

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

**Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil
tetrahidroisoquinolínicos inéditos.**

MANUELA BARBOSA CORDEIRO

João Pessoa – PB

2012

MANUELA BARBOSA CORDEIRO

**Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil
tetrahydroisoquinolínicos inéditos.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, em cumprimento as
exigências para a obtenção do
título de **Mestre em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos.**
Área de concentração:
Farmacquímica.

Orientador: Prof. Dr. Luís César Rodrigues

João Pessoa – PB

2012

MANUELA BARBOSA CORDEIRO

**Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides feniltetra
hidroisoquinolínicos inéditos.**

Dissertação aprovada em 29/08/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís César Rodrigues

Universidade Federal da Paraíba – Orientador

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Filho

Universidade Estadual da Paraíba – Examinador Externo

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Universidade Federal da Paraíba – Examinador Interno

À minha mãe

Vera Lucia Babosa Cordeiro

por ter me concedido todos os seus ensinamentos,

deixando como maior herança a educação.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida e presença real no meu viver através do Seu filho **Jesus**.

Aos meu pais **Vera Lucia Barbosa Cordeiro** e **Ado Cordeiro Sobrinho** (*in memorian*), por toda dedicação e doação.

Ao meu marido **Elton Roney da Silva Carvalho**, pelo amor, paciência, companheirismo e cumplicidade. E especialmente por toda dedicação para a conclusão deste trabalho.

Ao meu amado filho **Rafael Cordeiro Carvalho**.

Ao meu orientador **Prof. Luis César Rodrigues** por ter me dado a oportunidade de ingressar neste meio acadêmico, por todos os ensinamentos valiosos, apoio, dedicação, compreensão, paciência, incentivo e amizade.

À amiga **Jéssica Celestino** minha profunda gratidão por toda a ajuda e empenho sem medir esforços enquanto estive de licença.

À todos os alunos da turma do mestrado 2010. Em especial à amiga **Madalena** pelos conhecimentos compartilhados e companheirismo nos seminários e atividades.

Às companheiras de bancada **Jaqueline, Ana Silvia** e **Jeane** por não só compartilhar conhecimentos como também vidrarias e reagentes.

Ao colega **Vicente Costa** da UFPB/Nucal, pela realização dos espectros deste trabalho.

Aos colegas **Renata Marcia Costa Vasconcelos** e **Leônidas das Graças Mendes Junior** e seus respectivos orientadores **Profa. Márcia Regina**

Piuvezam e Prof. Valdir de Andrade Braga pela realização dos ensaios biológicos.

À banca examinadora composta pelos professores **Eduardo de Jesus Oliveira** (UEPB) e **Francisco Jaime Bezerra Mendonça Filho** (UEPB) pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Aos **funcionários** pelos diversos serviços prestados, atenção e por proporcionar o bom andamento dos nossos trabalhos.

Aos **professores** do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos bioativos pelos conhecimentos transmitidos.

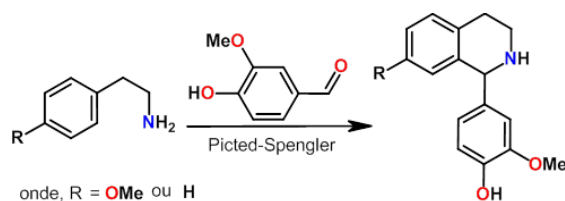
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

“Os jovens se cansam e se fatigam, e os
moços de exaustos caem, mas os que
esperam no senhor renovam as suas forças,
sobem com asas como águias, correm e não
se cansam, caminham e não se fatigam”

