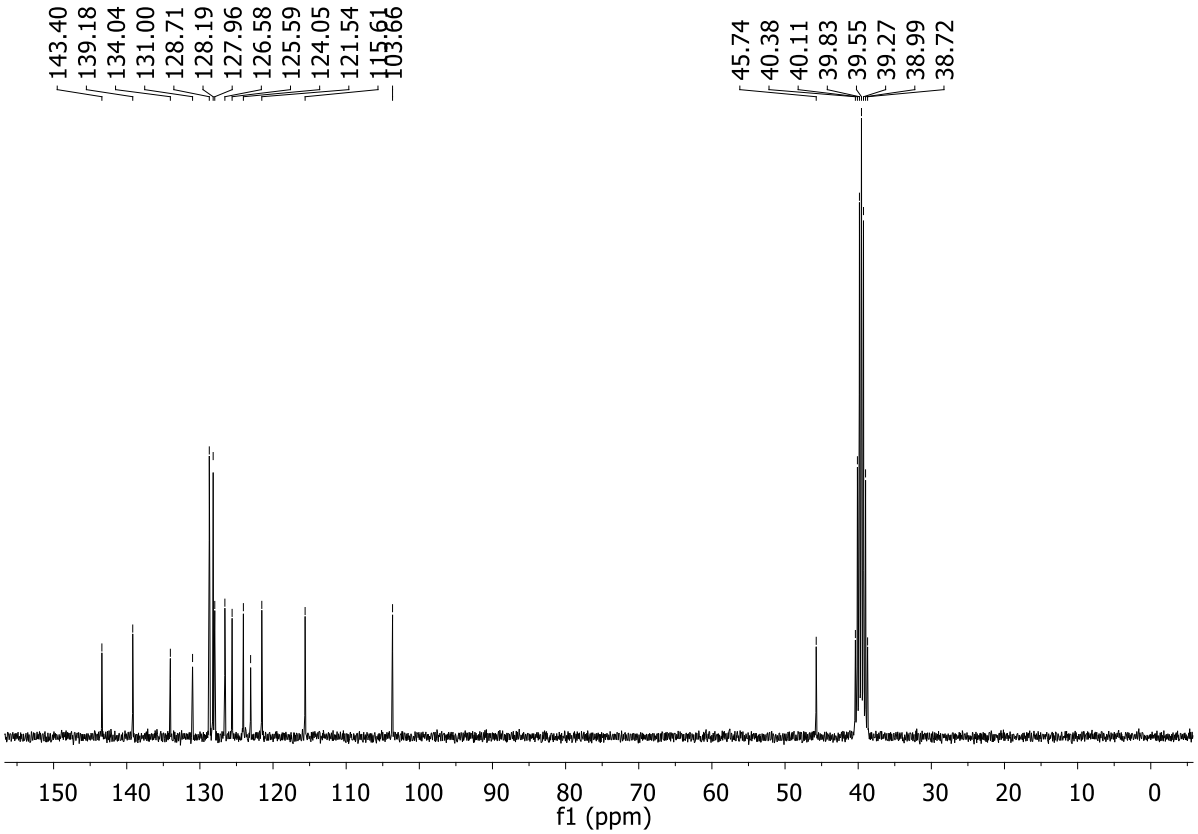
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	11.373	17980	0.000	0.169	0.169
2	12.195	10609016	4.968	99.709	99.709
3	12.898	7053	4.502	0.066	0.066
4	13.386	5928	3.452	0.056	0.056
Total		10639978		100.000	

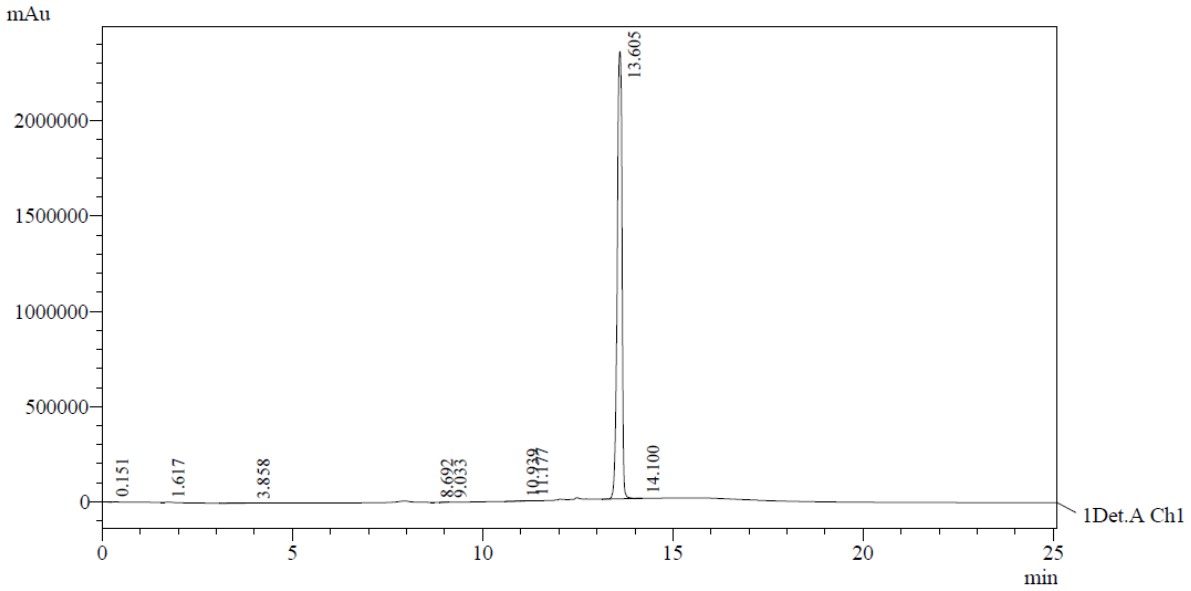
Cromatograma do composto **3d**



RMN ^{1}H do composto **3e** em DMSO-d_6

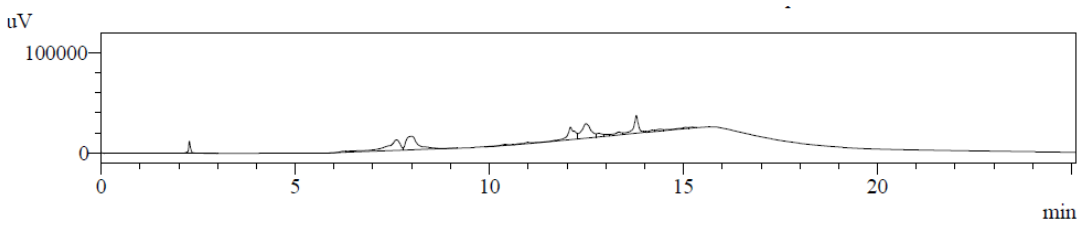


RMN ^{13}C do composto **3e** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



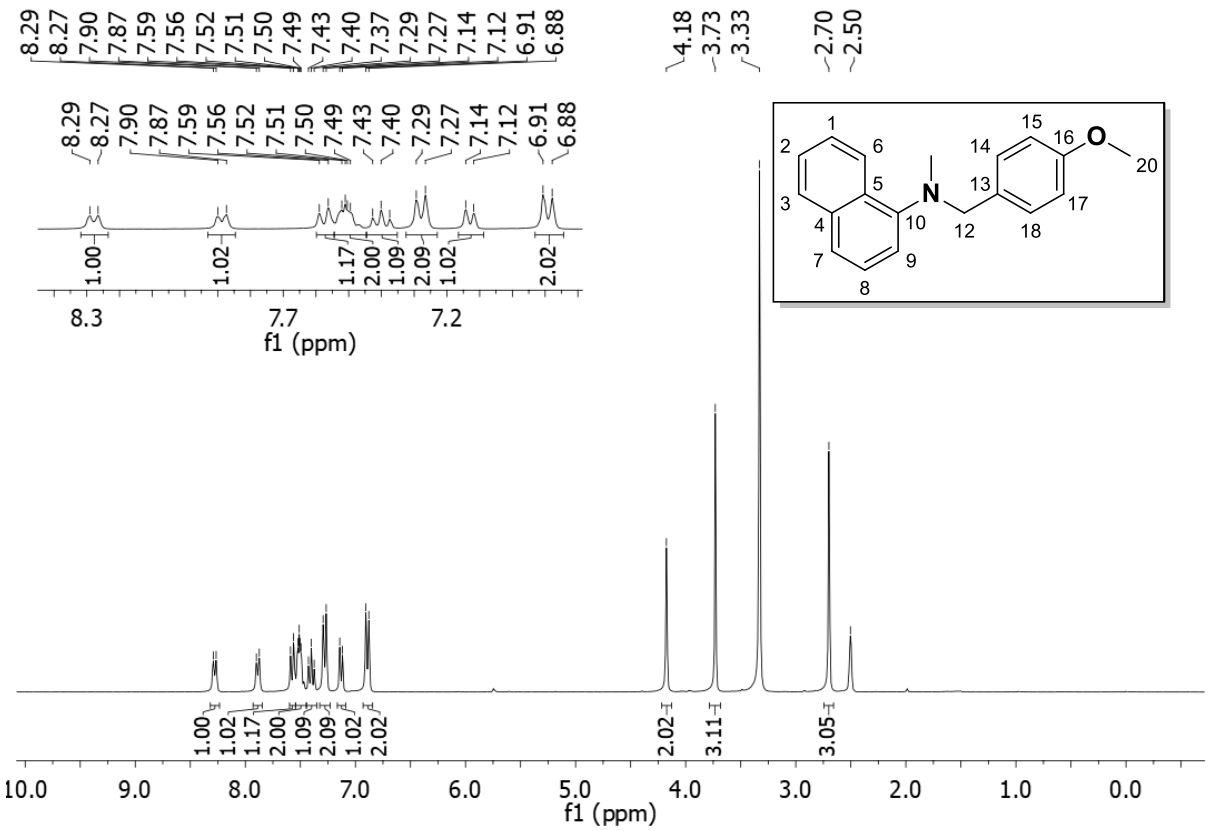
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

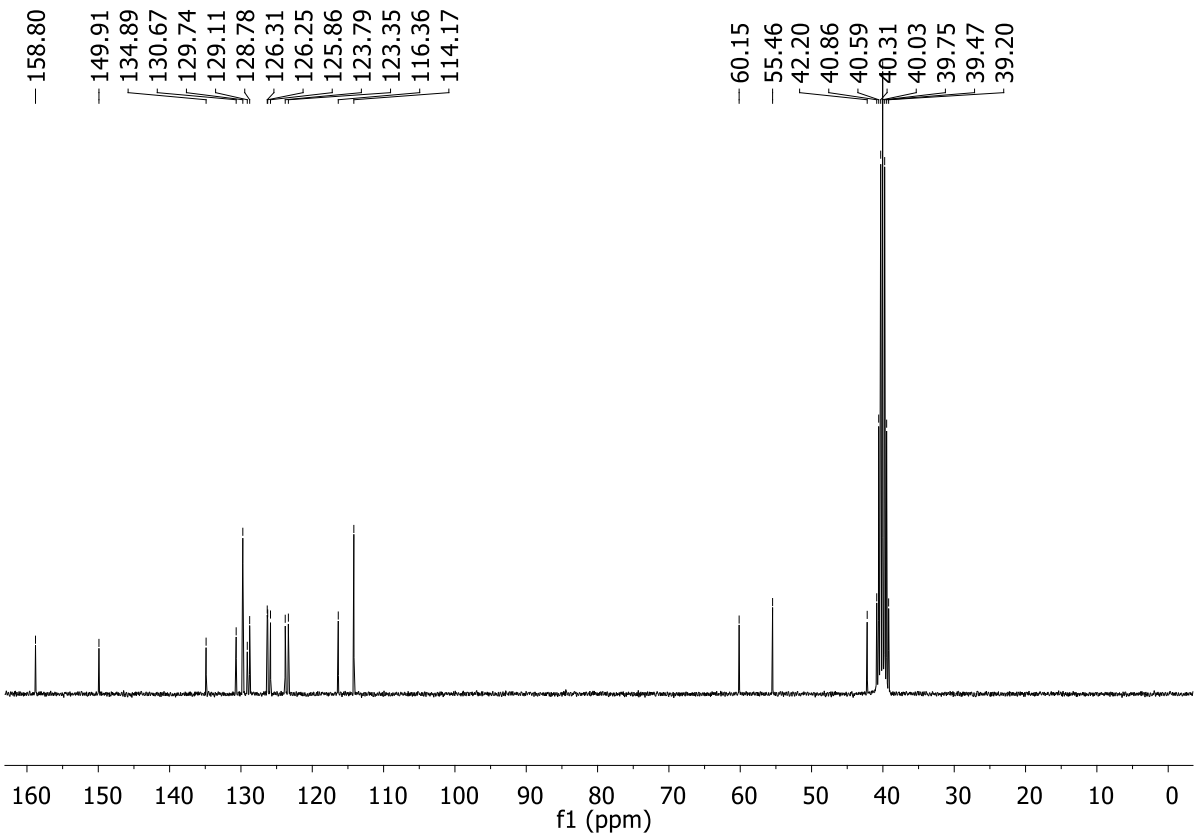
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	0.151	1824	0.000	0.009	0.009
2	1.617	961	9.848	0.005	0.005
3	3.858	1494	4.527	0.007	0.007
4	8.692	28	9.715	0.000	0.000
5	9.033	628	2.653	0.003	0.003
6	10.939	10953	9.390	0.054	0.054
7	11.177	8851	1.032	0.043	0.043
8	13.605	20433791	10.948	99.872	99.872
9	14.100	1359	2.873	0.007	0.007
Total		20459889		100.000	

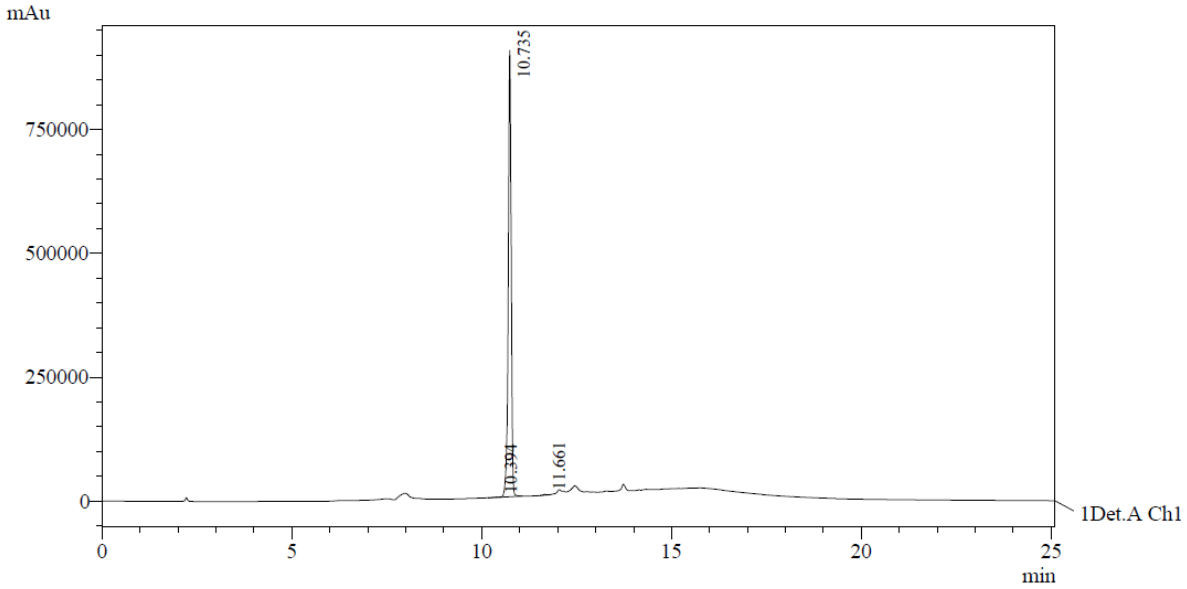
Cromatograma do composto **3e**



RMN ^{1}H do composto **4a** em DMSO-d_6

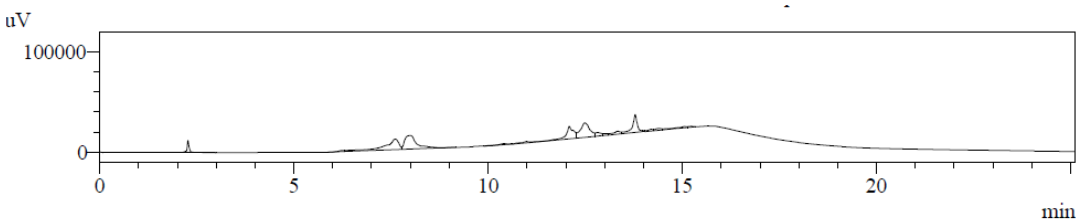


RMN ^{13}C do composto **4a** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



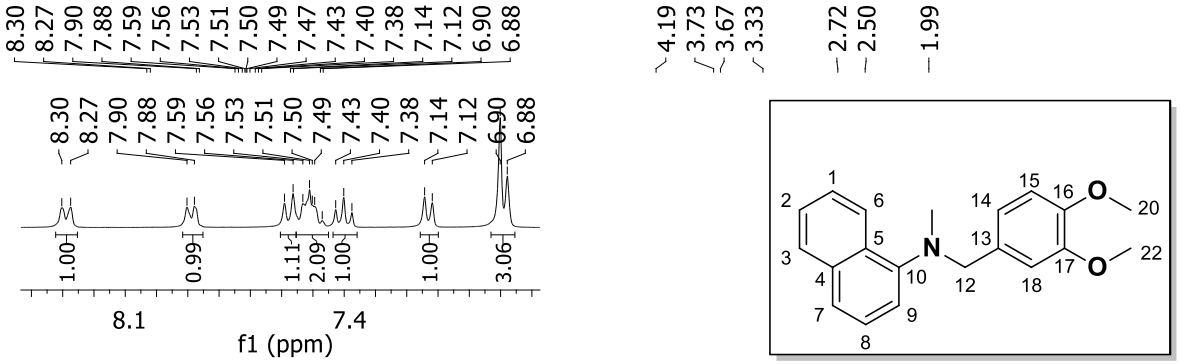
1 Det.A Ch1 / 254nm

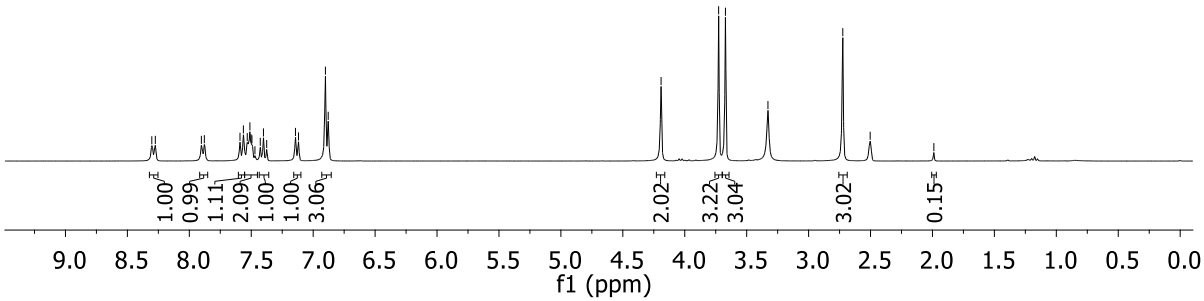
PeakTable

Detector A Ch1 254nm

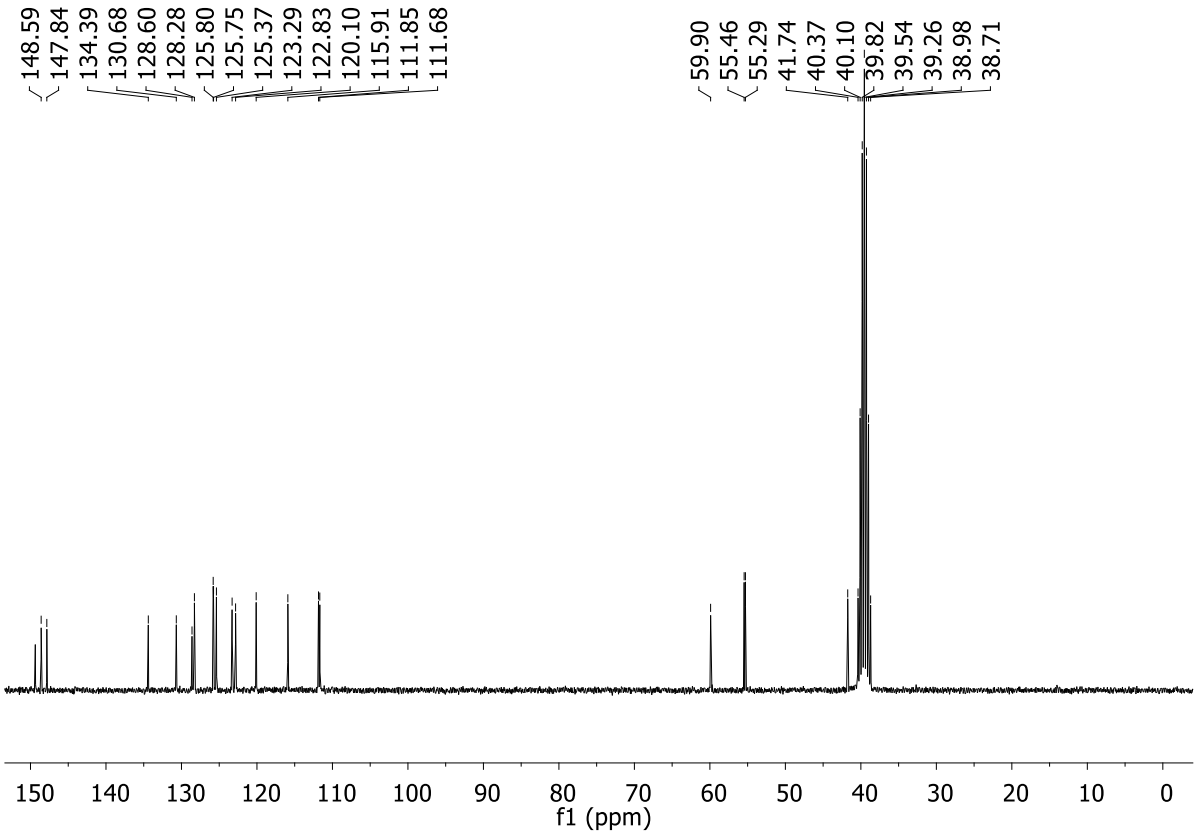
Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	10.394	6155	0.000	0.126	0.126
2	10.735	4853804	1.835	99.742	99.742
3	11.661	6406	6.296	0.132	0.132
Total		4866365		100.000	

Cromatograma do composto **4a**

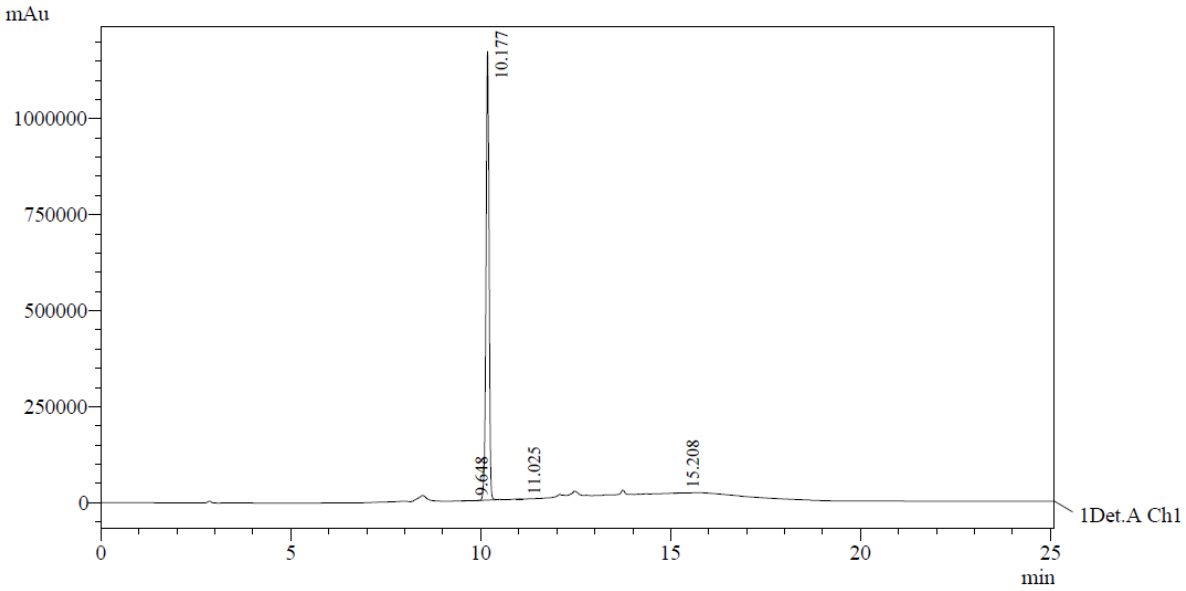




RMN ^{1}H do composto **4b** em DMSO-d_6

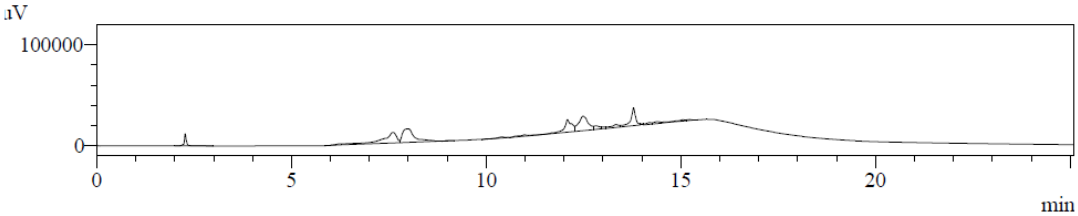


RMN ^{13}C do composto **4b** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



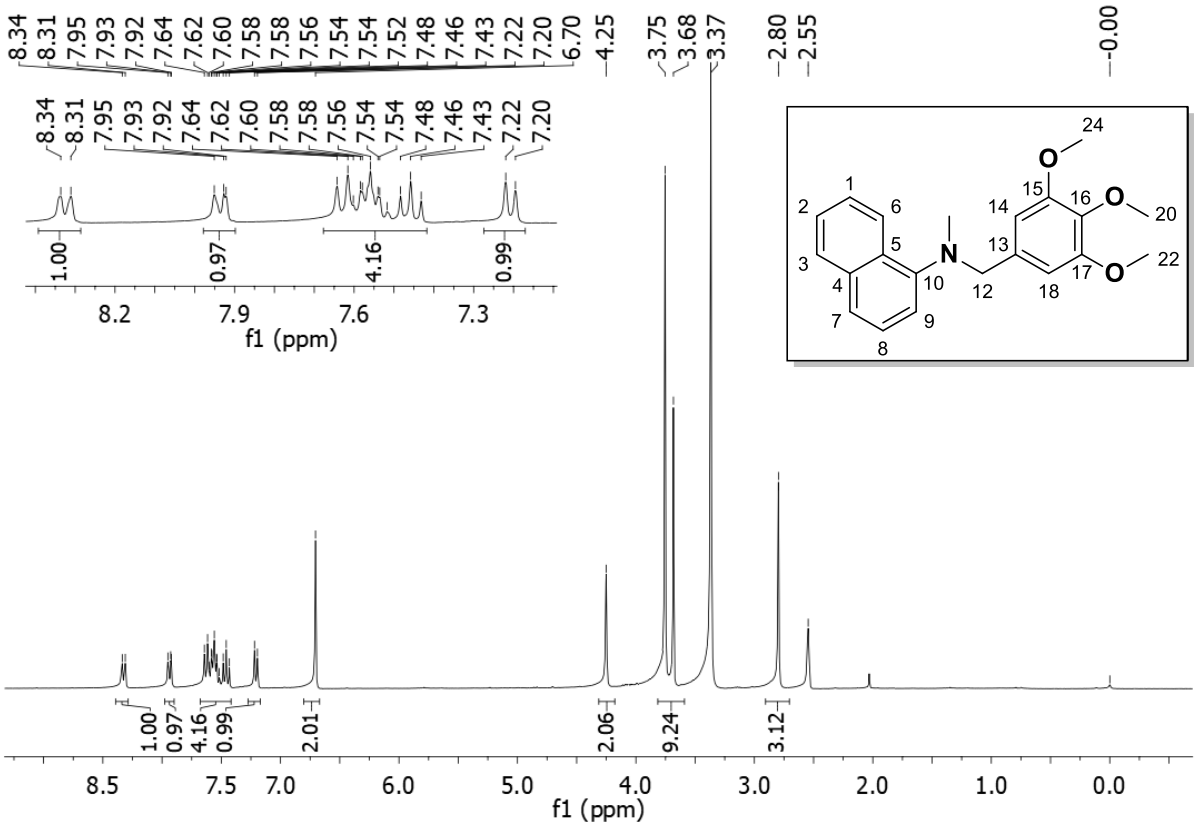
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

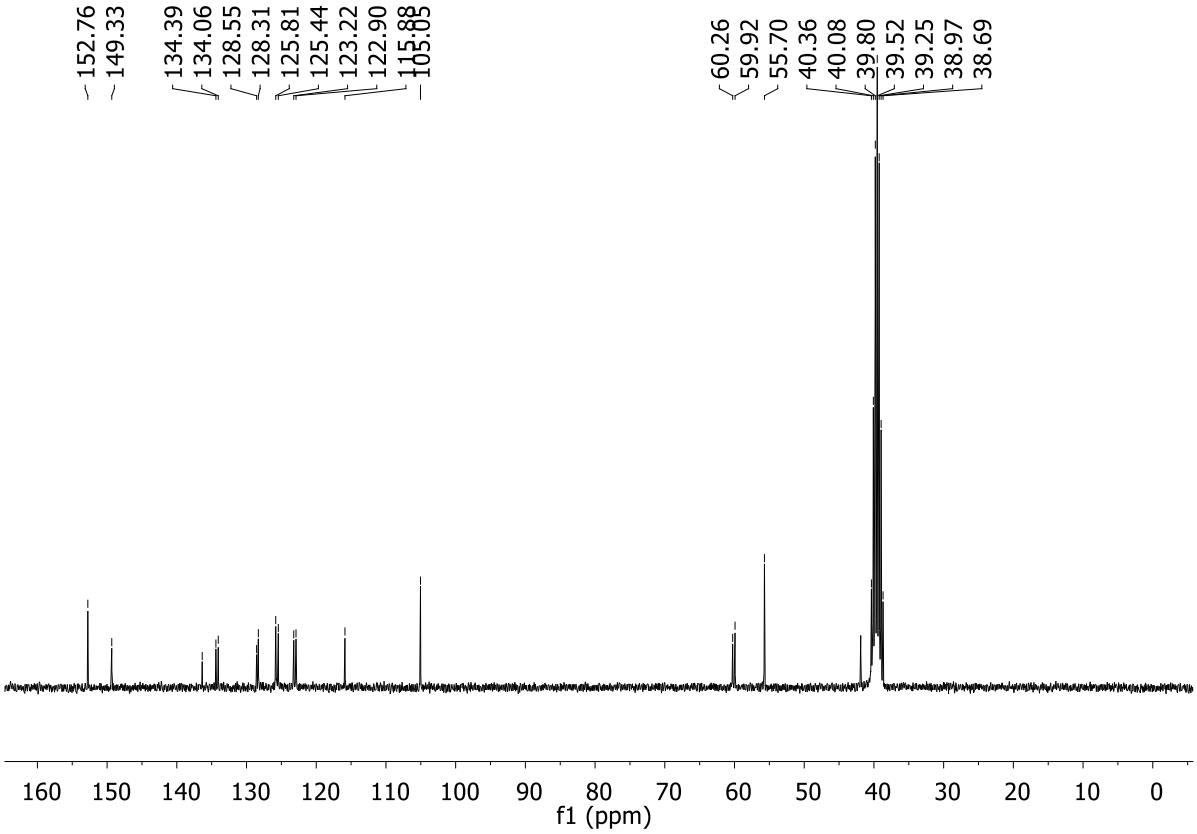
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	9.648	4388	0.000	0.067	0.067
2	10.177	6529590	3.347	99.884	99.884
3	11.025	1865	5.769	0.029	0.029
4	15.208	1359	31.224	0.021	0.021
Total		6537202		100.000	

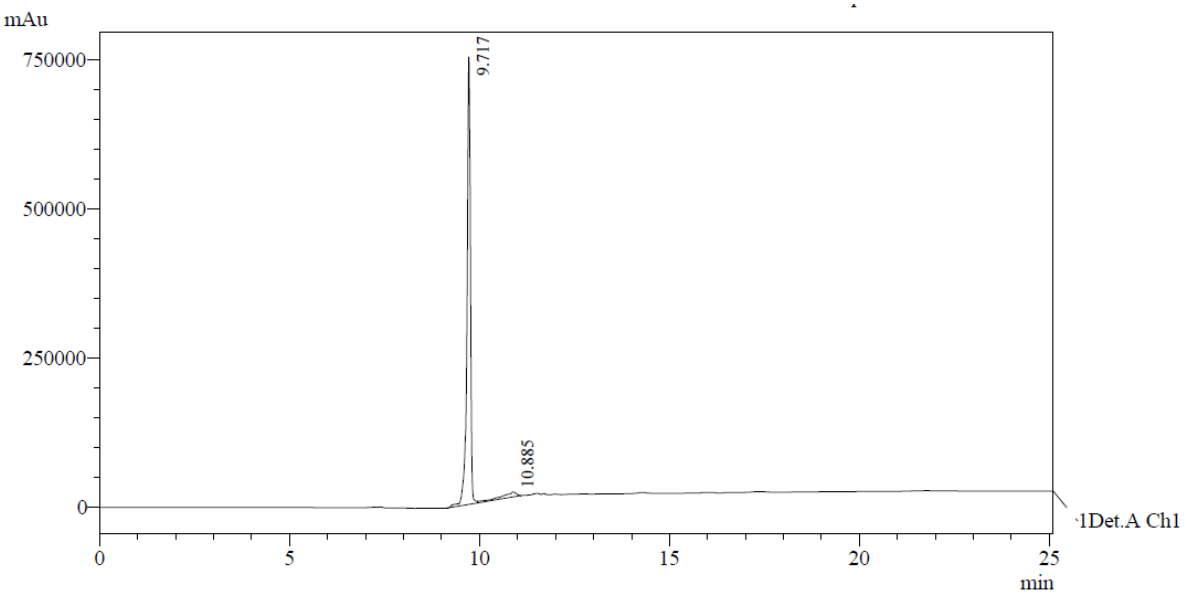
Cromatograma do composto **4b**



RMN ^{1}H do composto **4c** em DMSO-d_6

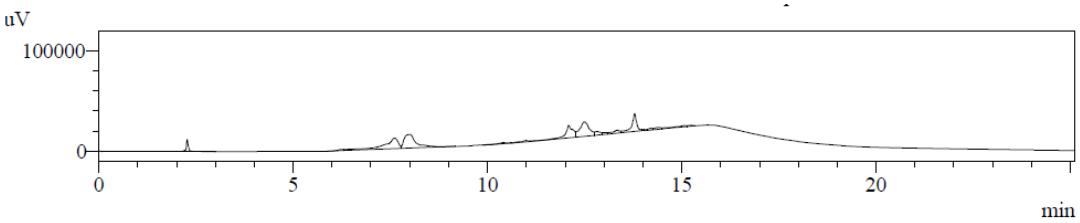


RMN ^{13}C do composto **4c** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



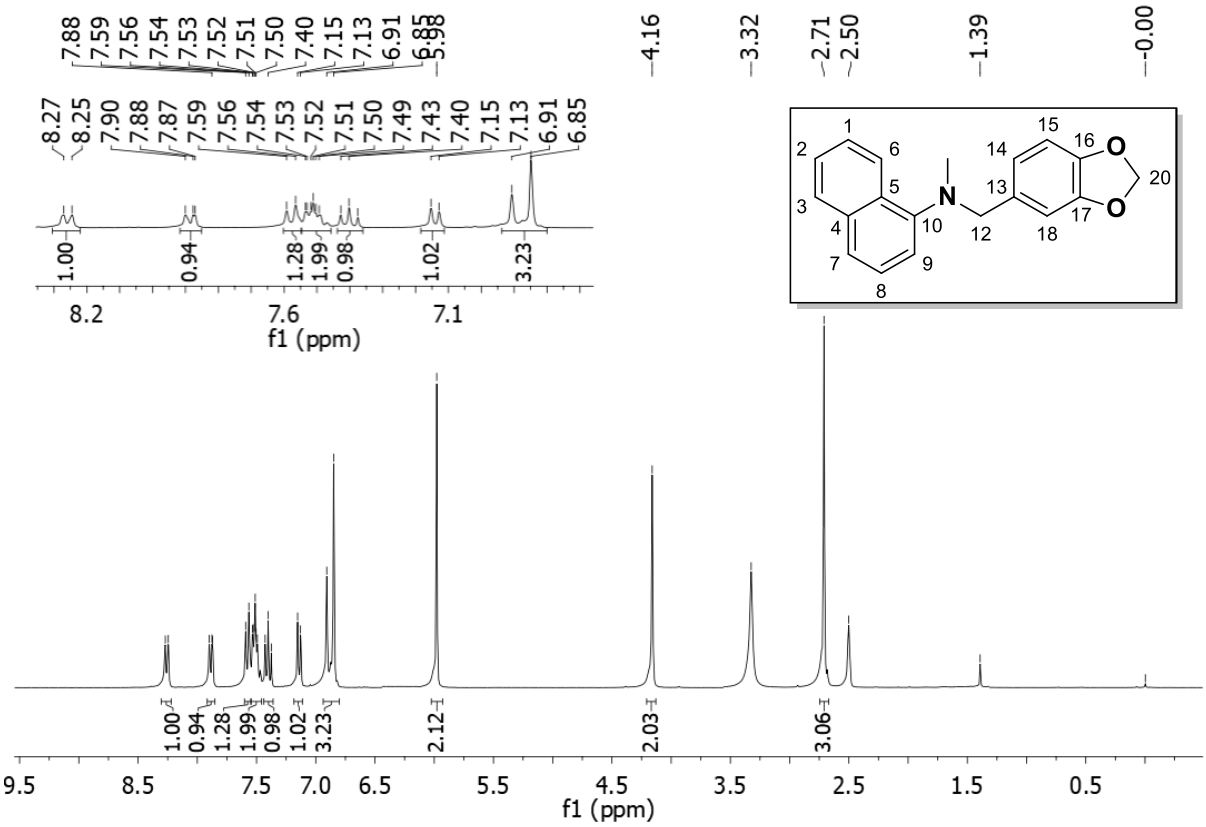
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

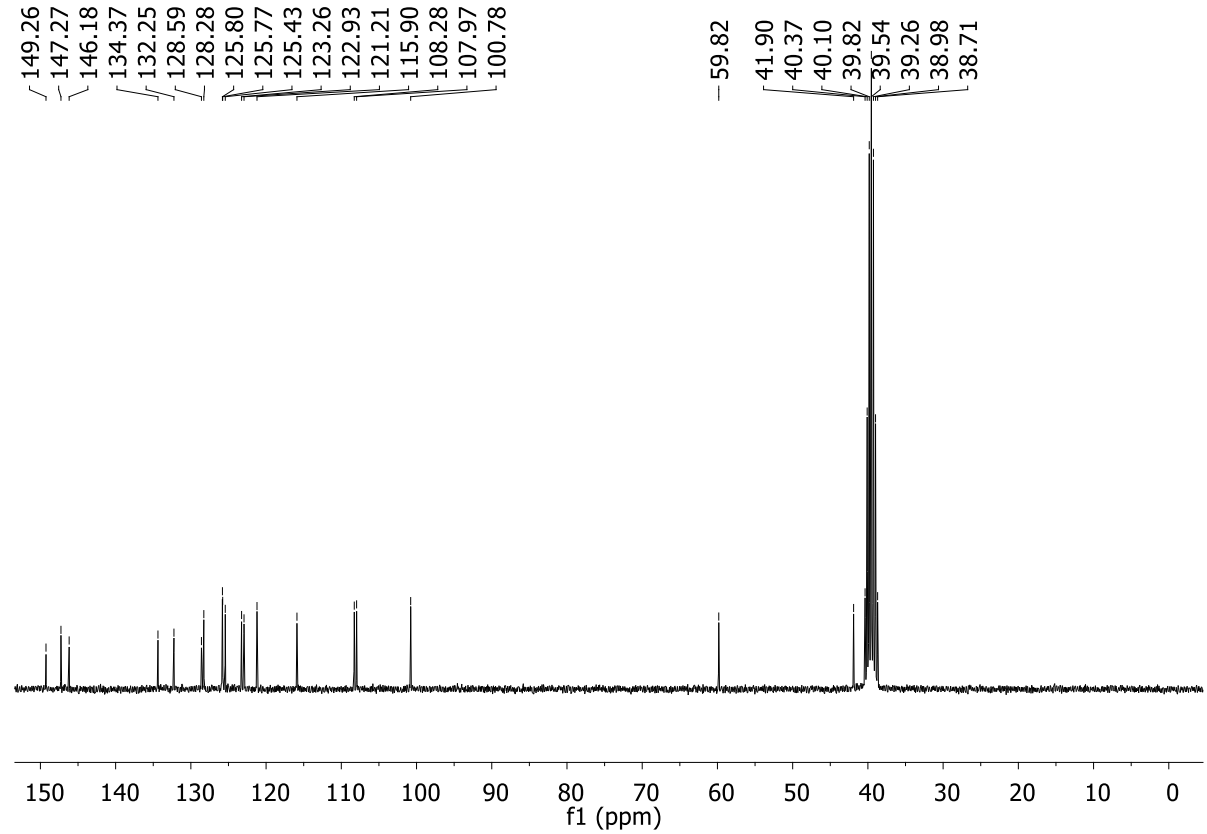
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	9.717	4706958	0.000	95.185	95.185
2	10.885	238122	2.426	4.815	4.815
Total		4945081		100.000	

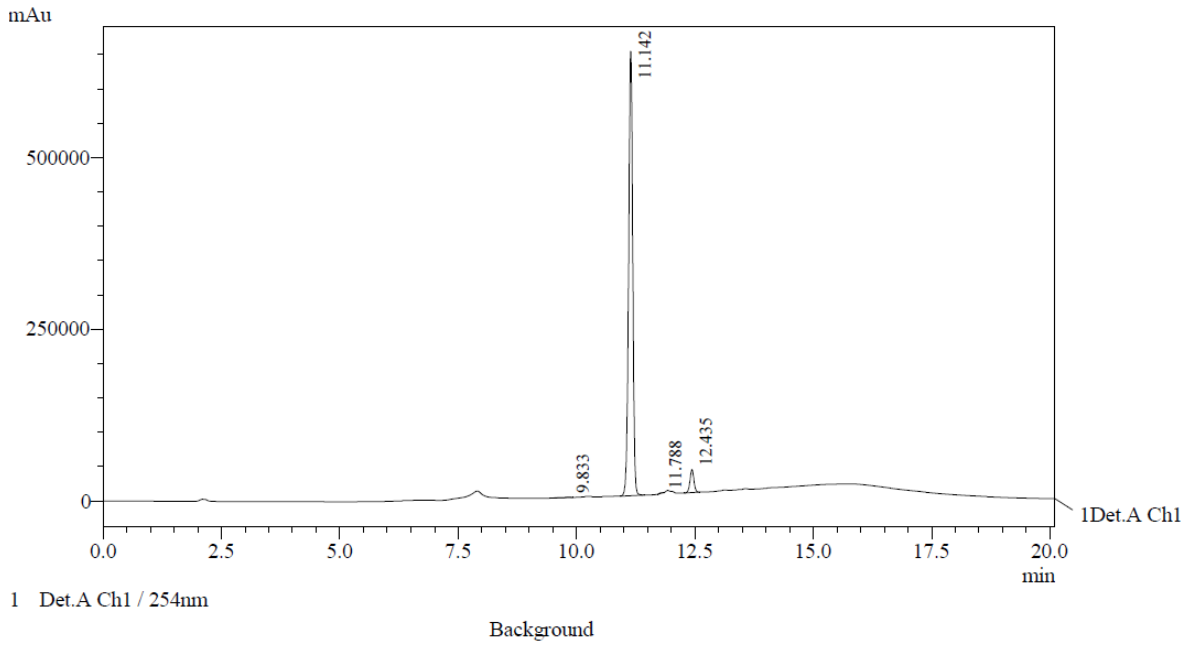
Cromatograma do composto **4c**



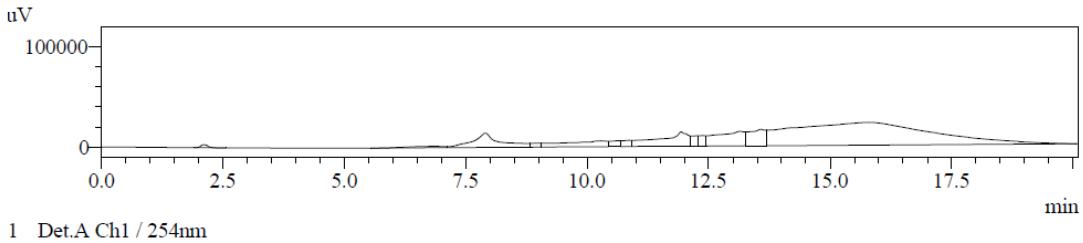
RMN ^{1}H do composto **4d** em DMSO-d_6