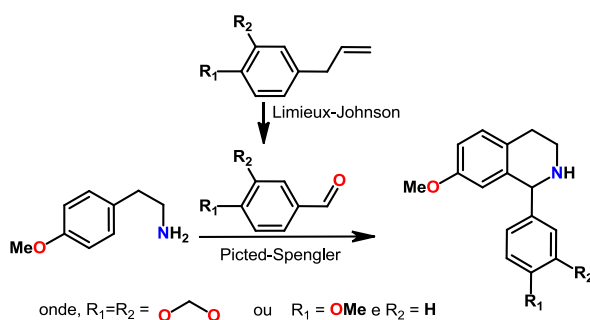
Isaias 40:30-31

RESUMO

O número de alcaloides que contém o esqueleto tetrahydroisoquinolínico 1-substituído é extenso e a impressionante versatilidade farmacológica desta classe desperta o interesse nos farmacologistas experimentais. Aplicando a consagrada reação de Pictet-Spengler obtivemos quatro alcaloides fenil tetrahydroisoquinolínicos dos quais três são inéditos. Dois deles obtidos com excelente rendimento (93,45%) em uma única etapa.



Partindo-se de alilbenzenos que inicialmente passaram por uma isomerização seguida de oxidação via reação de Limieux-Johnson, foram obtidos os outros dois alcaloides com rendimento global de 50%.

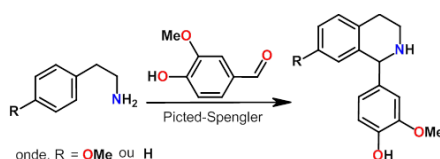


Em modelo experimental de inflamação aguda, a 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina (MTHP) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a migração celular para a cavidade abdominal de camundongos bem como a liberação dos mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 e IL-6) em uma dose cento e trinta e oito vezes menor que a dose de AAS administrada (200mg/Kg i.p.). MTHP provoca hipotensão em ratos normotensos não anestesiados, que pode ser atribuída à participação de derivados do endotélio, incluindo fatores de NO e metabólitos COX. Estes dados sugerem que MTHP tem efeitos anti-inflamatórios e hipotensores relacionados a diferentes mecanismos, e novos estudos são necessários para explorar seu potencial.

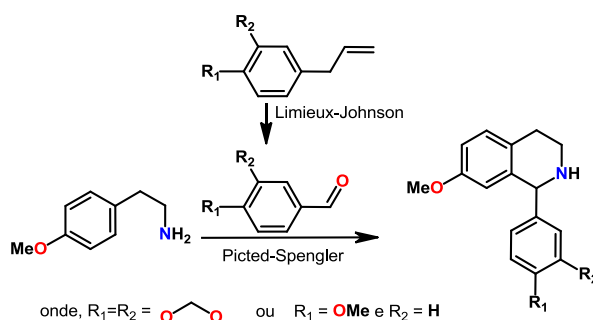
Palavras-chave: Alcalóides Feniltetrahydroisoquinolínicos, Reação de Pictet-Spengler, Reação de Limieux-Johnson, anti-inflamatório, hipotensor.

ABSTRACT

The number of alkaloids containing the 1-substituted tetrahydroisoquinoline skeleton is extensive and impressive versatility of this pharmacological class arouses interest in experimental pharmacologists. Applying the consecrated Pictet-Spengler reaction of four phenyltetrahydroisoquinoline alkaloids was obtained, three of which are unpublished. Two of them obtained with excellent yield (93.45%) in one step.



Starting from allylbenzene that initially passed through an isomerization followed by oxidation by applying the Limieux-Johnson reaction were obtained from two other alkaloids with an overall yield of 50%.



In experimental models of acute inflammation, the 1-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (MTHP) significantly reduced ($p < 0.05$) cell migration into the abdominal cavity of mice and the release of pro-inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 and IL-6) in a dose one hundred thirty-eight times lower dosage than the dose of aspirin administered (200 mg/Kg). The MTHP causes hypotension in non-anesthetized normotensive rats, which can be attributed to the participation of endothelium-derived factors, including NO and metabolites COX. These data suggest that MTHP has anti-inflammatory and hypotensive effect related to different mechanisms, and further studies are needed to explore its potential.