RMN ^{13}C do composto **4d** em DMSO-d_6



Background

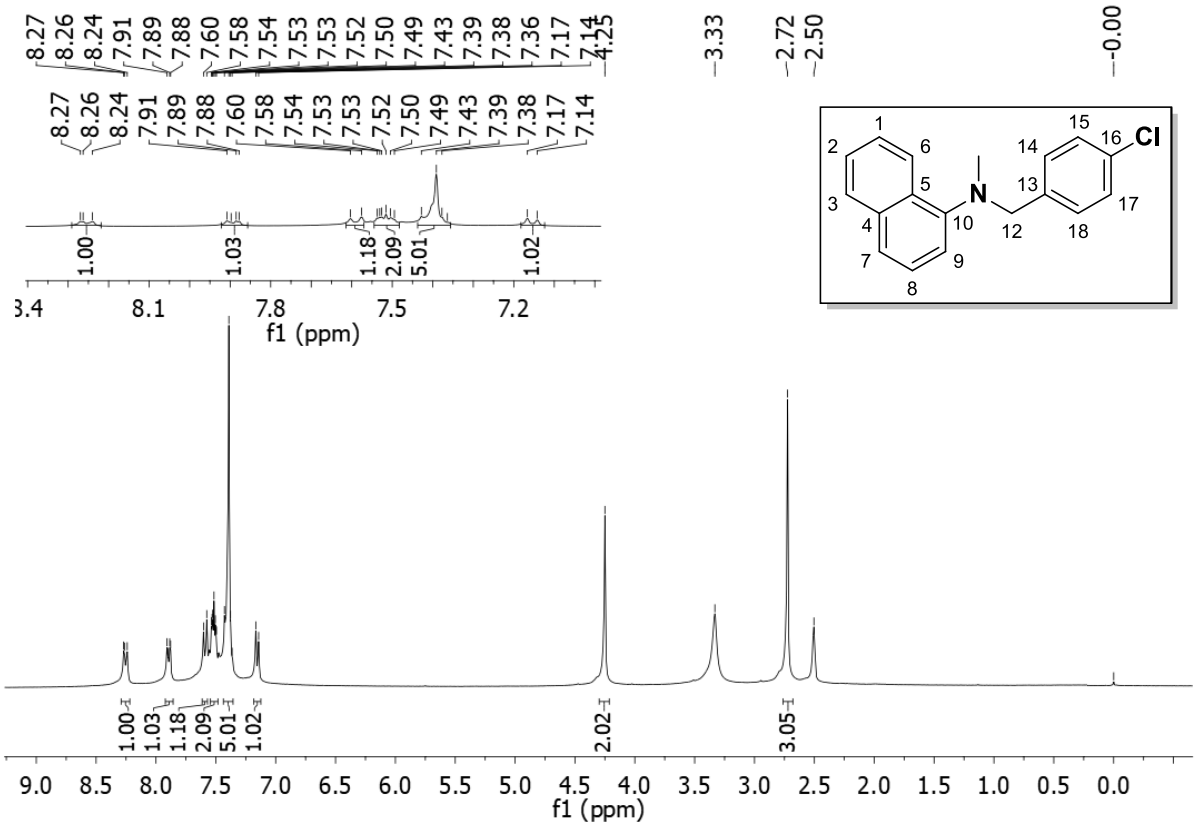


PeakTable

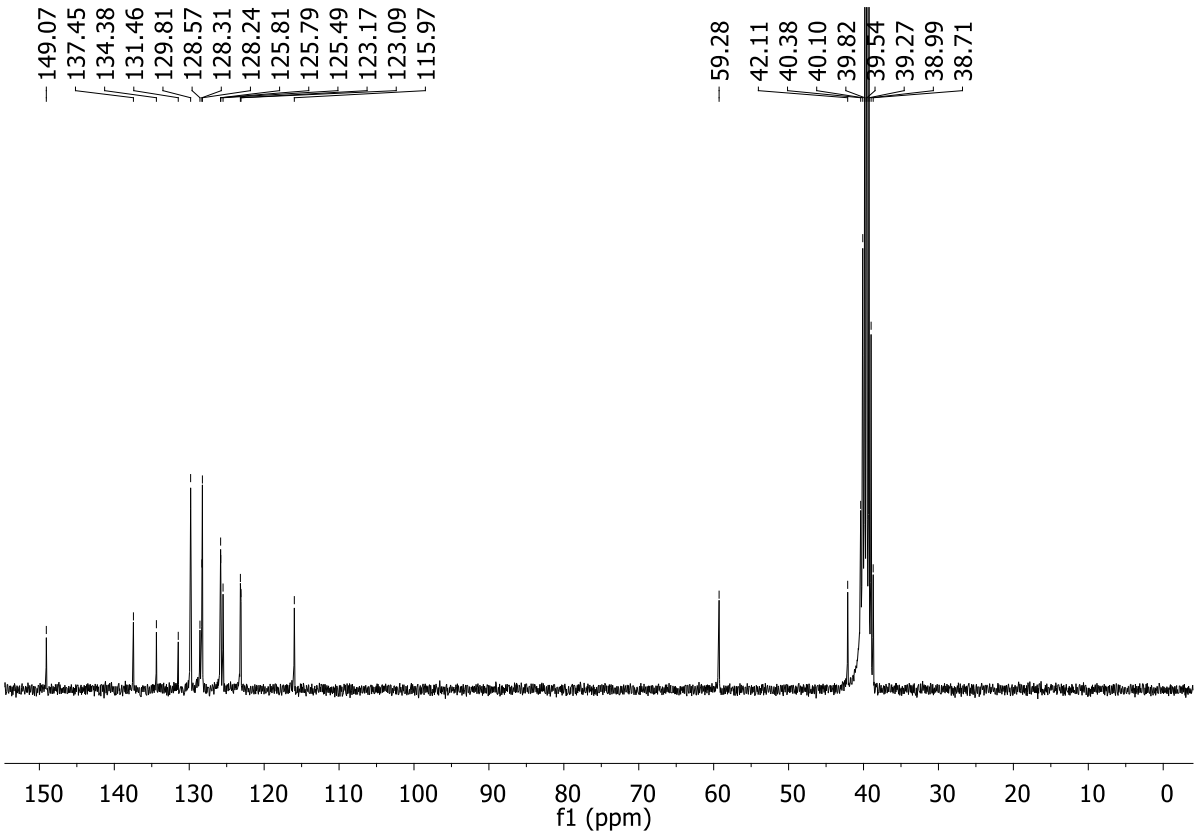
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	9.833	6549	0.000	0.162	0.162
2	11.142	3847539	7.671	94.957	94.957
3	11.788	4023	4.695	0.099	0.099
4	12.435	193754	4.752	4.782	4.782
Total		4051864		100.000	

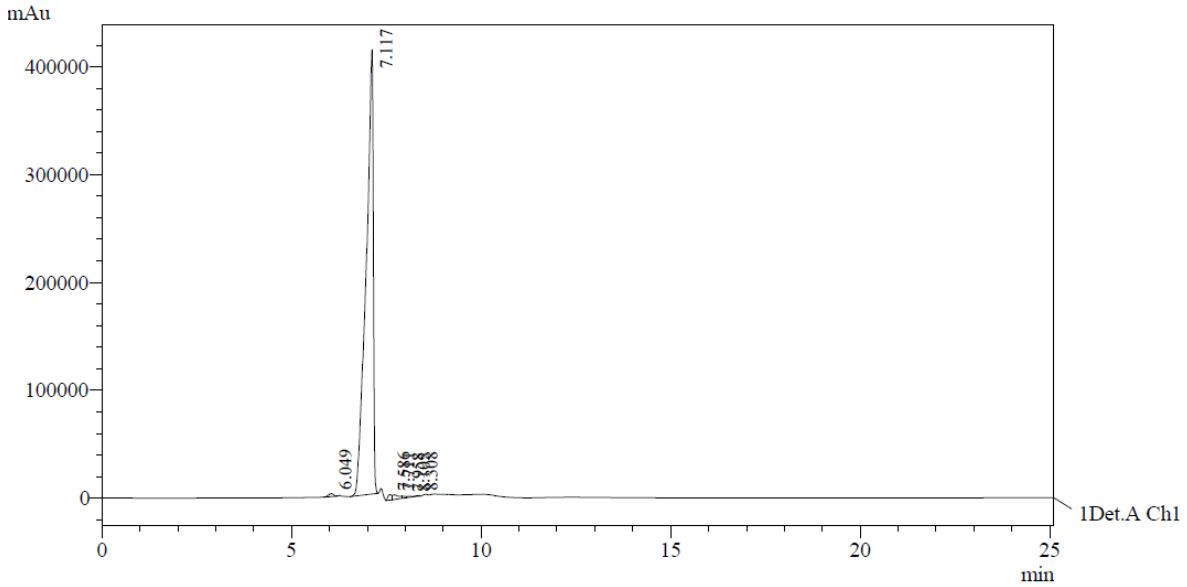
Cromatograma do composto **4d**



RMN ^{1}H do composto **4e** em DMSO-d_6

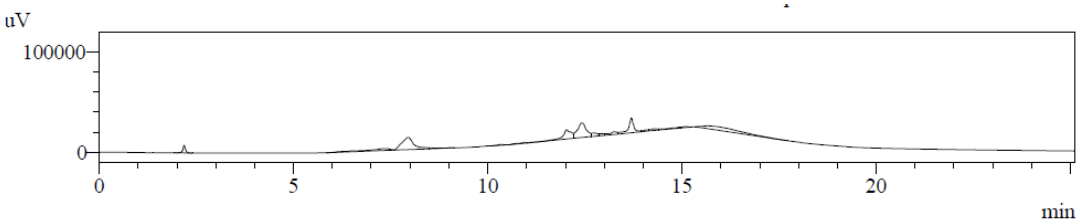


RMN ^{13}C do composto **4e** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



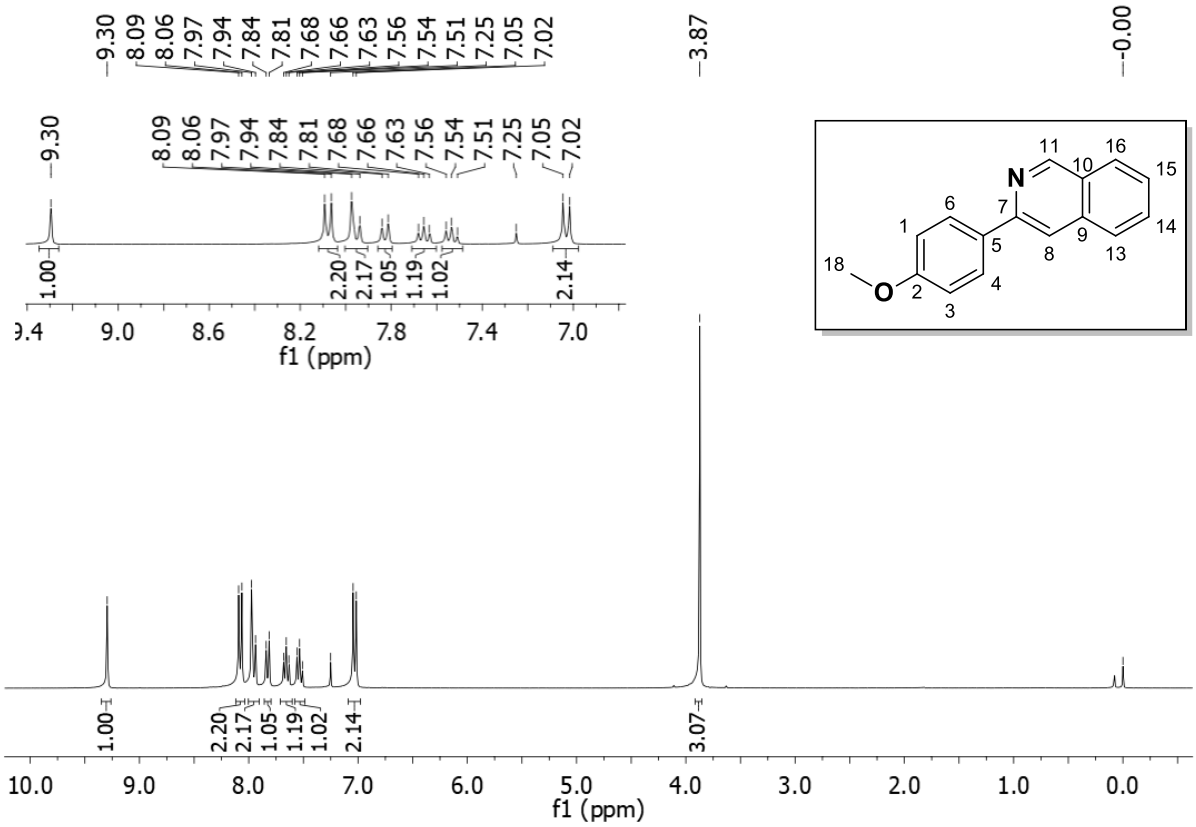
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

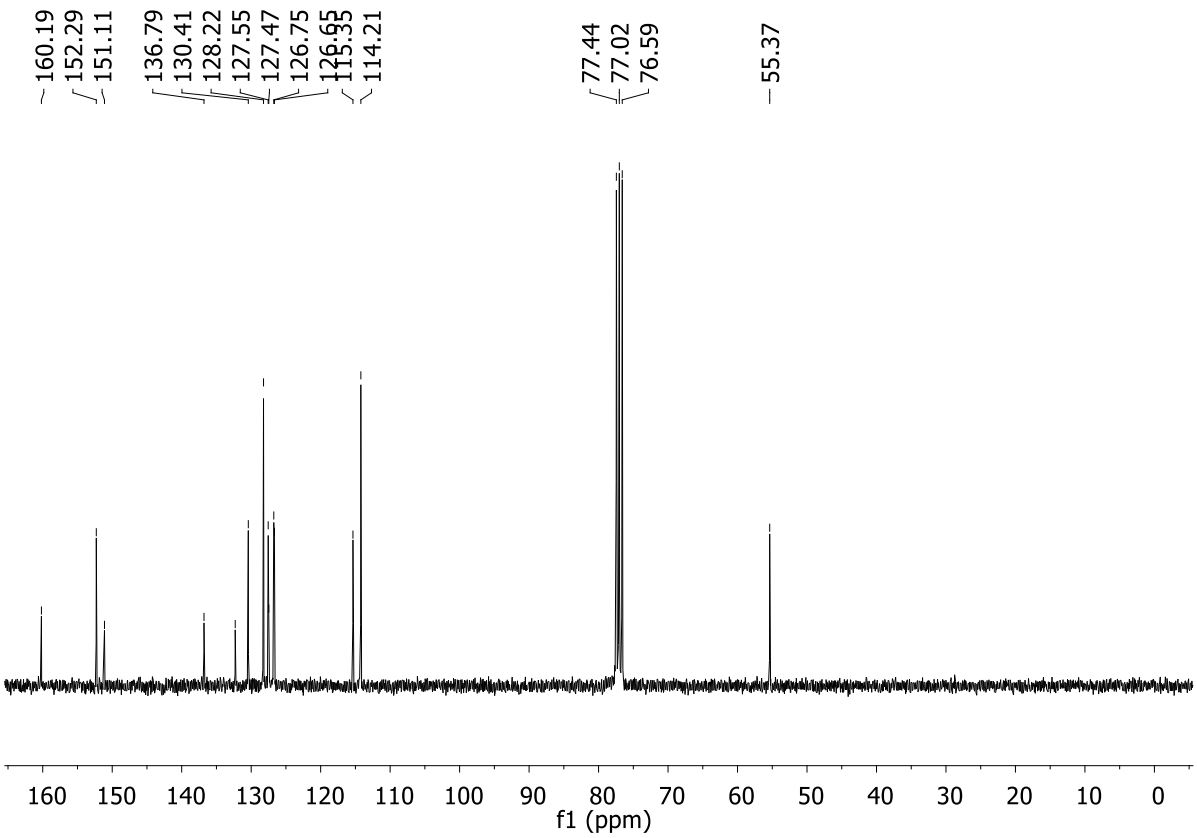
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	6.049	25041	0.000	0.454	0.454
2	7.117	5381760	3.598	97.589	97.589
3	7.586	35560	1.322	0.645	0.645
4	7.711	45925	0.206	0.833	0.833
5	7.958	11976	0.000	0.217	0.217
6	8.105	9000	0.000	0.163	0.163
7	8.308	5465	0.000	0.099	0.099
Total		5514727		100.000	

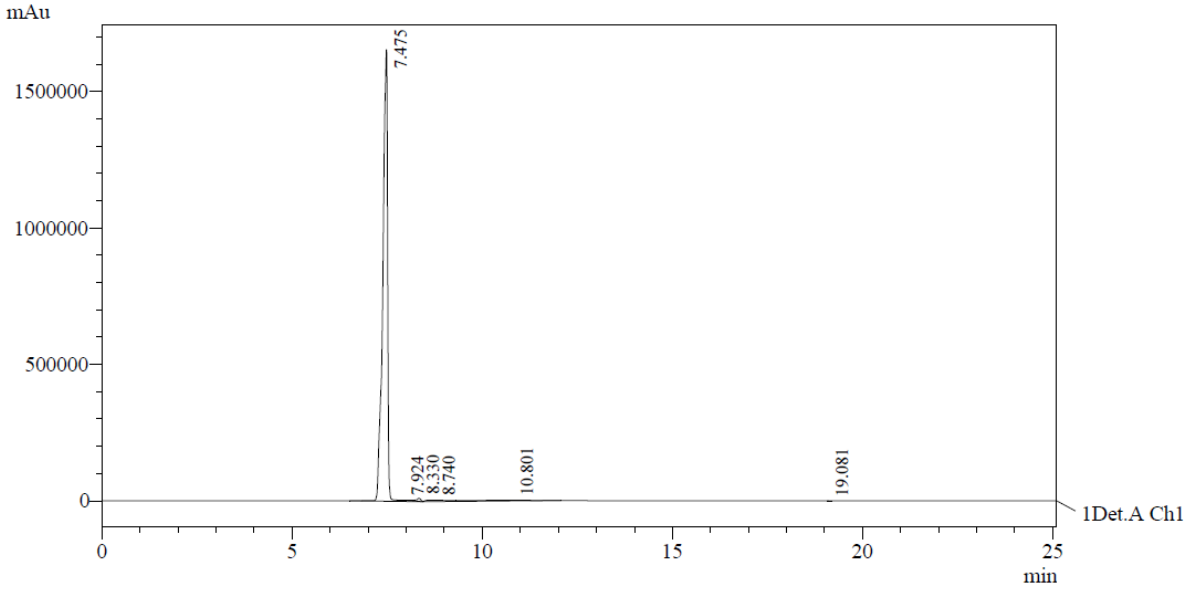
Cromatograma do composto **4e**



RMN ^{1}H do composto **6a** em $CDCl_3$

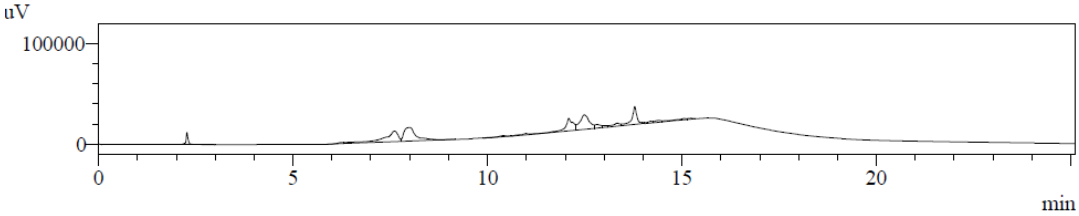


RMN ^{13}C do composto **6a** em $CDCl_3$



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



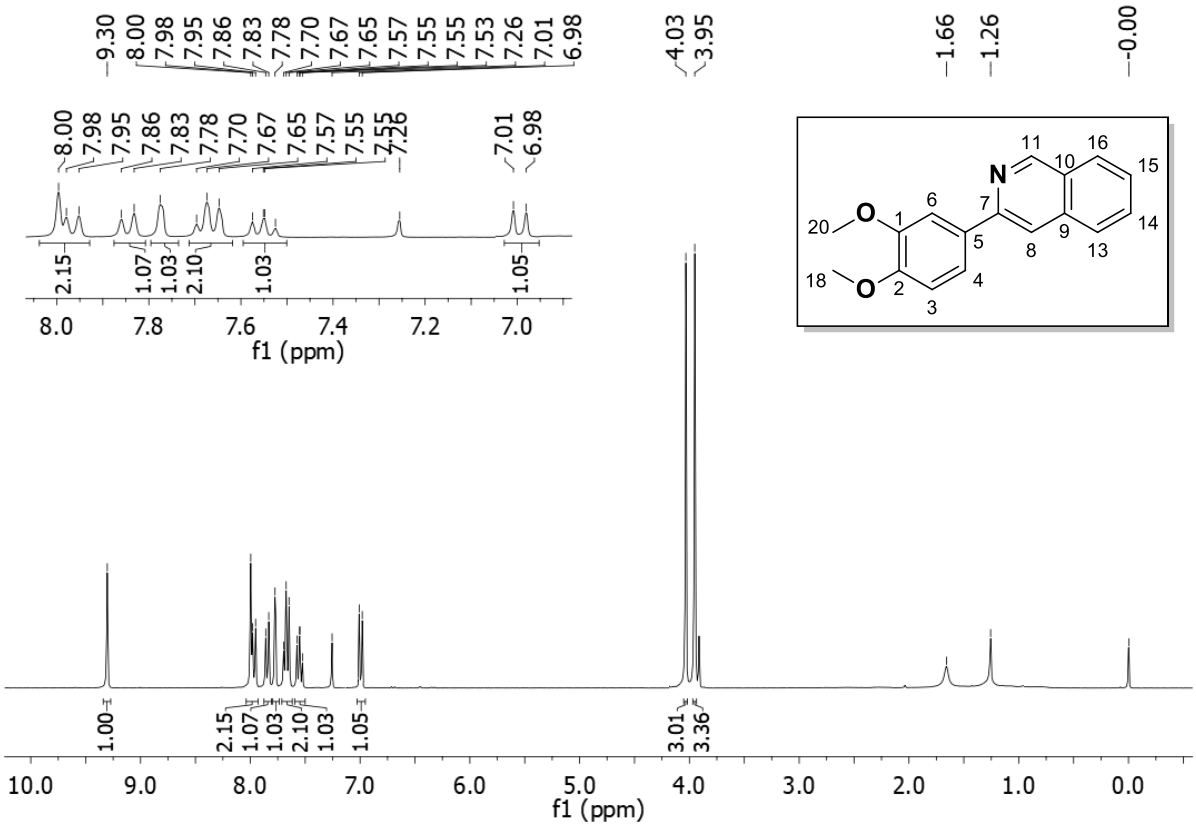
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

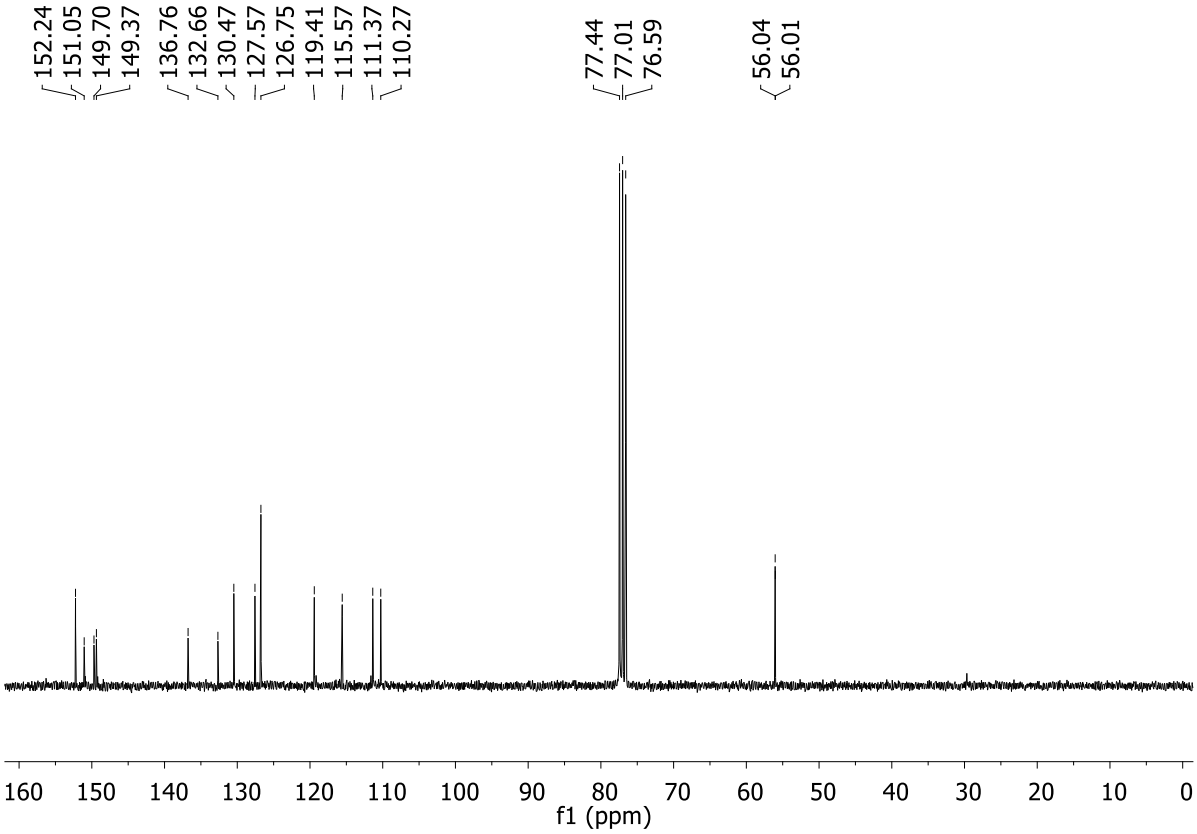
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	7.475	14532547	0.000	95.655	95.655
2	7.924	2742	0.000	0.018	0.018
3	8.330	99127	0.000	0.652	0.652
4	8.740	196255	0.314	1.292	1.292
5	10.801	360180	0.291	2.371	2.371
6	19.081	1884	1.402	0.012	0.012
Total		15192735		100.000	

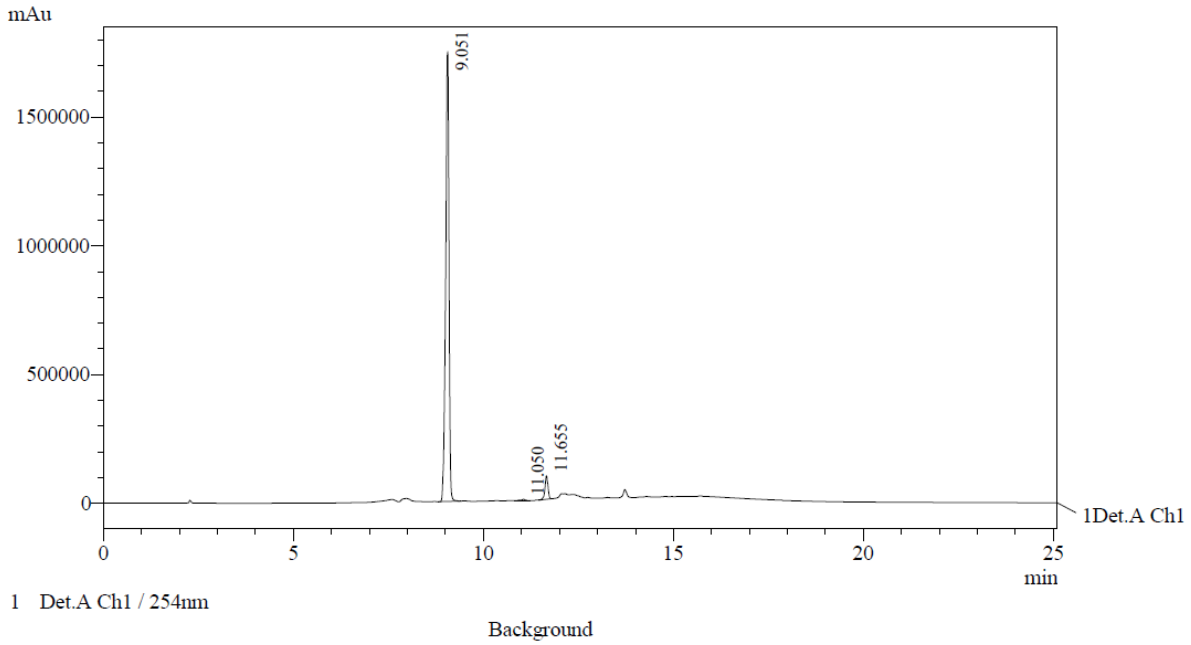
Cromatograma do composto **6a**

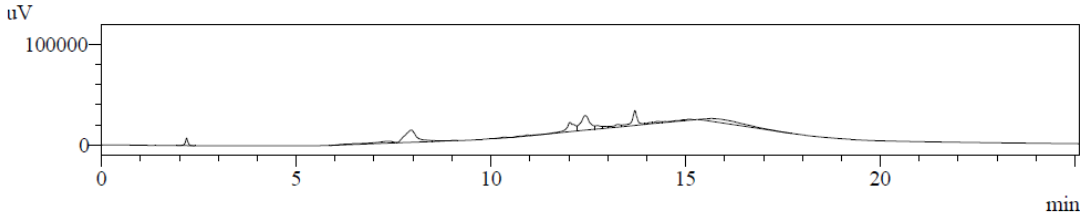


RMN ^{1}H do composto **6b** em $CDCl_3$



RMN ^{13}C do composto **6b** em $CDCl_3$





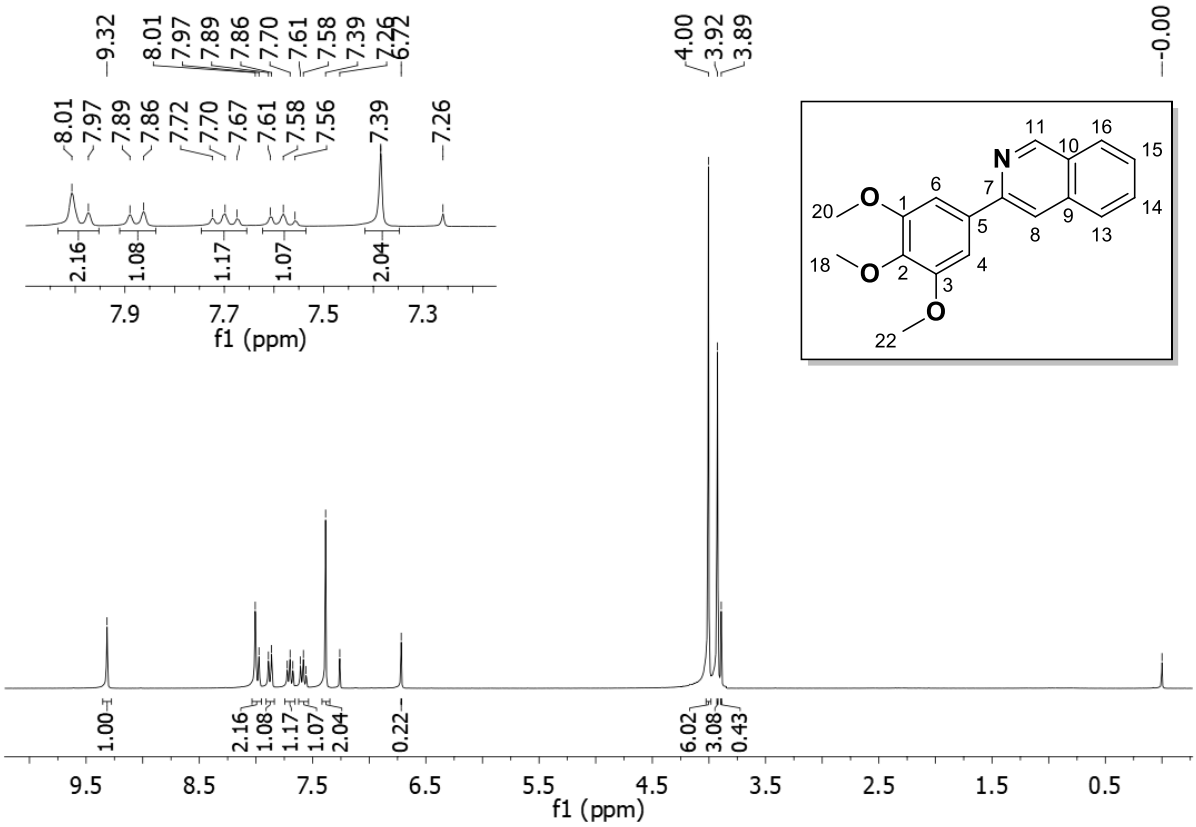
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

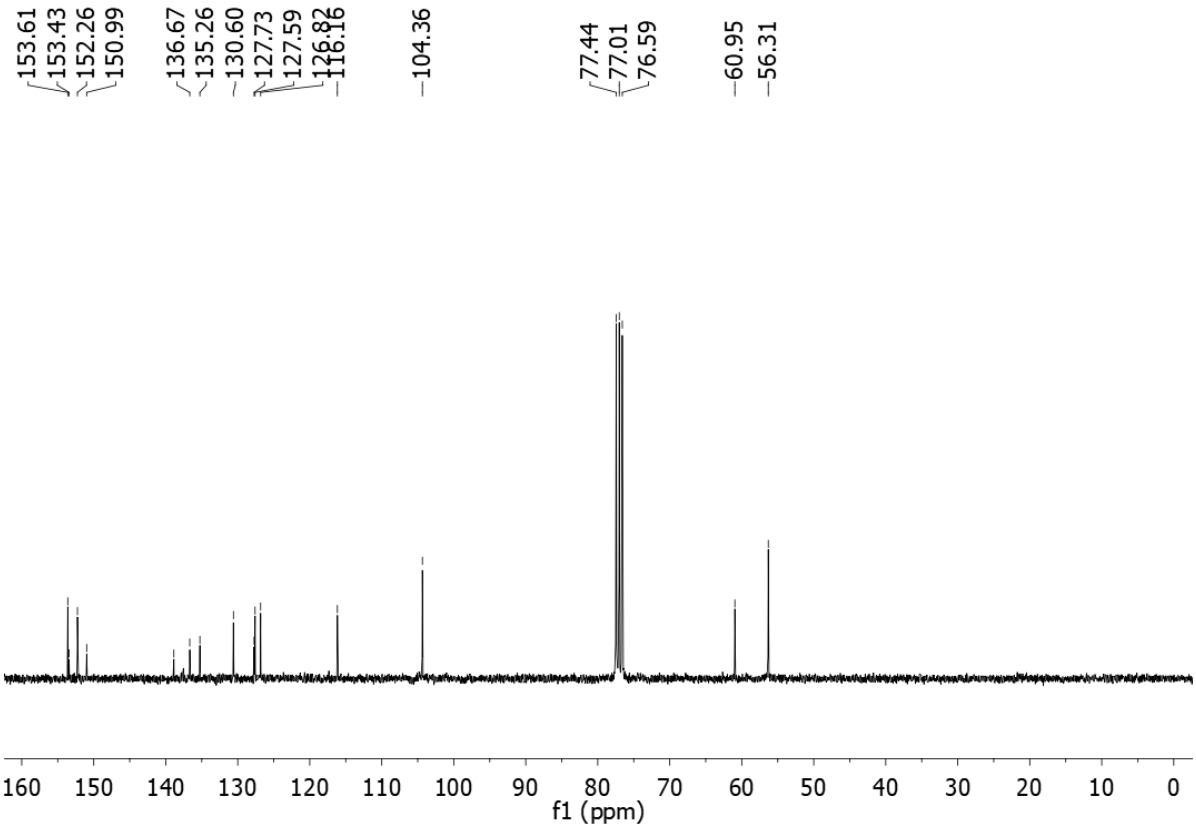
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	9.051	10509623	0.000	95.207	95.207
2	11.050	28332	11.918	0.257	0.257
3	11.655	500803	3.813	4.537	4.537
Total		11038759		100.000	

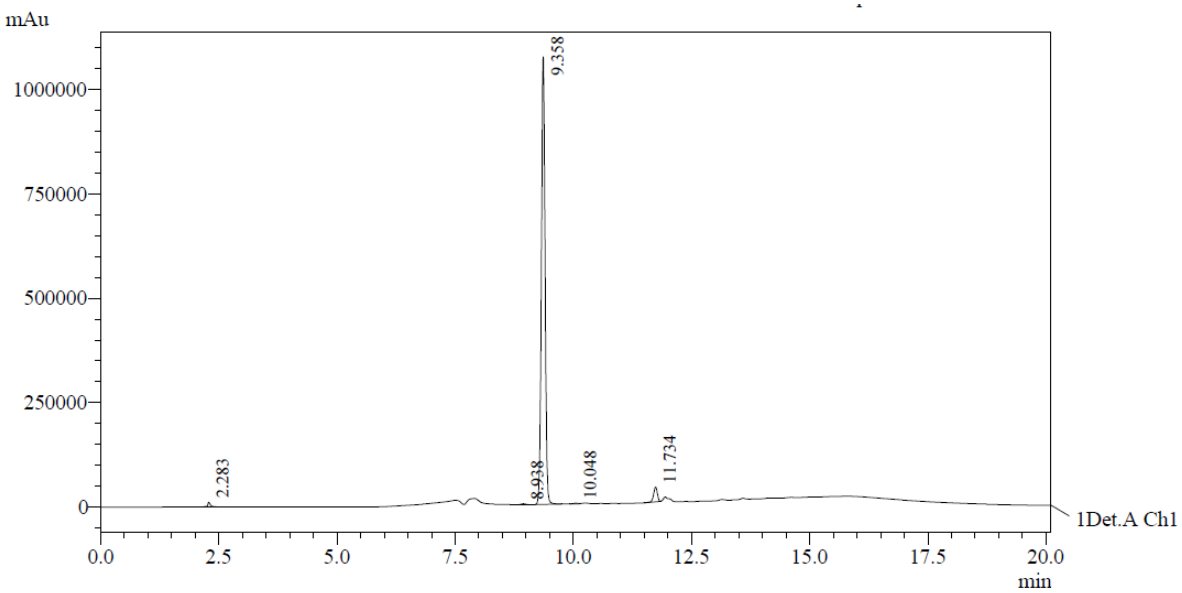
Cromatograma do composto **6b**



RMN ^{1}H do composto **6c** em $CDCl_3$

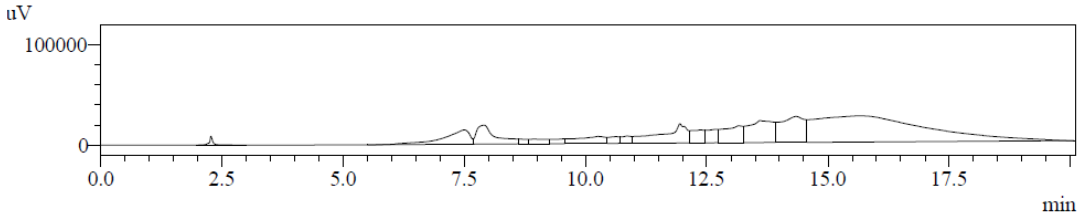


RMN ^{13}C do composto **6c** em $CDCl_3$



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



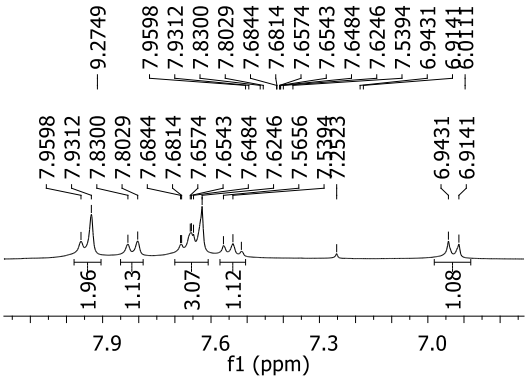
1 Det.A Ch1 / 254nm

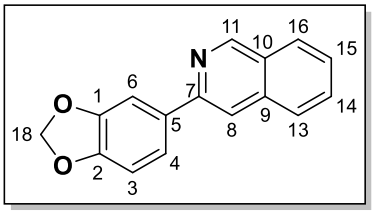
PeakTable

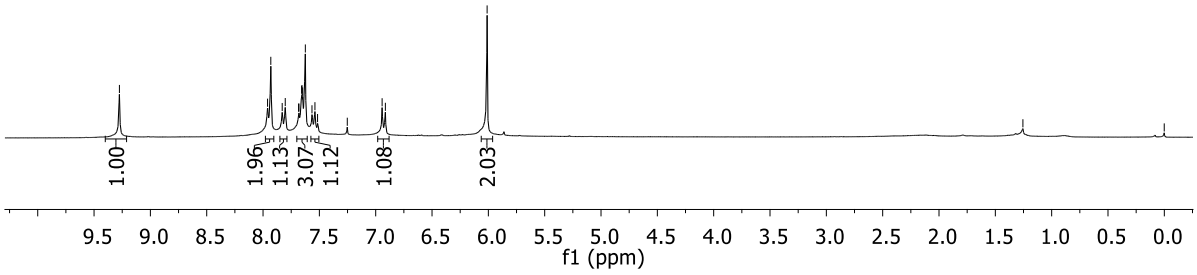
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	2.283	59382	0.000	0.988	0.988
2	8.938	13792	42.746	0.229	0.229
3	9.358	5737134	2.400	95.426	95.426
4	10.048	6698	4.348	0.111	0.111
5	11.734	195107	10.490	3.245	3.245
Total		6012113		100.000	