Keywords: Phenyltetrahydroisoquinoline Alkaloids, Pictet-Spengler reaction, Limieux-Johnson reaction, anti-inflammatory, hypotensive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alcaloides isoquinolínicos com atividade hipotensora e/ou anti-inflamatória.....	21
Figura 2 - Diversidade estrutural dos alcalóides.....	26
Figura 3 - Núcleos isoquinolínico, tetrahydroisoquinolínico e tetrahydroisoquinolínico 1-substituído	26
Figura 4 - Papaverina, liriodenina e triclisina.....	27
Figura 5 - Criptostilinas I, II, III,.....	27
Figura 6 – Estrutura da DL-Tetrahidropalmatina	32
Figura 7 - Estrutura química de YS-51	33
Figura 8 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina.....	58
Figura 9 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	59
Figura 10 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	60
Figura 11- Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMQC (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	61
Figura 12 – Expansão 1 - Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMQC (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	62
Figura 13 - Expansão 2 - Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMQC (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	63
Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydro isoquinolina.....	66

Figura 15 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydro isoquinolina.....	67
Figura 16 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydro isoquinolina.....	68
Figura 17 - Estrutura química de 14.....	70
Figura 18 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	72
Figura 19 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	73
Figura 20 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	74
Figura 21 - Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC (500 MHz, CDCl_3) de de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	75
Figura 22 - Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (500 MHz, CDCl_3) de de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	76
Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	81
Figura 24 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina.....	82
Figura 25 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina.....	83
Figura 26 - Efeito do pré-tratamento com a 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina na celularidade do lavado peritoneal.....	86
Figura 27 - Efeito do pré-tratamento com a 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina nos níveis de citocinas do lavado peritoneal.	87

Figura 28 - Efeito hipotensor de MTHP em ratos normotensos não anestesiados. Valores expressos como media \pm e.p.m., n=5.	90
Figura 29 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com FEN com e sem endotélio funcional. Valores expressos como media \pm e.p.m.....	91
Figura 30 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional pré-contráídos com solução despolarizante KCl60 mM. Valores expressos como media \pm e.p.m.....	92
Figura 31 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional pré-contráídos com FEN na presença ou ausência de L-NAME. Valores expressos como media \pm e.p.m..	93
Figura 32 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional pré-contráídos com FEN na presença ou ausência de ODQ. Valores expressos como media \pm e.p.m..	94
Figura 33 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional pré-contráídos com FEN na presença ou ausência de indometacina. Valores expressos como media \pm e.p.m.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alcaloides isoquinolínicos que apresentam atividade farmacológica e biológica	29
Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)	57
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (50 MHz) da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydro isoquinolina registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)	65
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (50 MHz) da 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)	71
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) de 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)	80

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir da L- tirosina (DEWICK,1997).....	28
Esquema 2 - Mecanismo de ação da reação de Bischler-Napieralski.....	34
Esquema 3 - Cicloadição realizada por Amè Pictet e Theodor Spengler	35
Esquema 4 - Mecanismo de ação Reação de Pictet – Spengler.....	36
Esquema 5 - Mecanismo de ação da reação do tipo Mannich	37
Esquema 6 - Mecanismo de ação Reação de Lemieux-Johnson.....	38
Esquema 7 - Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina (3).....	55
Esquema 8 - Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina (5).....	64
Esquema 9 - Proposta para a síntese da benzilisoquinolina (11).....	69
Esquema 10 - Síntese da 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	77
Esquema 11 - Patentes em que ocorre isomerização na reação de Limieux-Johnson.....	78
Esquema 12 - Síntese da 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS: Ácido acetilsalicílico

Ach: Cloridrato de acetilcolina

ATFA: Anidrido trifluoracético

CC: Cromatografia de adsorção em coluna

CCD: Cromatografia em camada delgada

CDCl_3 : Clorofórmio deuterado

DCM: Diclorometano

d: Duplete

dd: Duplo duplete

EtOAc: Acetato de Etila

FEN: Fenilefrina

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

IL: Interleucina

INDO - indometacina

I.P.: Intraperitoneal

J: Constante de acoplamento

L-NAME: N-nitro-L-arginina-metil-éster

MTHP: 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

m: Multiplete

MS4A: Peneira Molecular 4A

ODQ: (1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3a)quinoxalin-1-one

PBS: Tampão fosfato de sódio

ppm: Partes por milhão

R_f: Fator de retenção

RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RPS: Reação de Pictet Spengler