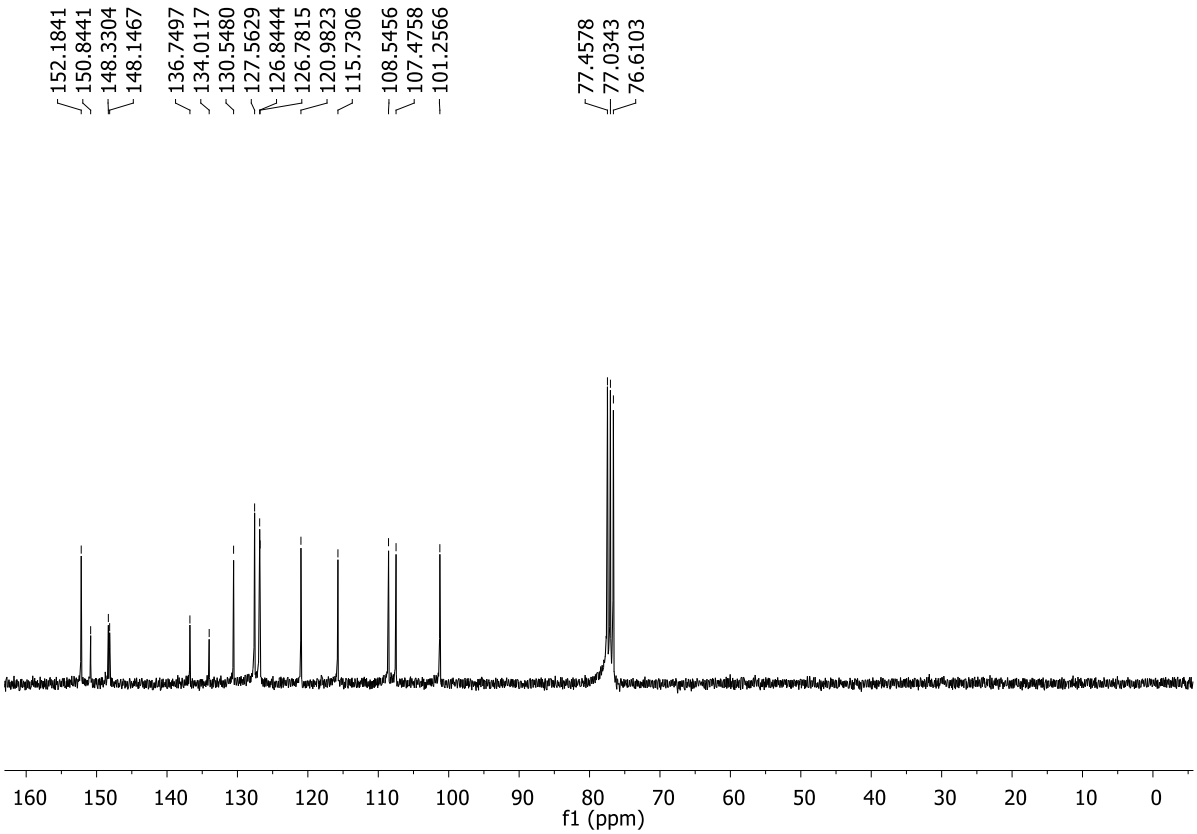
Cromatograma do composto **6c**



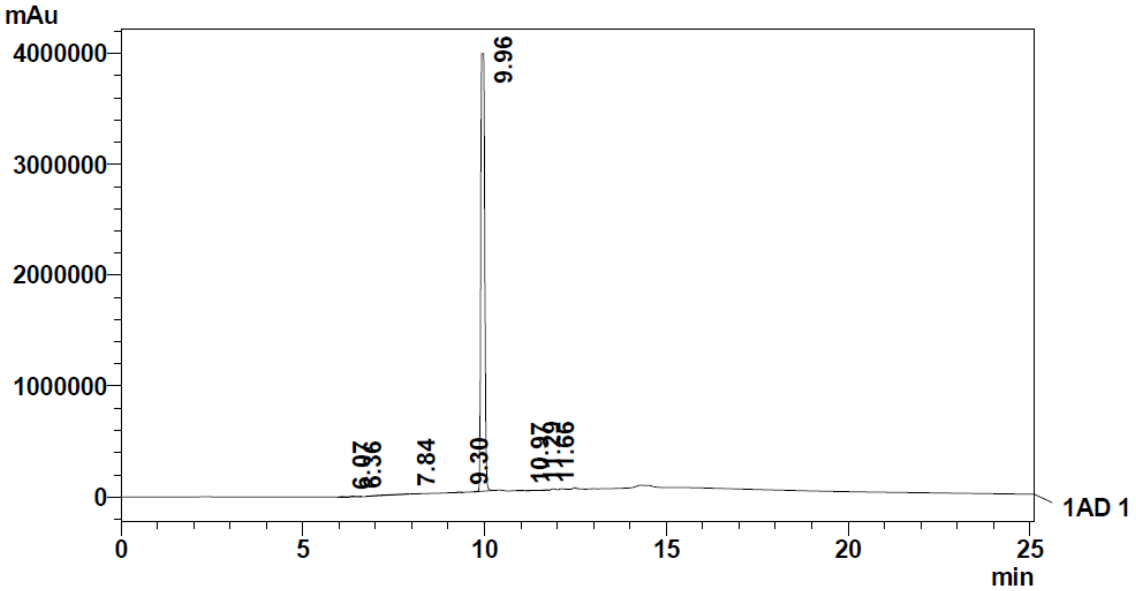




RMN ^{1}H do composto **6d** em $CDCl_3$



RMN ^{13}C do composto **6d** em $CDCl_3$



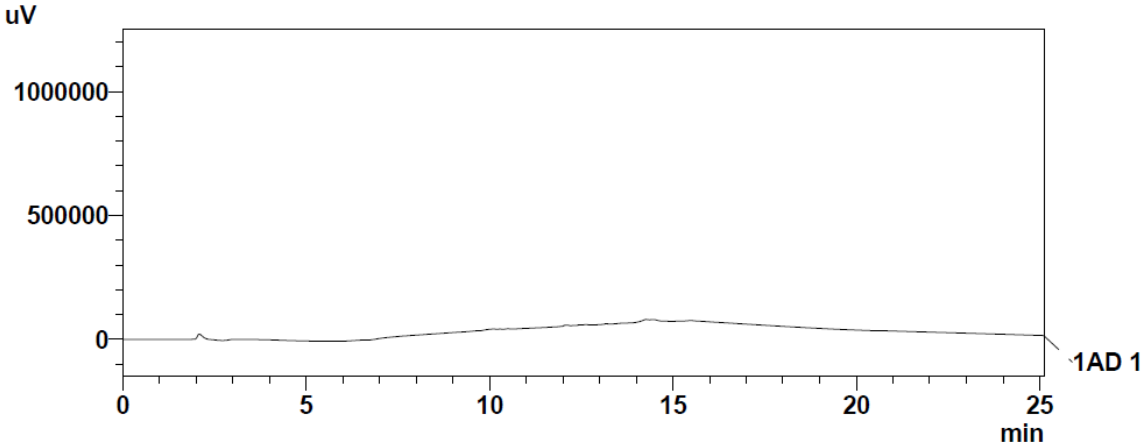
1 AD 1 / 254nm

PeakTable

Ch1

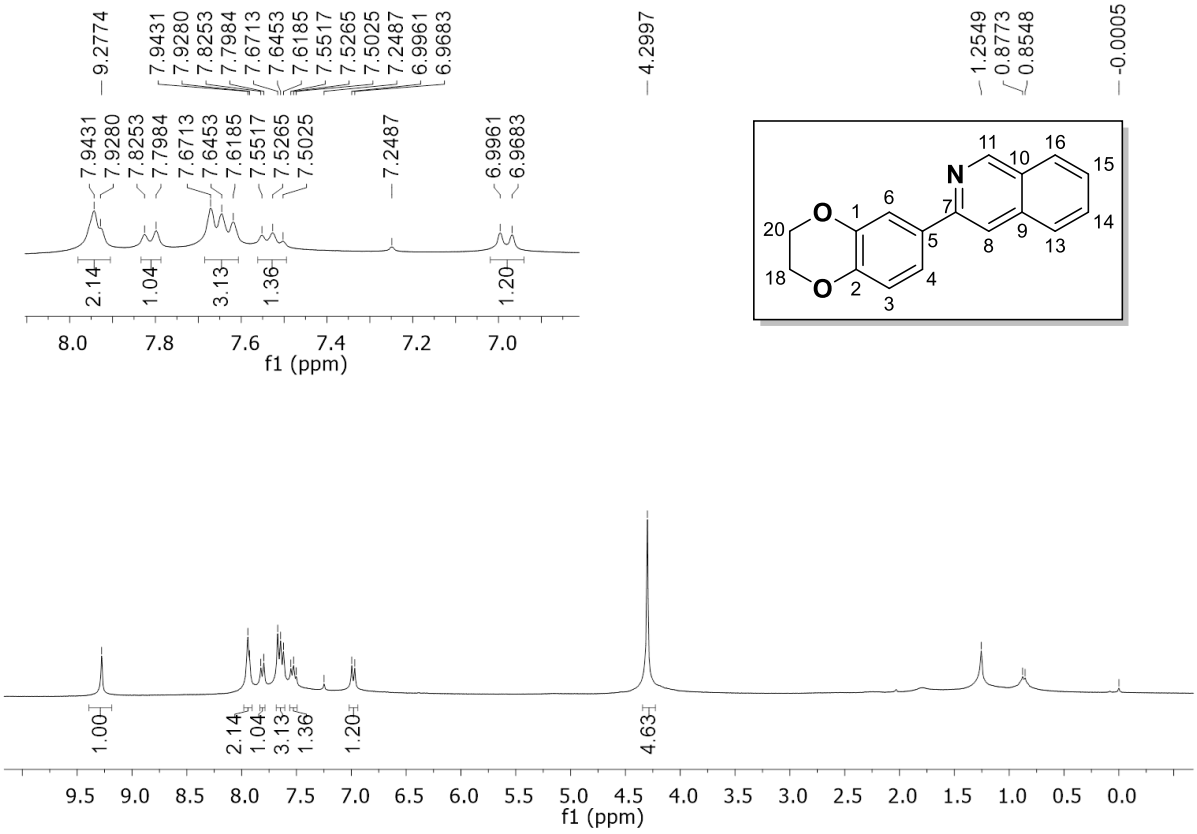
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Heig	Tailing Facto	Area %	Conc. %
1	6.067	27009	4181	0.091	1.835	0.092	0.092
2	6.358	46061	7063	0.078	2.066	0.157	0.157
3	7.843	181278	1834	0.066	0.522	0.616	0.616
4	9.300	20864	2823	0.113	0.909	0.071	0.071
5	9.963	29124193	3947687	0.115	0.933	98.960	98.960
6	10.965	1738	287	0.099	1.174	0.006	0.006
7	11.290	16325	2338	0.111	0.991	0.055	0.055
8	11.663	12773	1811	0.114	1.143	0.043	0.043
Total		29430240	3968025			100.000	

BRANCO

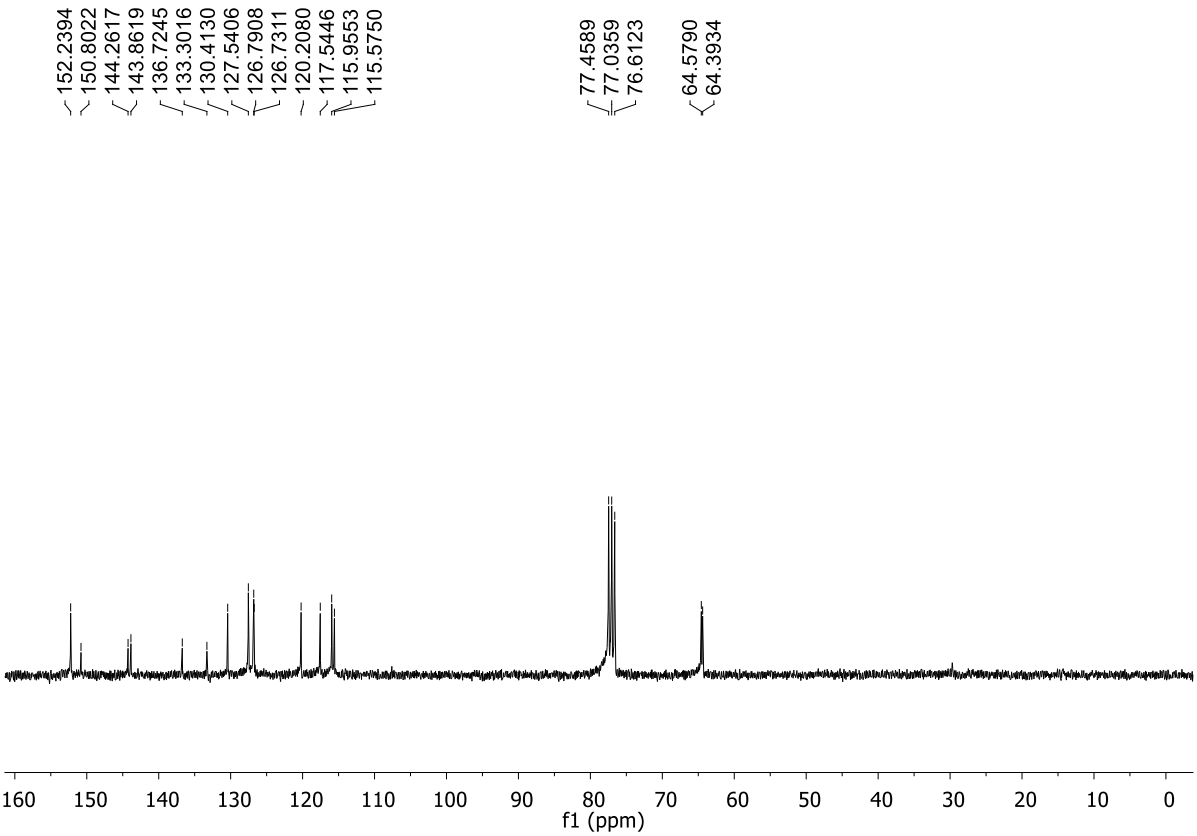


1 AD 1 / 254nm

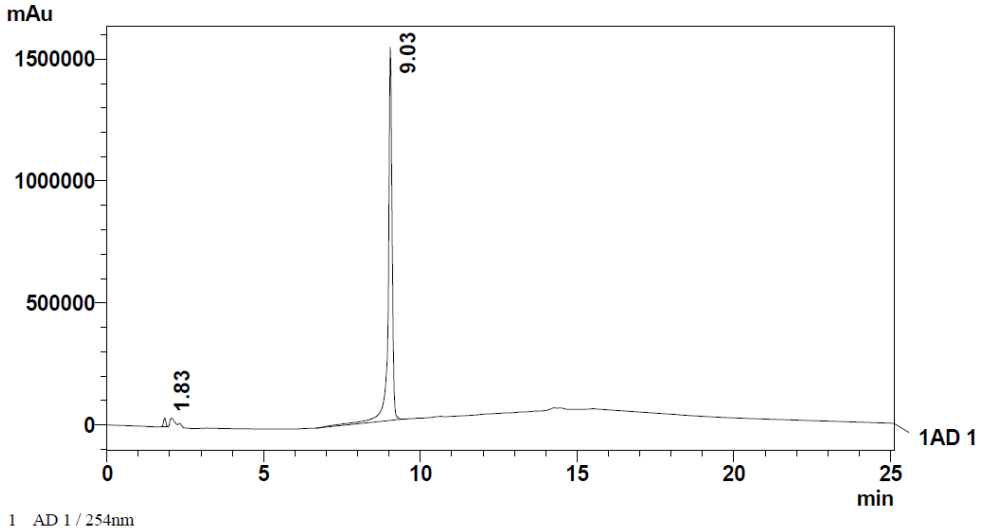
Cromatograma do composto **6d**



RMN ^{1}H do composto **6e** em $CDCl_3$



RMN ^{13}C do composto **6e** em $CDCl_3$

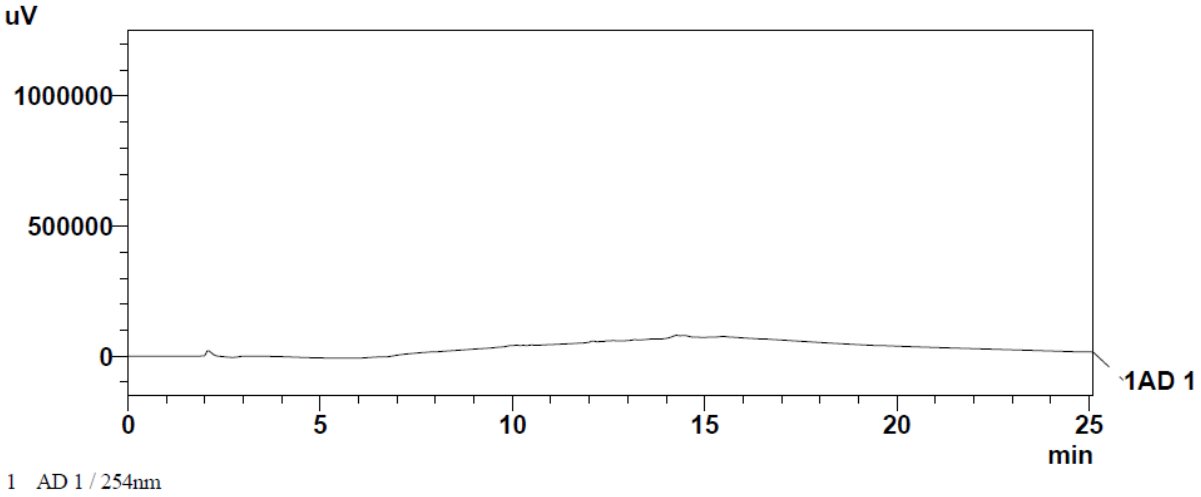


PeakTable

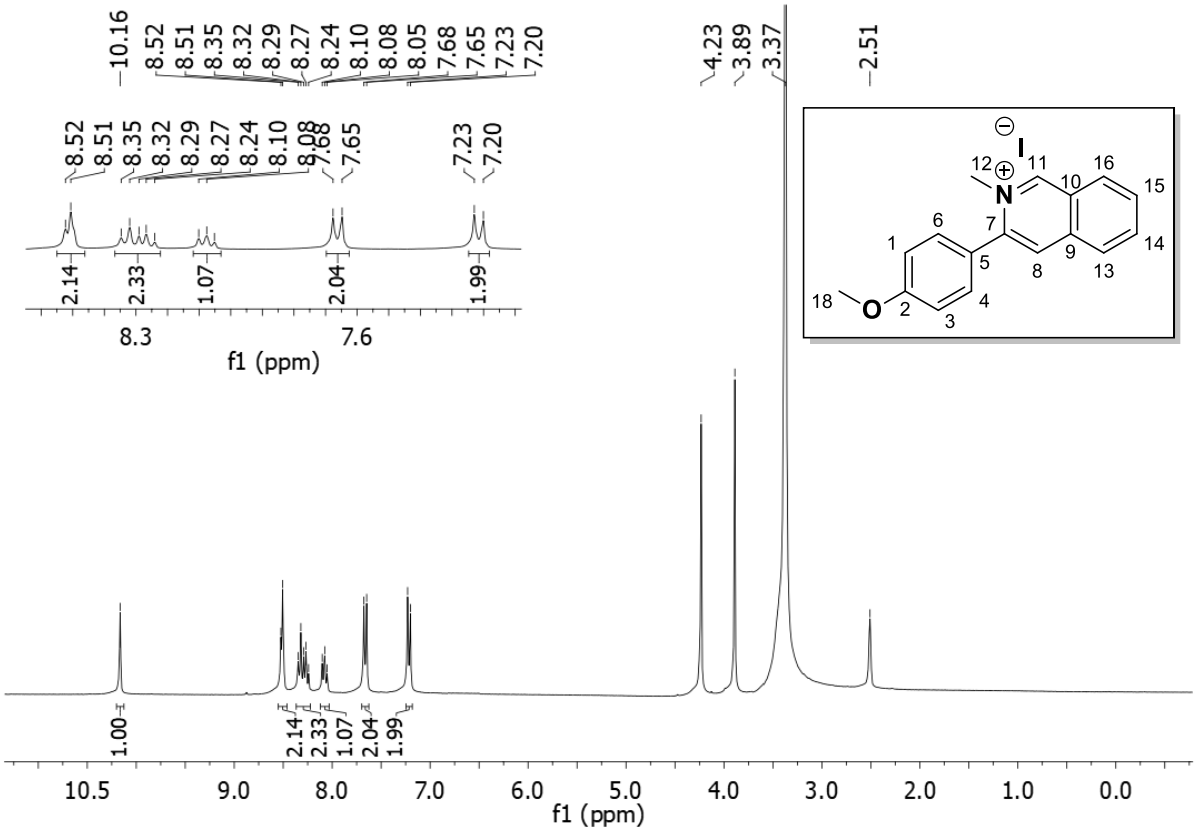
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Heig	Tailing Facto	Area %	Conc. %
1	1.833	188750	36216	0.085	1.126	1.394	1.394
2	9.032	13355121	1529697	0.107	0.832	98.606	98.606
Total		13543871	1565913			100.000	

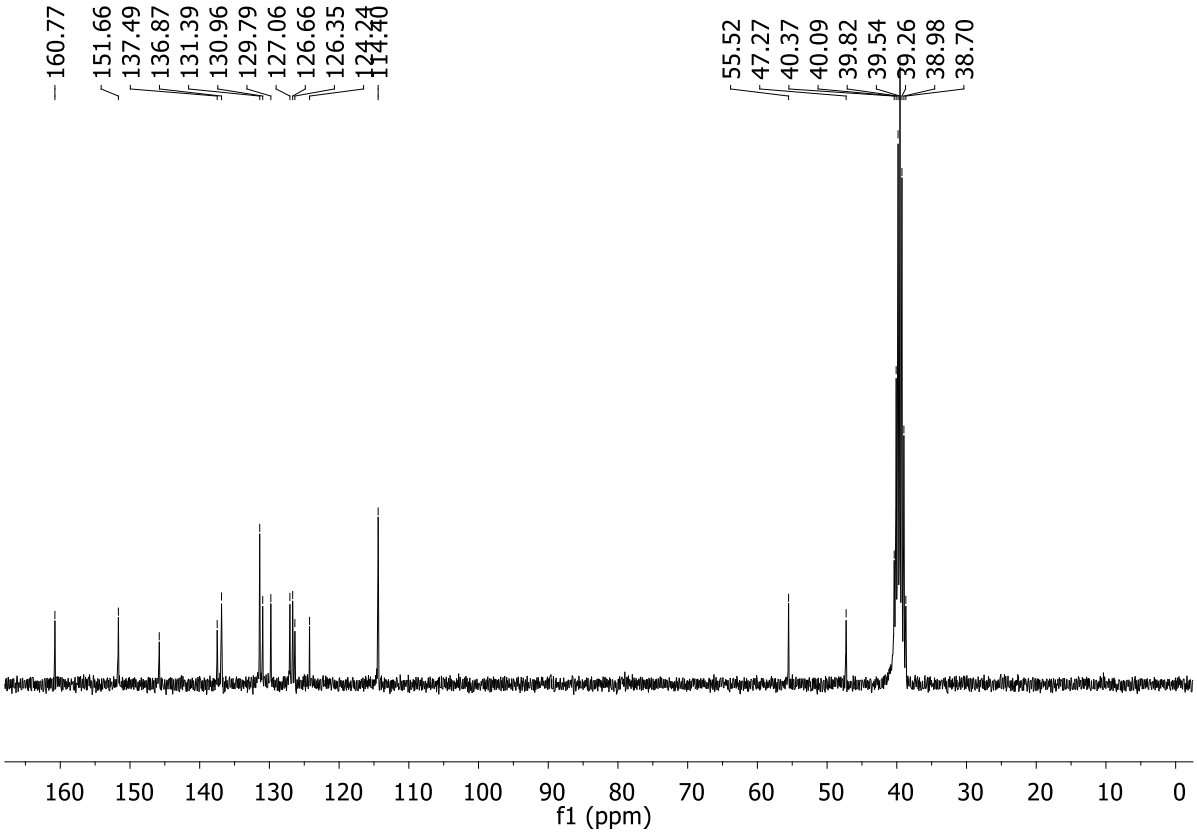
BRANCO



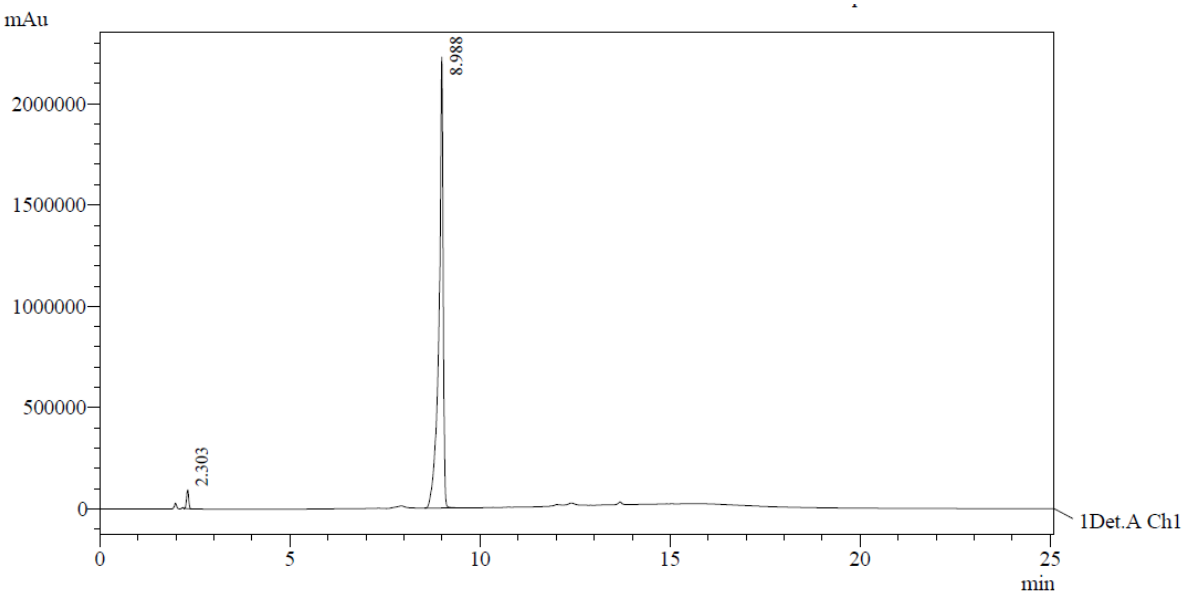
Cromatograma do composto **6e**



RMN ^{1}H do composto **7a** em DMSO-d_6

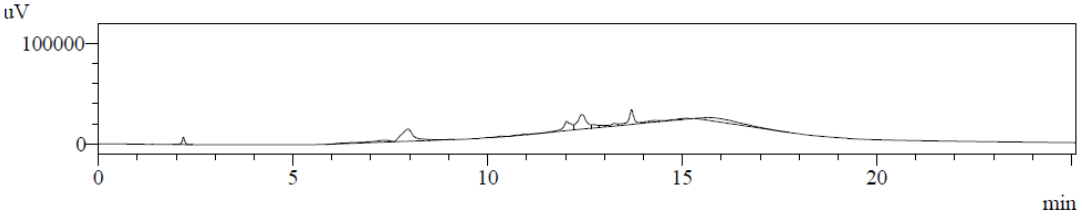


RMN ^{13}C do composto **7a** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