s: Simpleto

SI: Sistema Internacional de Unidades

t.a.: Temperatura ambiente

THF: Tetrahidrofurano

TNF: Fator de necrose tumoral

t: Tripleto

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UV: Ultravioleta

δ: Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3.1 Alcalóides Isoquinolínicos.....	25
3.1.1 Alcaloides Isoquinolínicos com atividade hipotensora	31
3.1.2 Alcalóides Isoquinolínicos com atividade anti-inflamatória	32
3.2 Síntese de Isoquinolinas.....	33
3.2.1 Reação de Bischler-Napieralski.....	33
3.2.2 Reação de Pictet-Spengler (RPS)	35
3.3 Oxidação de Lemieux-Johnson	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Material.....	40
4.2 Métodos.....	41
4.2.1 Síntese dos alcaloides feniltetrahydroisoquinolínicos.....	41
4.2.1.1 Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina.	41
4.2.1.2 Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina.	42
4.2.1.3 Síntese da 1-(3,4-metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina.	43
4.2.1.4 Síntese da 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina.	45
4.2.2 Ensaios Biológicos.....	47
4.2.2.1 Estudo da atividade anti-inflamatória de MTHP.....	47
4.2.2.2 Efeito de MTHP no sistema cardiovascular de ratos normotensos	48
4.2.2.2.1 Medida direta de pressão arterial (PA) em ratos normotensos não anestesiados	50
4.2.2.2.2 Efeito de MTHP sobre a pressão arterial em ratos normotensos não anestesiados.	50
4.2.2.2.3 Ensaios farmacológicos utilizando anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Síntese dos alcaloides fenil tetrahydroisoquinolínicos.....	55

5.2	Ensaios Biológicos	85
5.2.1	Efeito antiinflamatório de MTHP na peritonite induzida por zimosan 85	
5.2.2	Efeito de MTHP no sistema cardiovascular de ratos normotensos 90	
5.2.2.1	Efeito de MTHP sobre a pressão arterial em ratos normotensos não anestesiados.	90
5.2.2.2	Efeito de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina (10 μ M)	90
5.2.2.3	Efeito de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contráídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).	92
5.2.2.4	Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na resposta induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato...	92
5.2.2.5	Avaliação da participação da enzima ciclase de guanilil solúvel na resposta vasorelaxante induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato.	93
5.2.2.6	Análise do efeito através da inibição das cicloxigenases sobre a resposta vasorrelaxante induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato.	94
6.	CONCLUSÃO	97
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As isoquinolinas e os seus derivados apresentam diversas atividades biológicas e são muito utilizadas como agentes anti-infecciosos, anti-helmínticos, anti-hipertensivos, analgésicos, anti-inflamatórios e bloqueadores musculares dentre outras aplicações (SHAMMA, 1972).

A ocorrência do núcleo isoquinolínico em alcaloides e outros produtos naturais biologicamente ativos, tendo em vista a impressionante versatilidade farmacológica destes compostos, tem despertado interesse nos farmacologistas experimentais. Em particular, as tetrahydroisoquinolinas 1-substituídas, embora simples, são de grande interesse não apenas como alcaloides em si, mas também como intermediários chave, úteis na síntese de alcaloides mais complexos (AMAT et al., 2010).

As dificuldades para obtenção e isolamento de quantidades significativas de alcaloides, indispensáveis para os ensaios *in-vitro* e principalmente *in-vivo*, vêm de encontro aos animadores resultados experimentais. O extrativismo vegetal, além de fornecer pequenas quantidades de substâncias, compromete a preservação da espécie vegetal e representa um método pouco atraente do ponto de vista econômico.

Desta forma destacamos a importância dos métodos sintéticos para obtenção destes compostos, que além de viabilizar a produção em média e larga escala, oferece a flexibilidade necessária à preparação de análogos e miméticos que viabilizam não só os estudos farmacológicos *in-vivo* como nos oferece a oportunidade de estudos da relação estrutura-atividade.