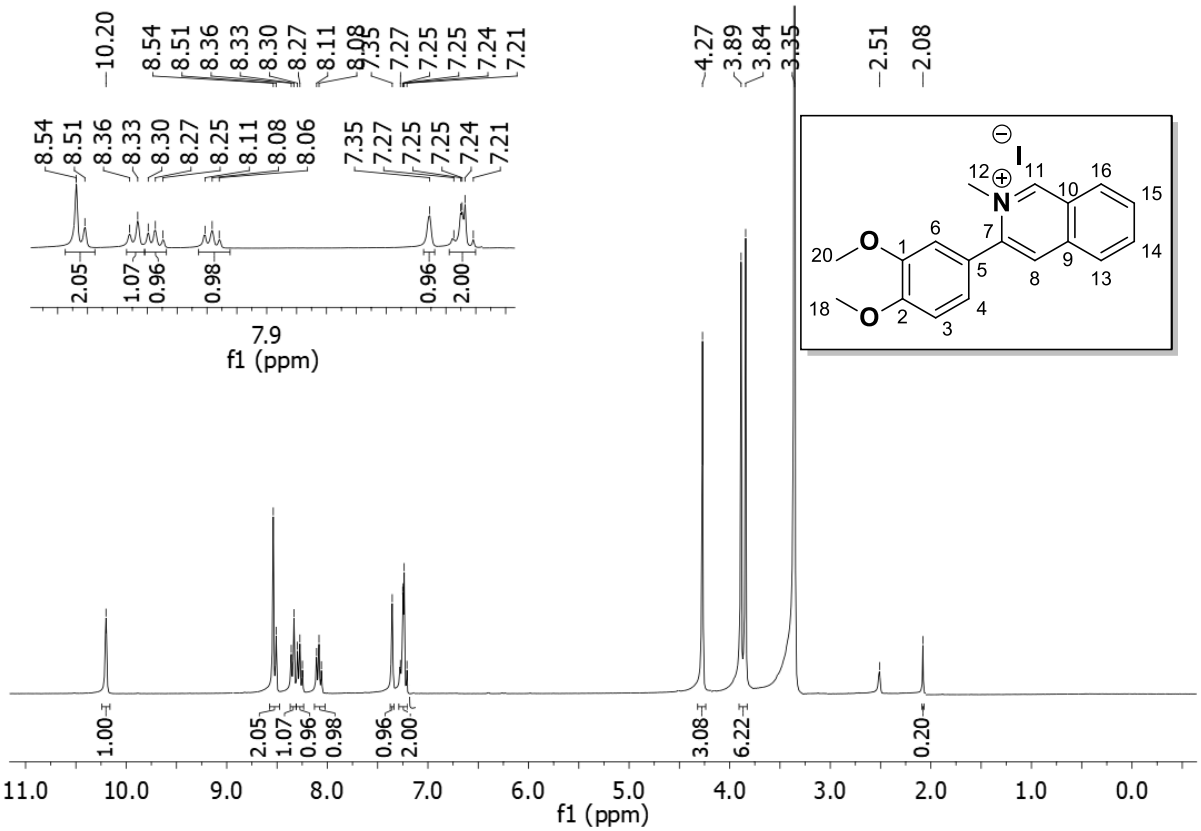
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

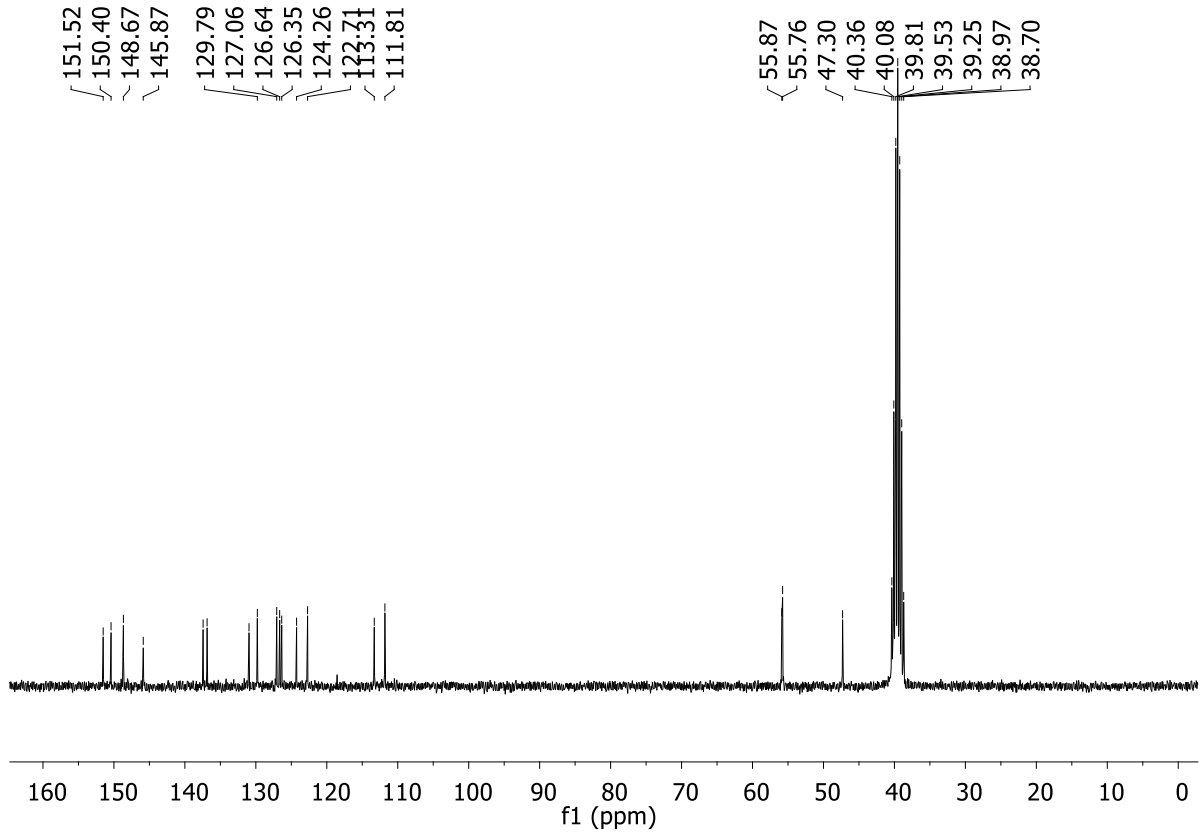
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	2.303	346070	0.000	1.966	1.966
2	8.988	17255157	45.598	98.034	98.034
Total		17601228		100.000	

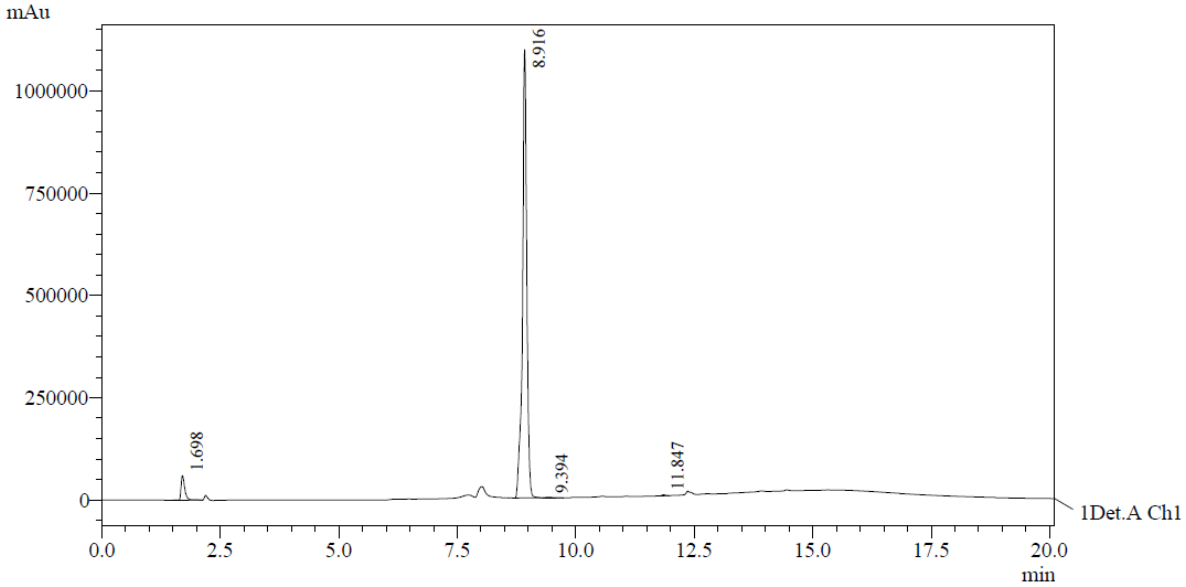
Cromatograma do composto **7a**



RMN ^{1}H do composto **7b** em DMSO-d_6

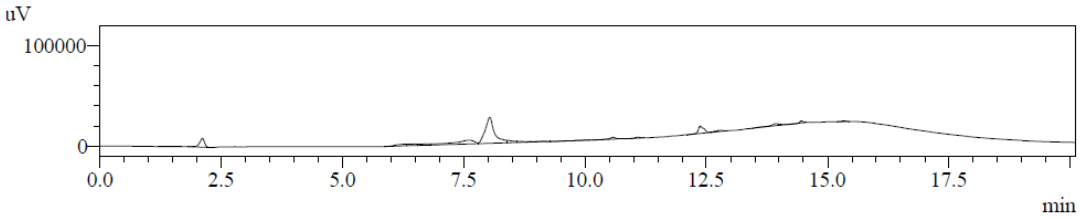


RMN ^{13}C do composto **7b** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



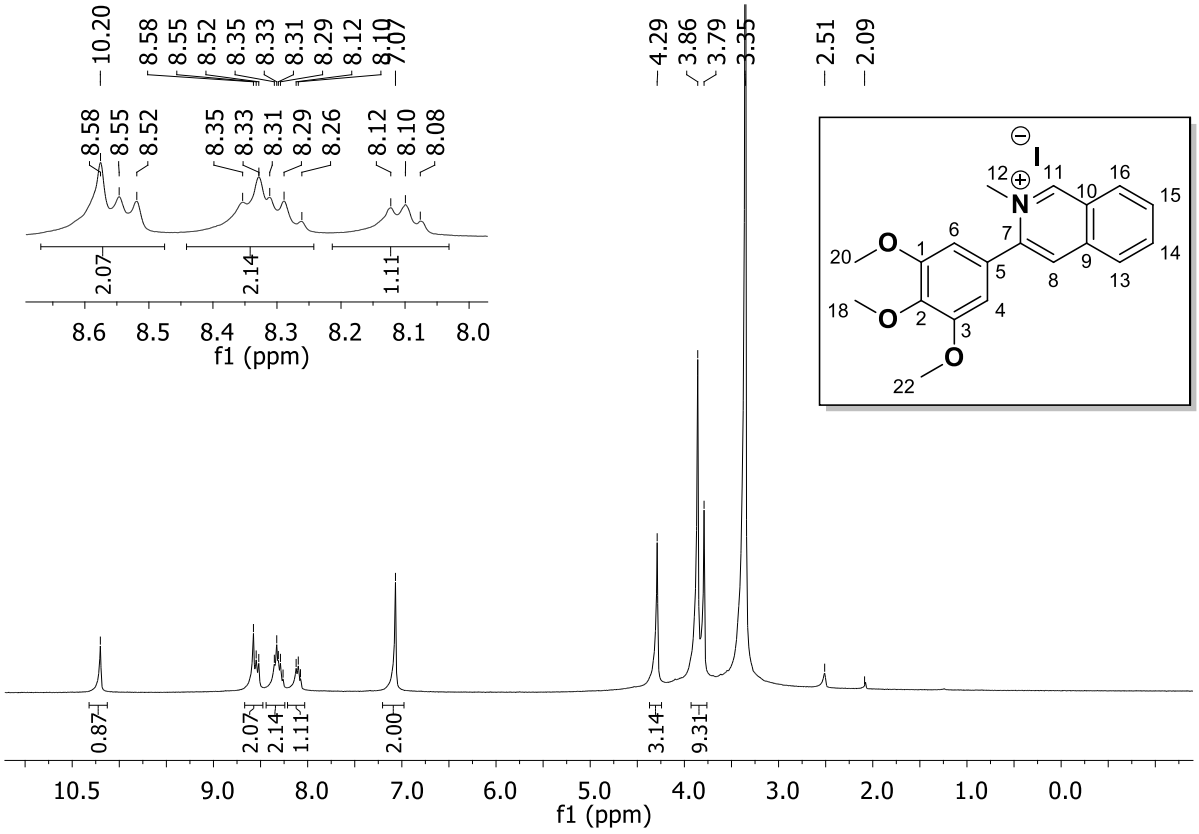
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

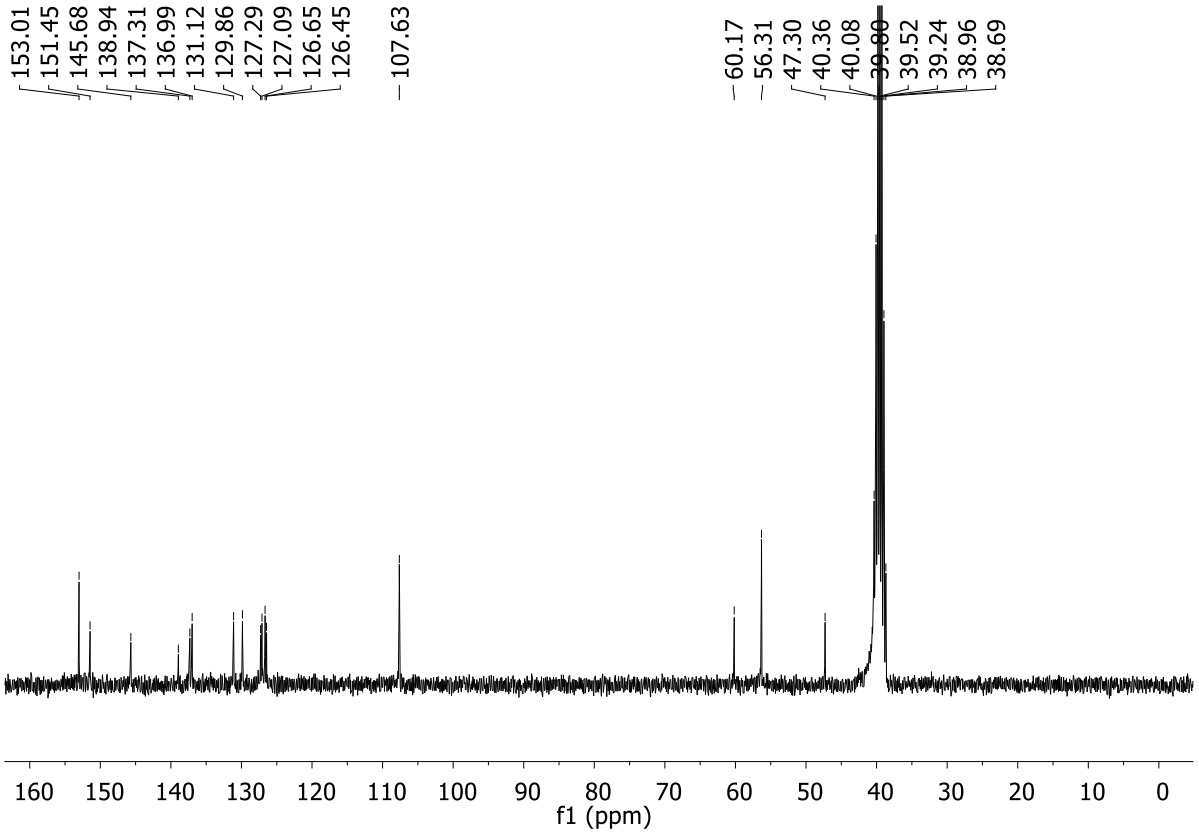
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	1.698	325039	0.000	4.565	4.565
2	8.916	6775095	46.074	95.159	95.159
3	9.394	7651	2.460	0.107	0.107
4	11.847	11987	13.528	0.168	0.168
Total		7119772		100.000	

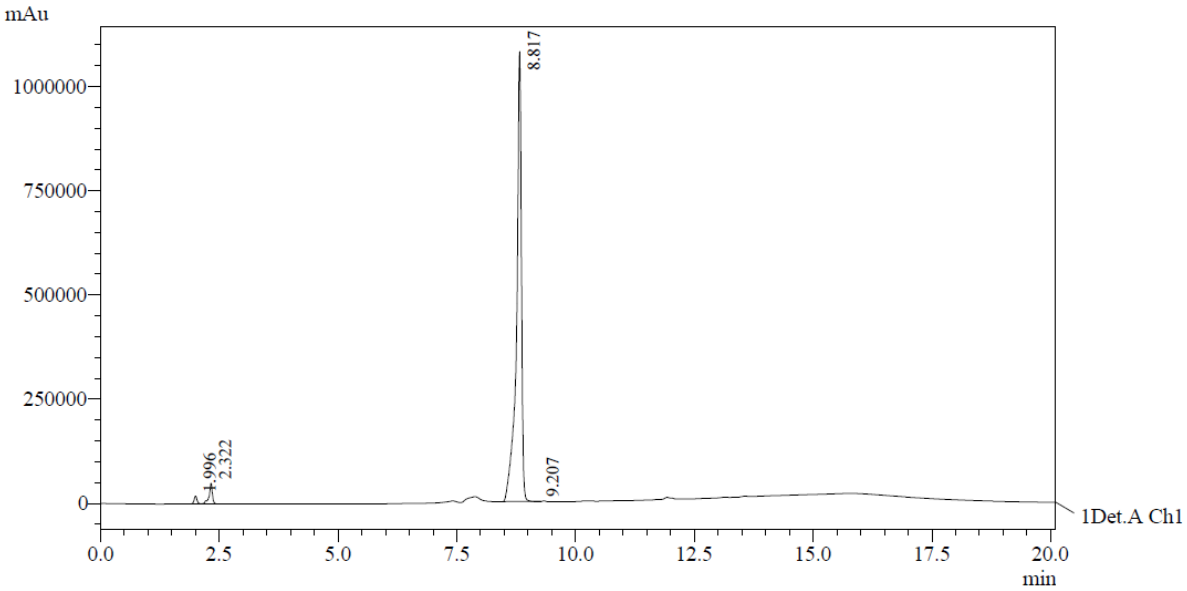
Cromatograma do composto **7b**



RMN ^{1}H do composto **7c** em DMSO-d_6

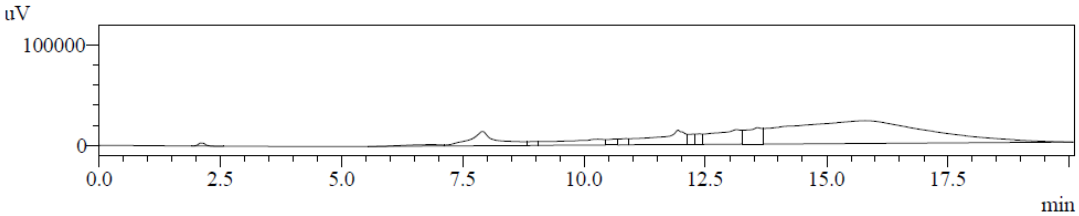


RMN ^{13}C do composto **7c** em DMSO-d_6



1 Det.A Ch1 / 254nm

Background



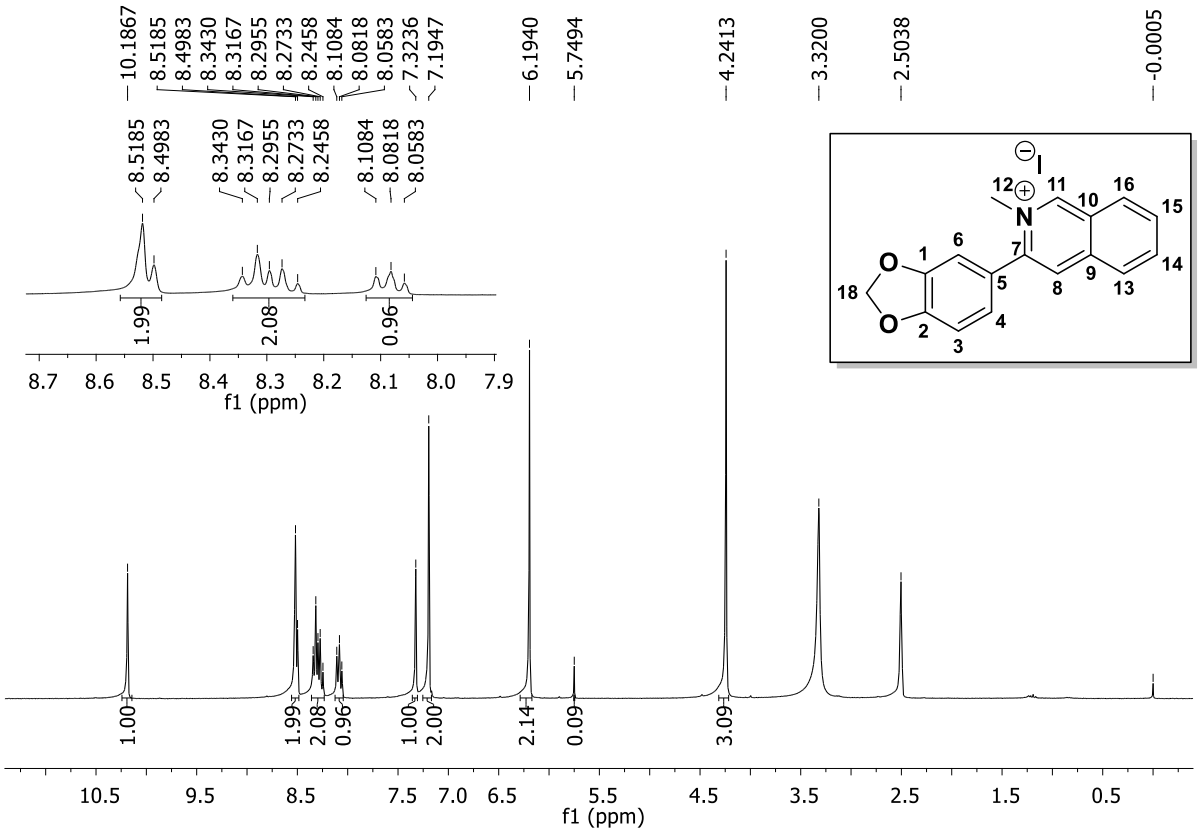
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