O acesso a este sistema heterocíclico tem envolvido historicamente a aplicação da reação de Bischler-Napieralski ou de Pictet-Spengler (AWUAH; CAPRETTA, 2010). A reação de Bischler-Napieralski (BISCHLER; NAPIERALSKI, 1893) consiste na conversão de uma β -ariletilamina na dihydroisoquinolina correspondente, seguida de redução e obtenção da isoquinolina (BERGSTROM, 1944). A condensação de Pictet-Spengler envolve a adição de uma feniletilamina a um aldeído para a formação do íon imínio; o eletrófilo resultante é adequado para a substituição aromática e fechamento do

anel. Sistemas aromáticos e substratos que incorporam muitos elétrons tendem a dar os melhores rendimentos (AWUAH; CAPRETTA, 2010).

No presente trabalho descrevemos uma metodologia experimental simples, aplicando a reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetrahydroisoquinolínicos inéditos.

Diante do grande número de relatos descritos na literatura acerca de alcaloides isoquinolínicos com atividade hipotensora, como a berberina (LI et al., 2011), discretamina (SILVA et al., 2009), e CPU-23 (DONG et al. 1992) e anti-inflamatória, como a norisoboldina (LUO et al., 2010), YS-51 (CHAEA et al., 2007) e berberina (Figura 1), testou-se um dos alcaloides obtidos para tais atividades.

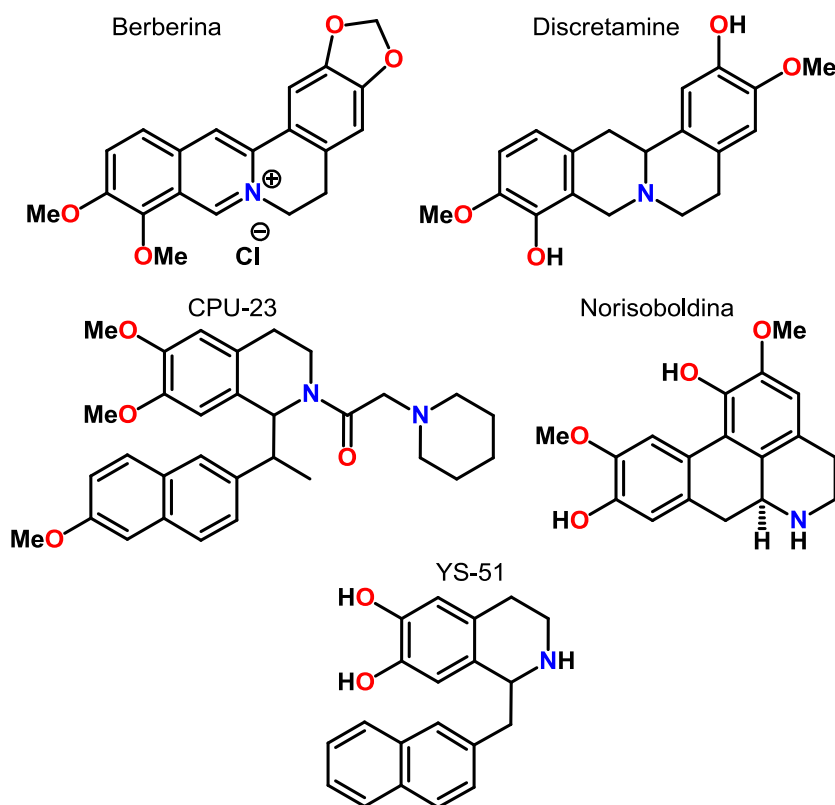


Figura 1 - Alcaloides isoquinolínicos com atividade hipotensora e/ou anti-inflamatória.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Sintetizar alcalóides fenil tetrahydroisoquinolínicos inéditos.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Partindo-se de aldeídos e aminas comercialmente disponíveis, aplicar diretamente a consagrada reação de Pictet – Spengler, para obtenção de alcaloides fenil tetrahydroisoquinolínicos inéditos.
- ✓ Sintetizar alcaloides fenil tetrahydroisoquinolínicos inéditos partindo-se de alilbenzenos comercialmente disponíveis, aplicando a reação de Limieux – Johnson para a obtenção do aldeído correspondente e submissão do mesmo à reação de Pictet – Spengler.
- ✓ Integrar estudos biológicos através do fornecimento de material para a viabilização de estudos farmacológicos *in-vitro* e *in-vivo*.