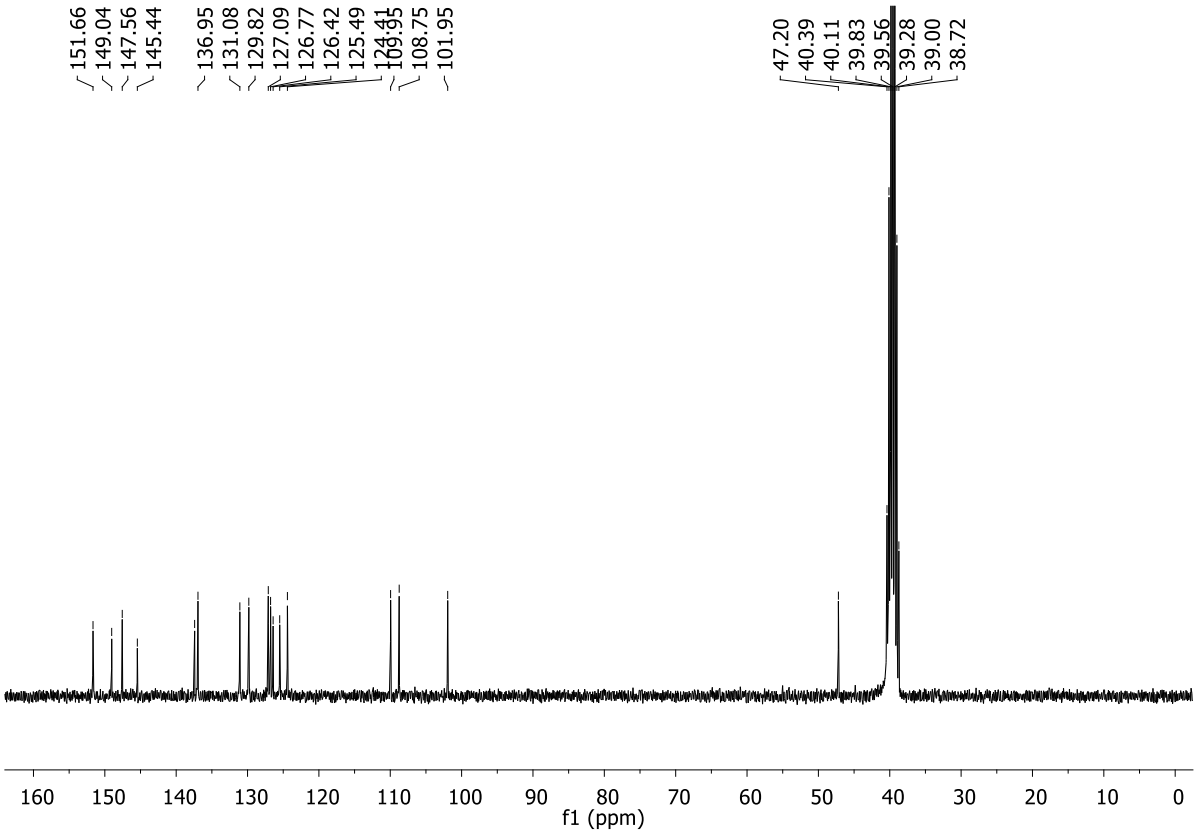
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Area %	Conc.
1	1.996	86429	0.000	1.066	1.066
2	2.322	245229	2.604	3.025	3.025
3	8.817	7774579	43.755	95.888	95.888
4	9.207	1721	2.710	0.021	0.021
Total		8107958		100.000	

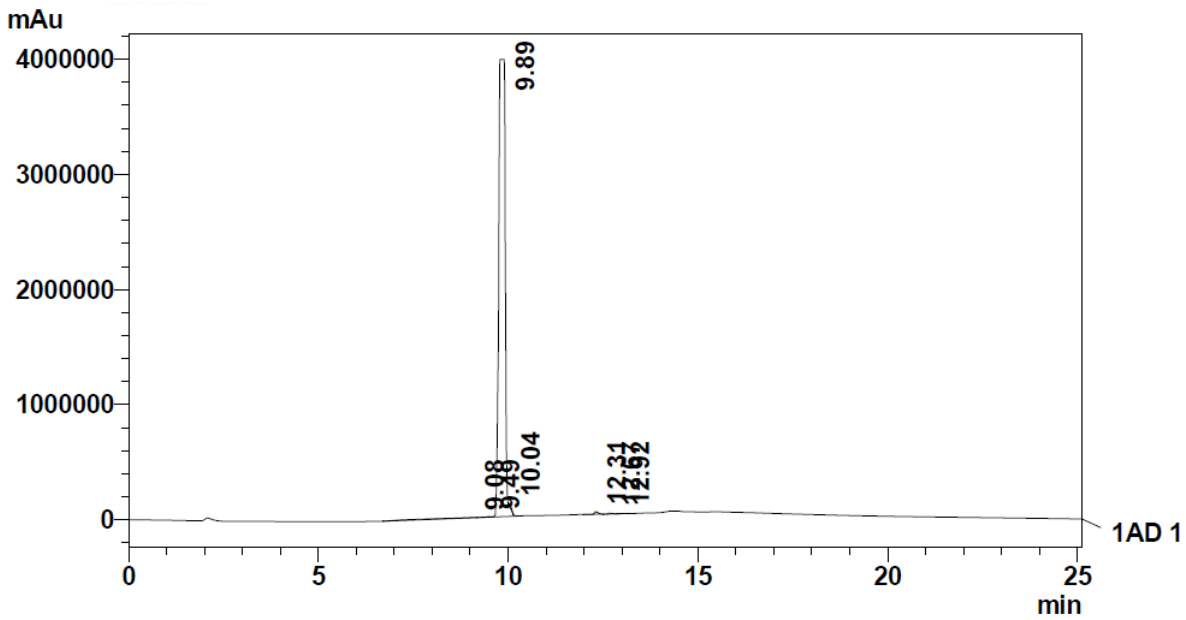
Cromatograma do composto **7c**



RMN ^{1}H do composto **7d** em DMSO-d_6



RMN ^{13}C do composto **7d** em DMSO-d_6



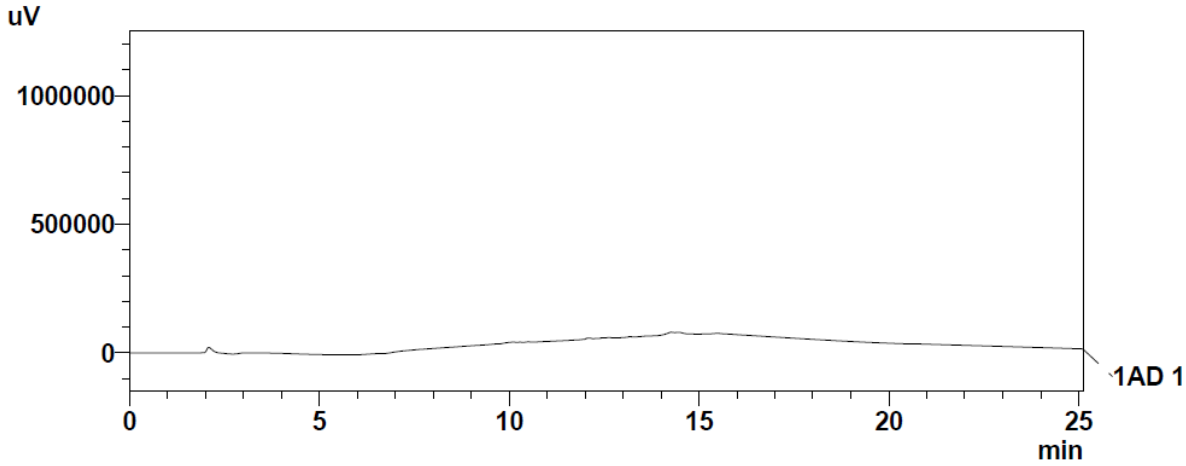
1 AD 1 / 254nm

PeakTable

Ch1

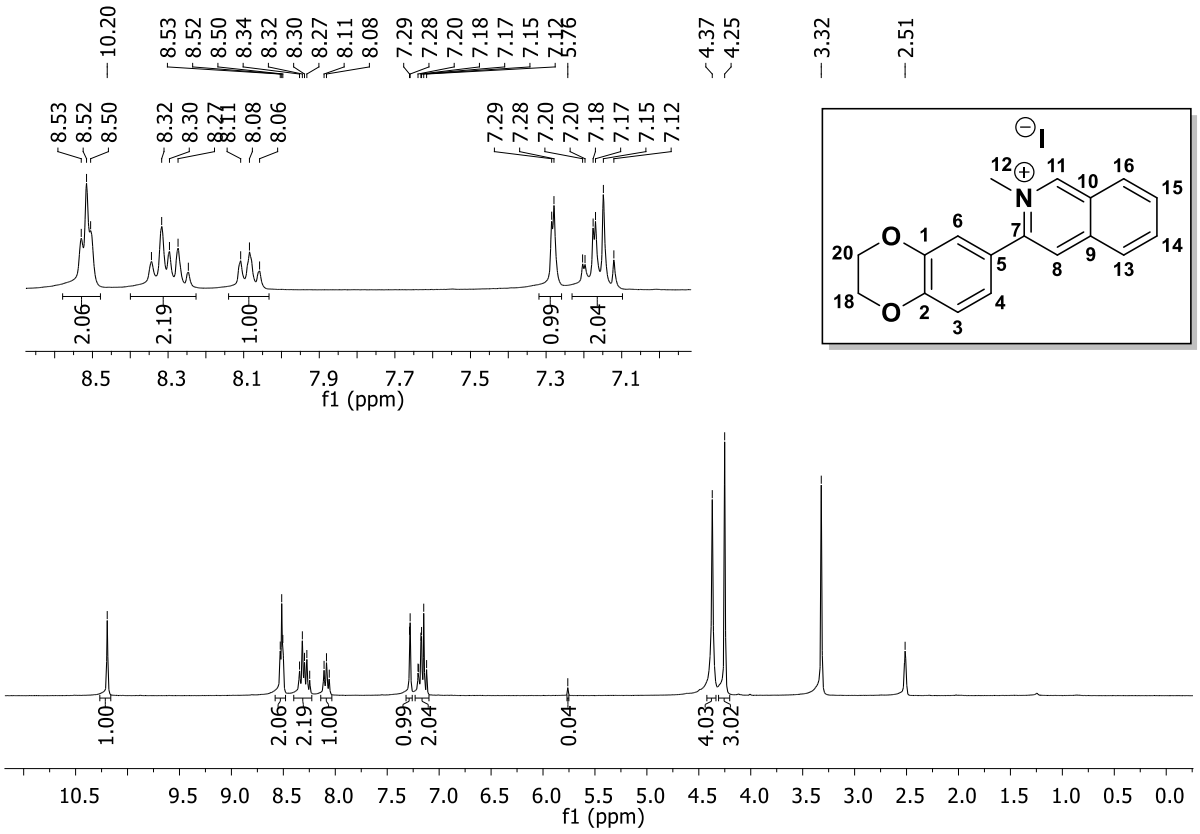
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Heig	Tailing Facto	Area %	Conc. %
1	9.080	530364	2772	2.323	0.000	1.127	1.127
2	9.490	41931	3822	0.125	0.000	0.089	0.089
3	9.888	46143530	3972597	0.176	0.716	98.040	98.040
4	10.035	123532	32280	0.071	2.027	0.262	0.262
5	12.305	163696	21861	0.114	1.560	0.348	0.348
6	12.669	46563	6553	0.112	1.371	0.099	0.099
7	12.916	16336	2340	0.112	1.510	0.035	0.035
Total		47065952	4042225			100.000	

BRANCO

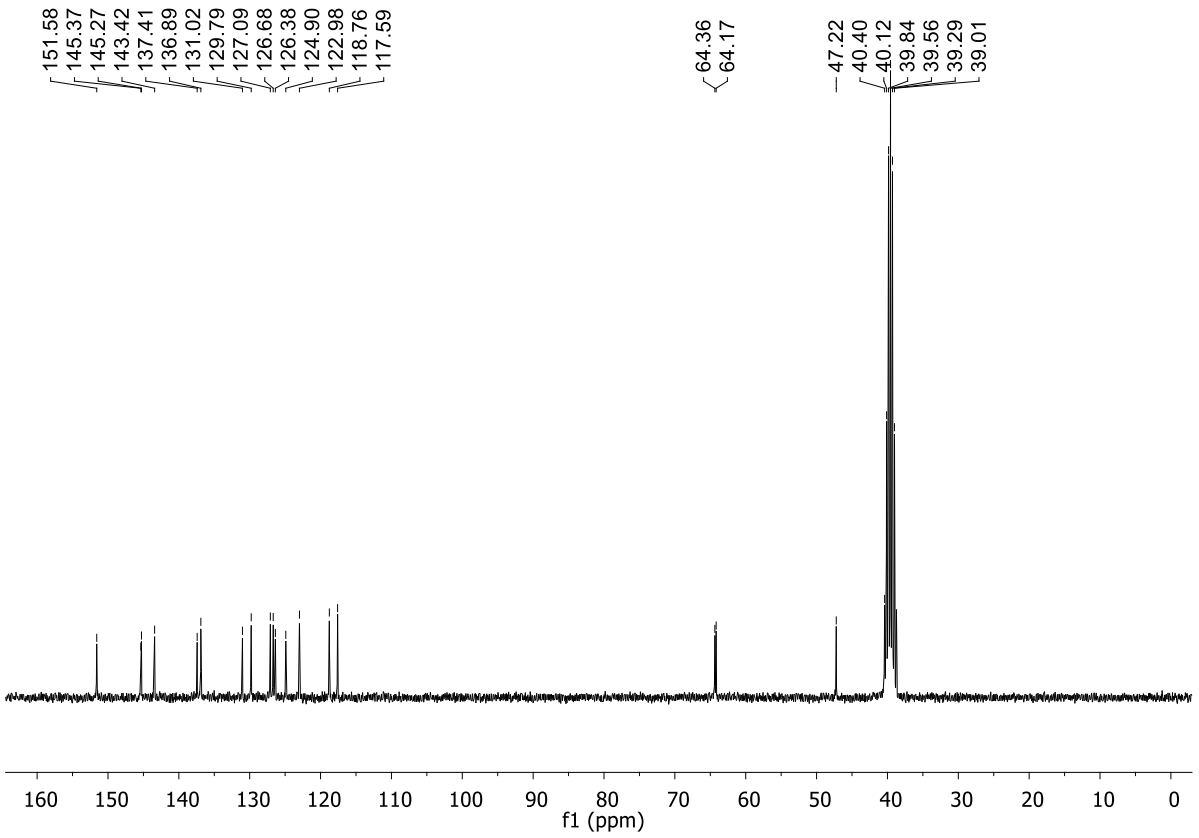


1 AD 1 / 254nm

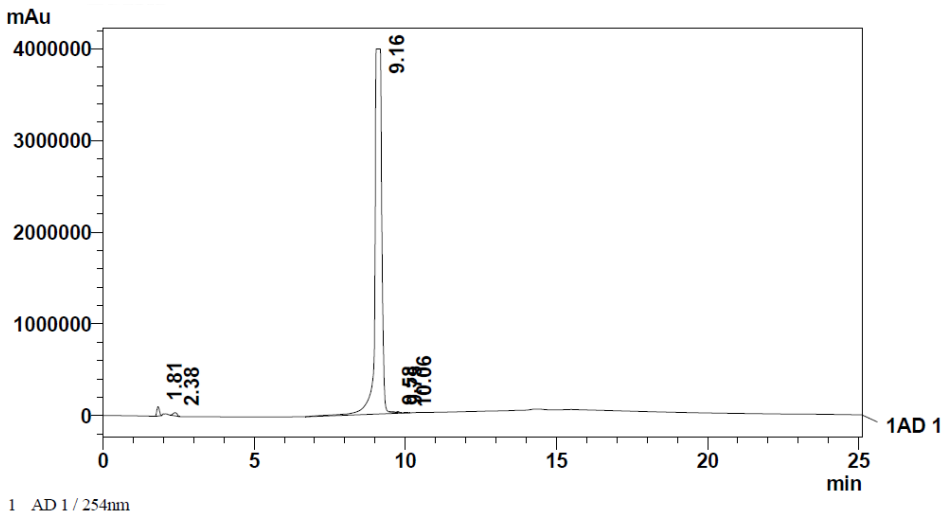
Cromatograma do composto **7d**



RMN ^{1}H do composto **7e** em DMSO-d_6



RMN ^{13}C do composto **7e** em DMSO-d_6

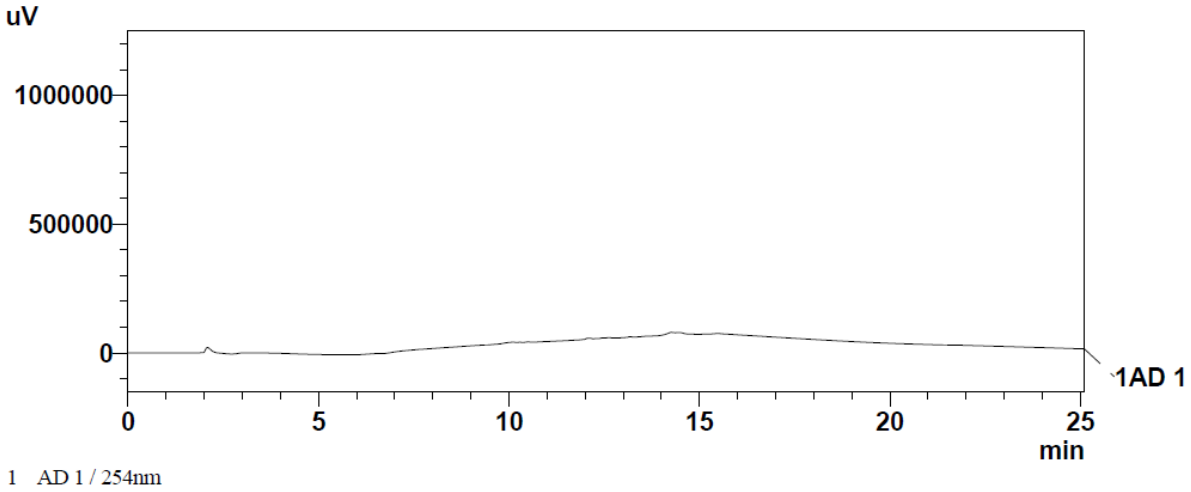


PeakTable

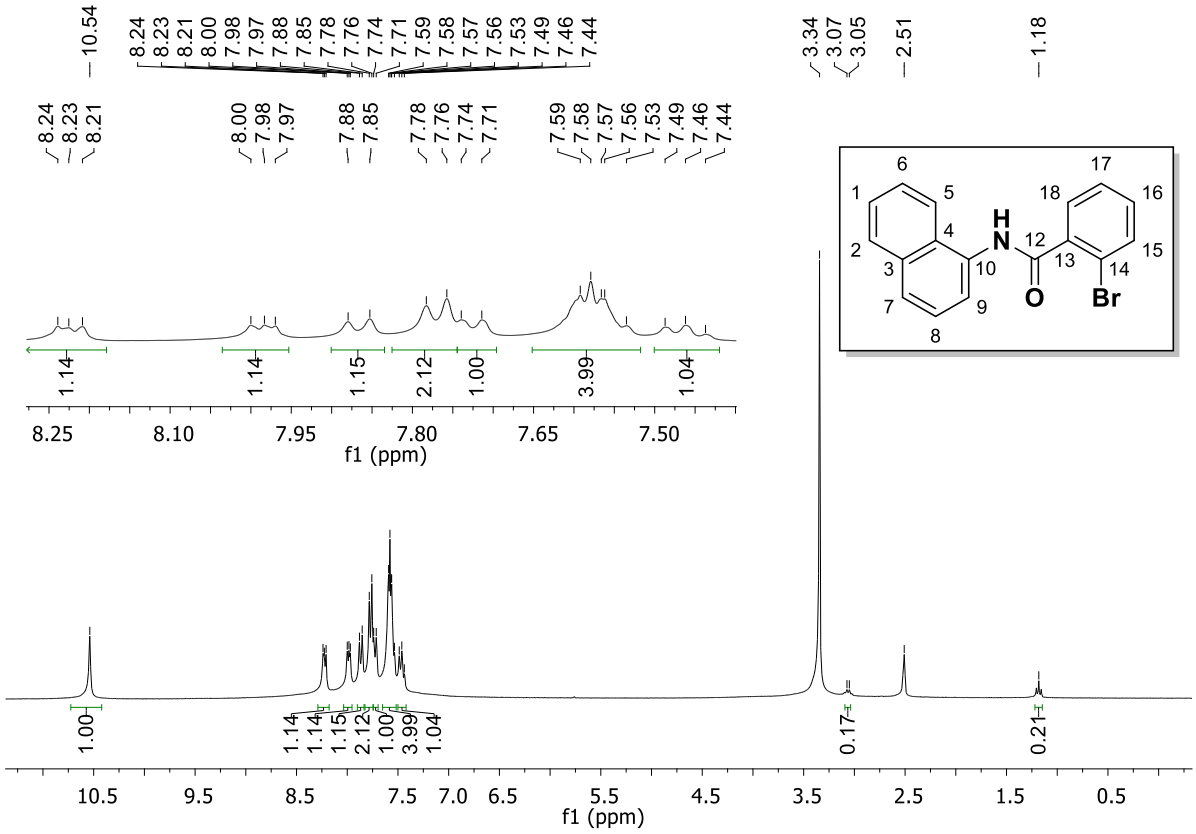
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Heigh	Tailing Facto	Area %	Conc. %
1	1.812	598527	101200	0.098	1.207	0.927	0.927
2	2.376	319170	35632	0.155	0.977	0.494	0.494
3	9.163	63542652	3982075	0.223	0.724	98.435	98.435
4	9.583	31621	5054	0.104	0.000	0.049	0.049
5	9.746	60029	11138	0.088	0.000	0.093	0.093
6	10.059	1160	179	0.080	0.668	0.002	0.002
Total		64553158	4135279			100.000	

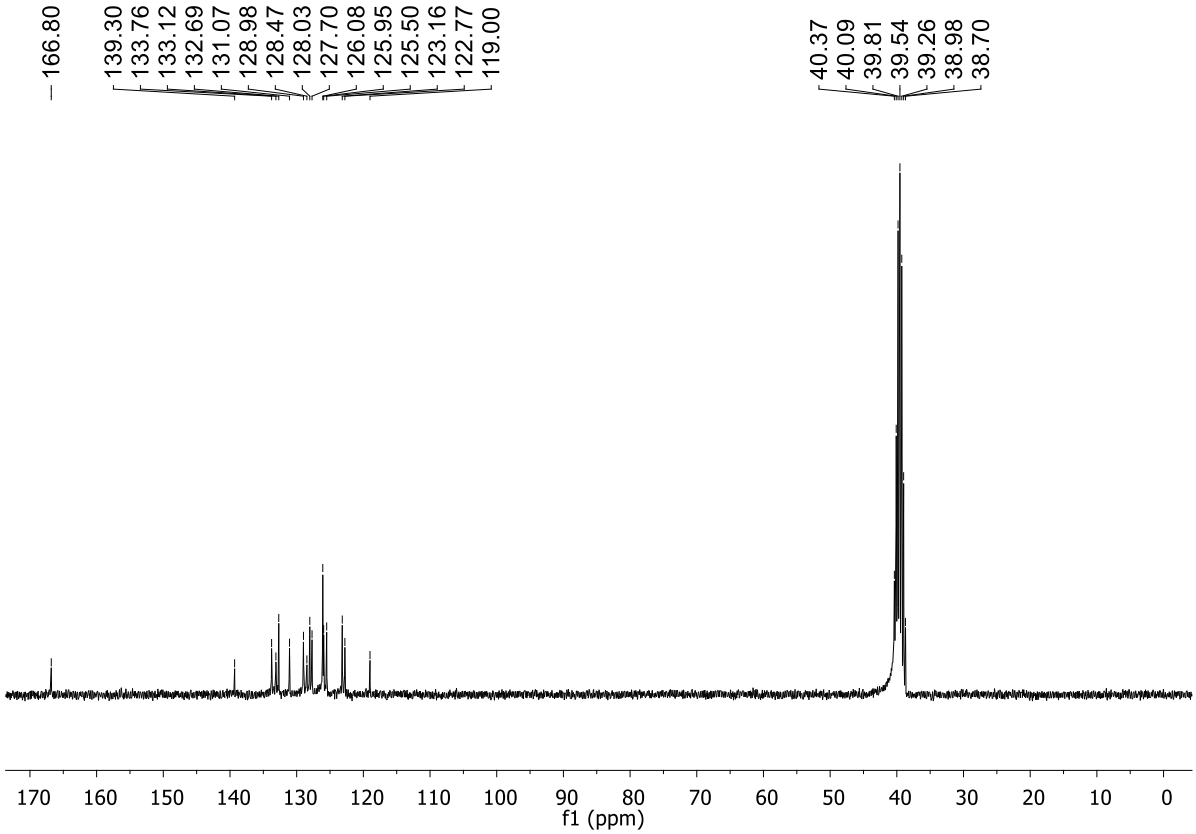
BRANCO



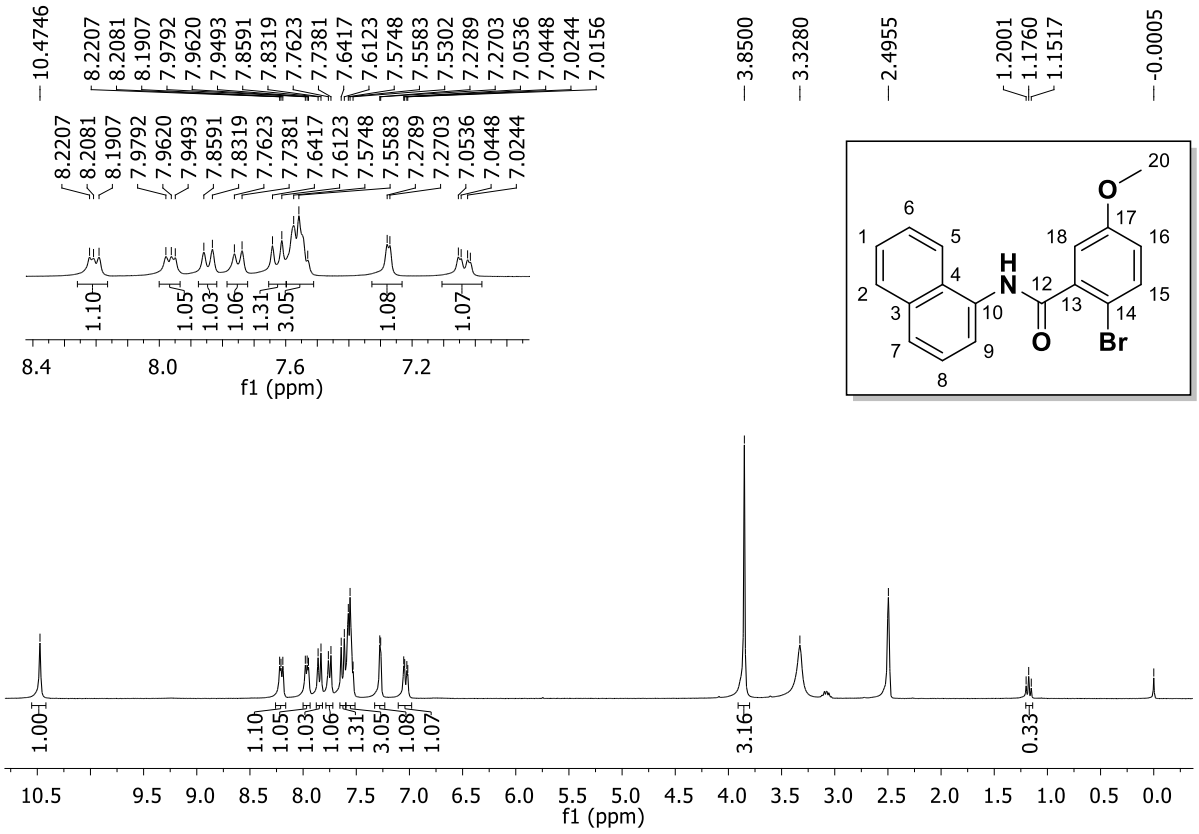
Cromatograma do composto **7e**



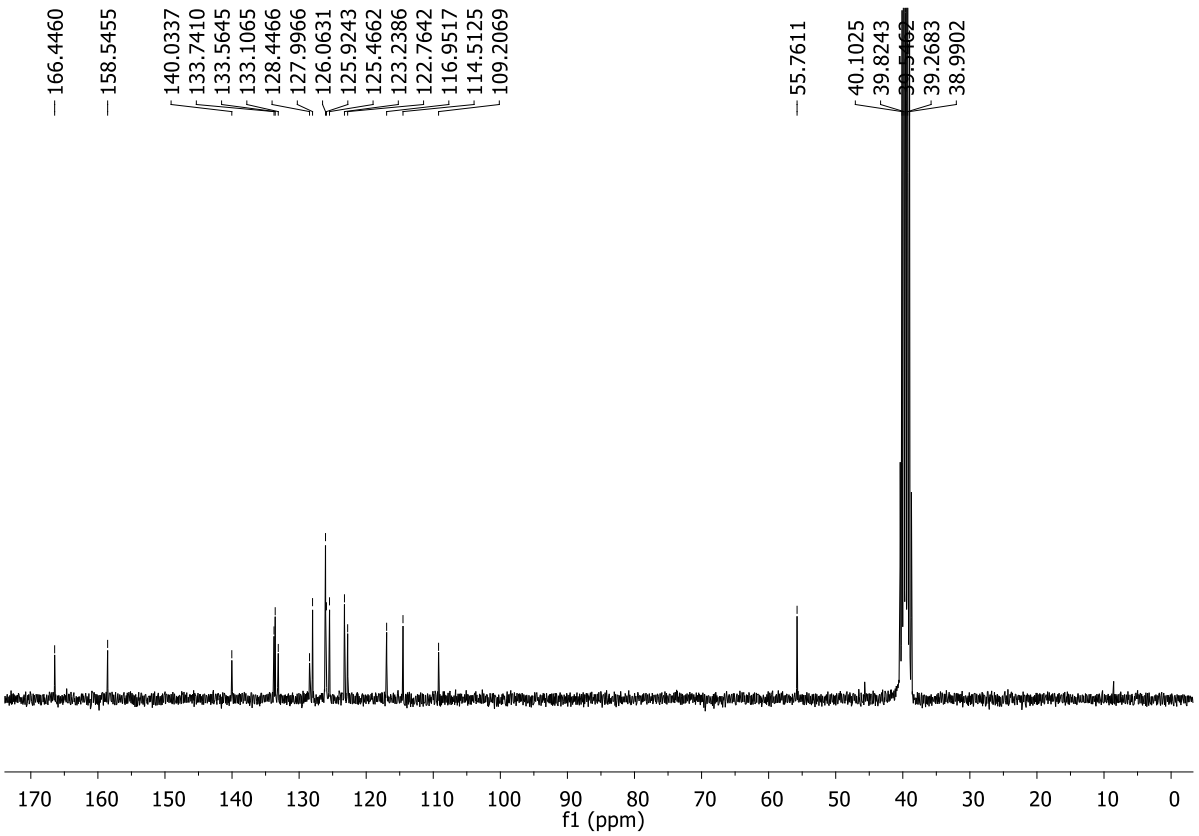
RMN ^{1}H do composto **9a** em DMSO-d_6



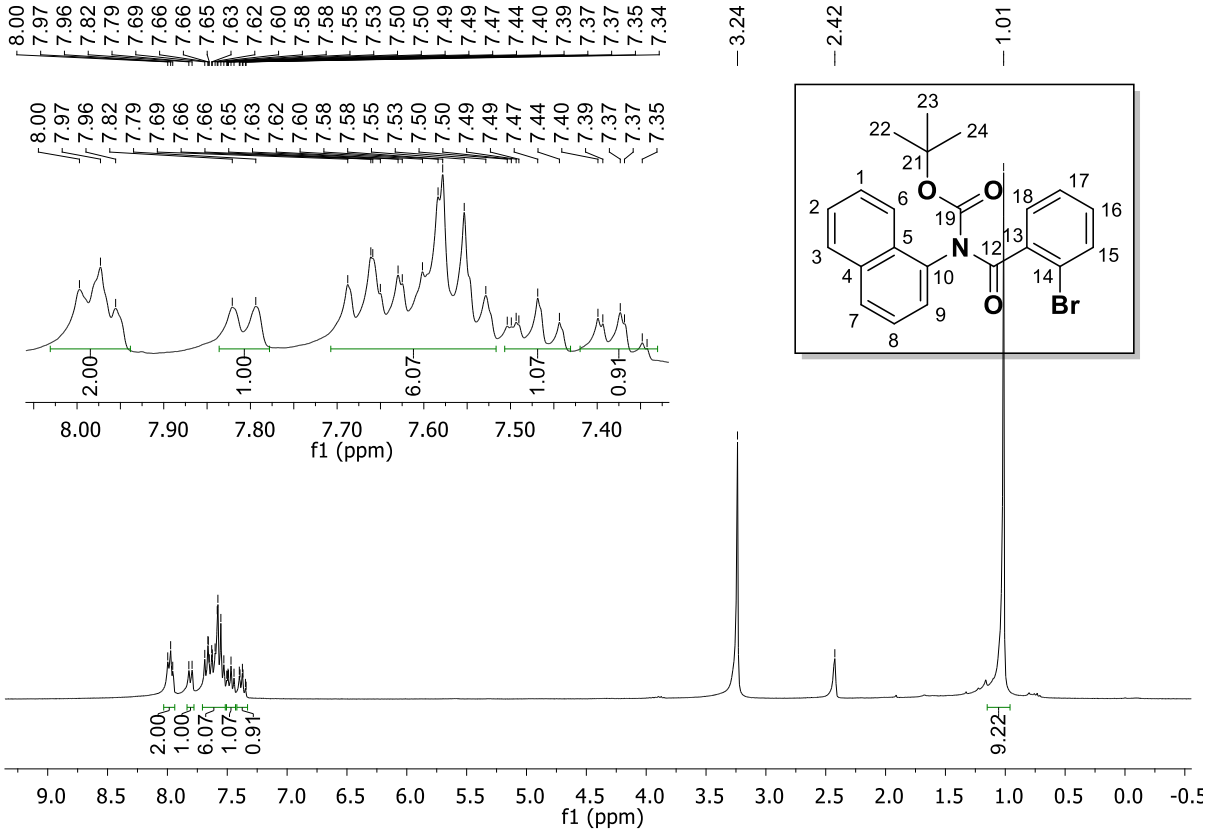
RMN ^{13}C do composto **9a** em DMSO-d_6



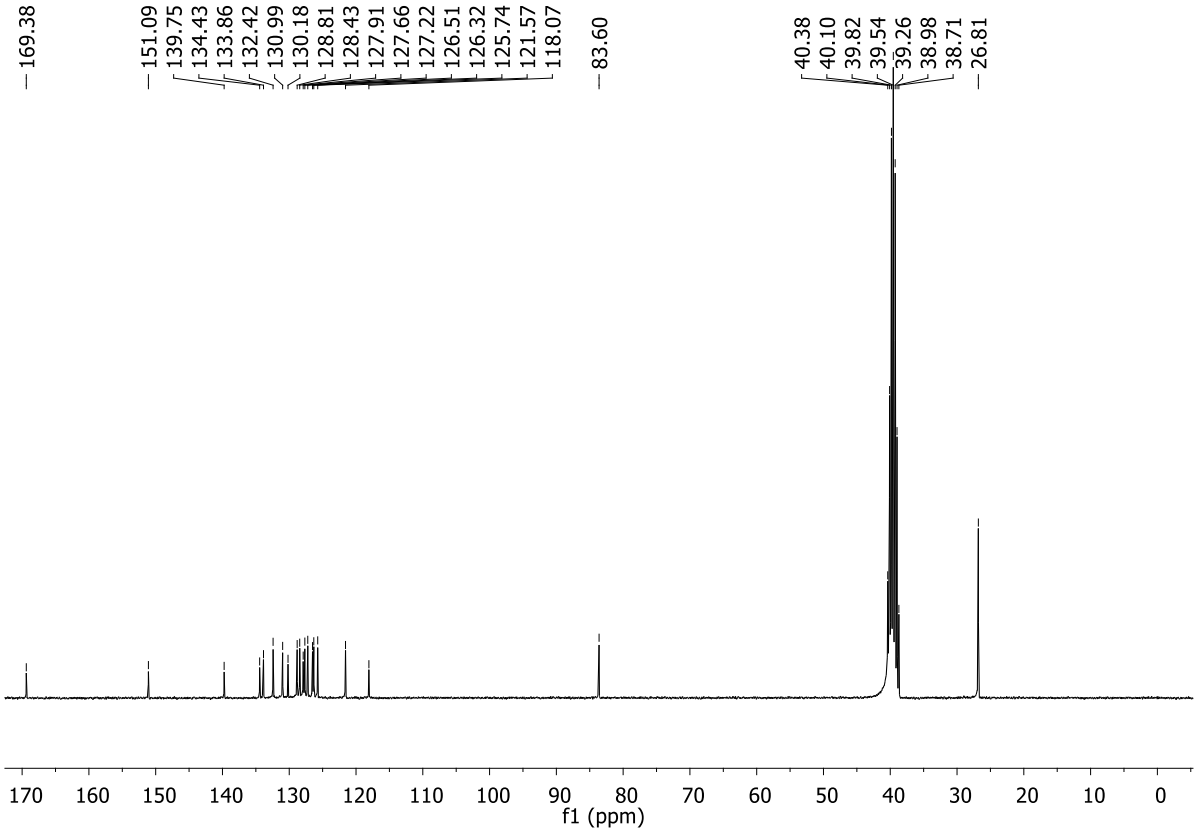
RMN ^{1}H do composto **9b** em DMSO-d_6



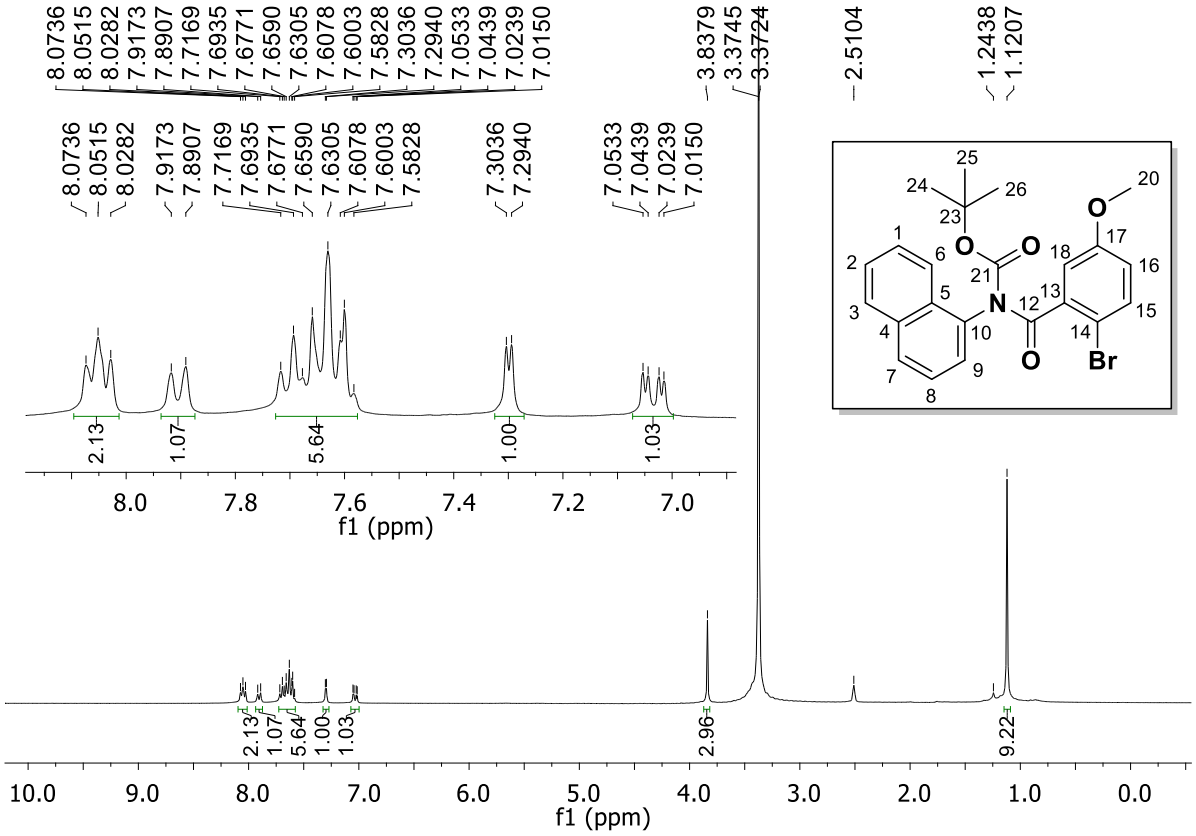
RMN ^{13}C do composto **9b** em DMSO-d_6



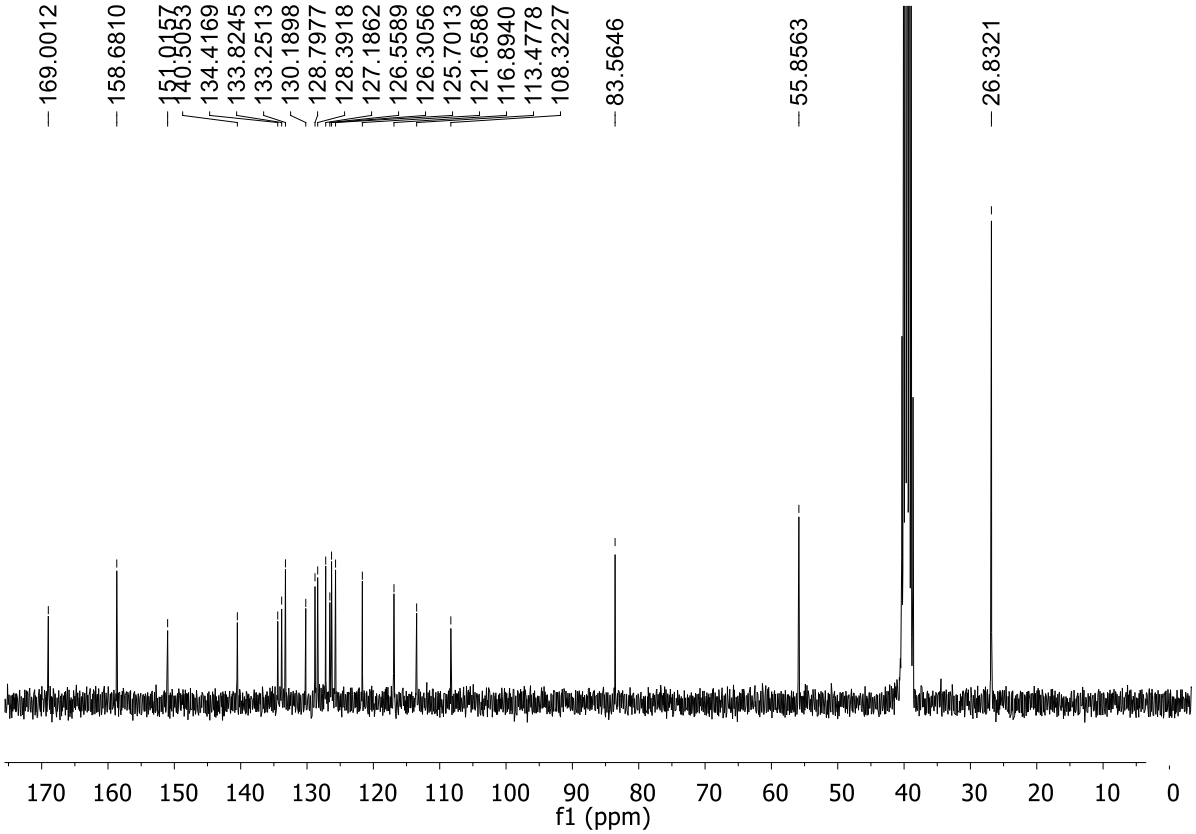
RMN ^{1}H do composto **10a** em DMSO-d_6



RMN ^{13}C do composto **10a** em DMSO-d_6



RMN ^{1}H do composto **10b** em DMSO-d_6



RMN ^{13}C do composto **10b** em DMSO-d_6