Fundamentação Teórica

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Alcalóides Isoquinolínicos.

Alcaloides são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de organismos, como, bactérias, fungos, animais marinhos, microrganismos e plantas. São amplamente distribuídos na natureza, com diversas estruturas, possuindo importantes atividades farmacológicas (BHADRA; KUMAR, 2011).

O nome alcaloide vem do conceito de um composto de caráter básico e que contenha pelo menos um átomo de nitrogênio. Uma vez que muitos dos alcaloides descobertos inicialmente originavam-se de plantas, as definições de alcaloides incluíam estas três características: conter nitrogênio, possuir caráter básico e ser de origem vegetal. Quando as estruturas reais e a origem biogenética dos alcaloides tornaram-se mais claras, foi adicionado o conceito de serem derivados de aminoácidos juntamente com a ideia de que o átomo de nitrogênio deveria estar inserido em um anel heterocíclico. Houve então alcaloides descobertos que eram neutros ou até mesmo ácidos (colchicina), que continham nitrogênio na cadeia (poliaminas), que eram derivados do núcleo purina (cafeína), derivados de um acetato (coniina) ou de um precursor terpenoide com a inserção de um nitrogênio (solanidina) e estas características, claramente não se encaixam em uma definição única e abrangente (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001) (Figura 2).

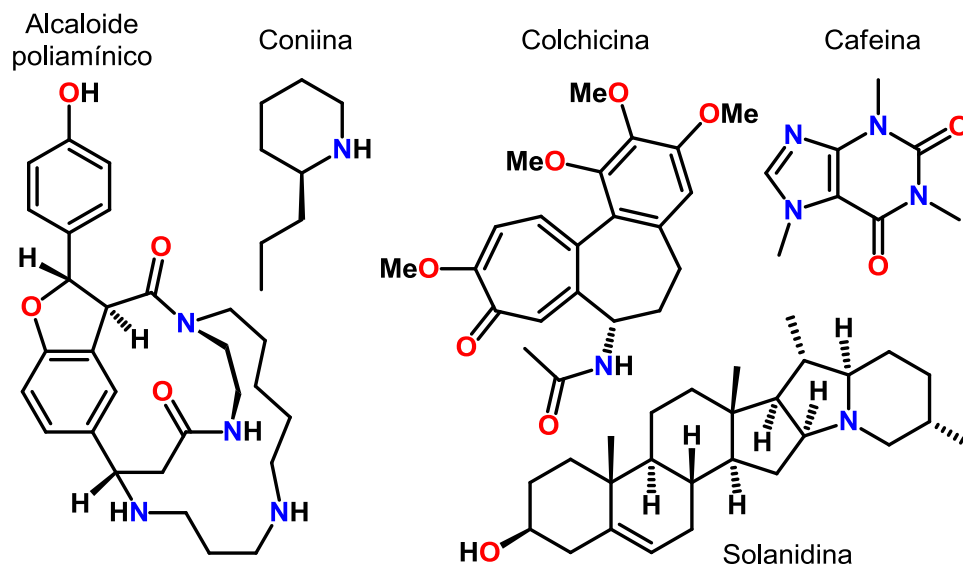


Figura 2 - Diversidade estrutural dos alcalóides

Os alcaloides isoquinolínicos são um dos grupos de compostos mais abundantes no reino vegetal. Os anéis isoquinolínico, tetrahydroisoquinolínico bem como o tetrahydroisoquinolínico 1- substituído, são estruturas comumente encontradas em uma variedade de produtos naturais e em compostos biologicamente ativos (AWUAH; CAPRETTA, 2010; AMAT et al., 2010; GRUNDON, 1976) (Figura 3).

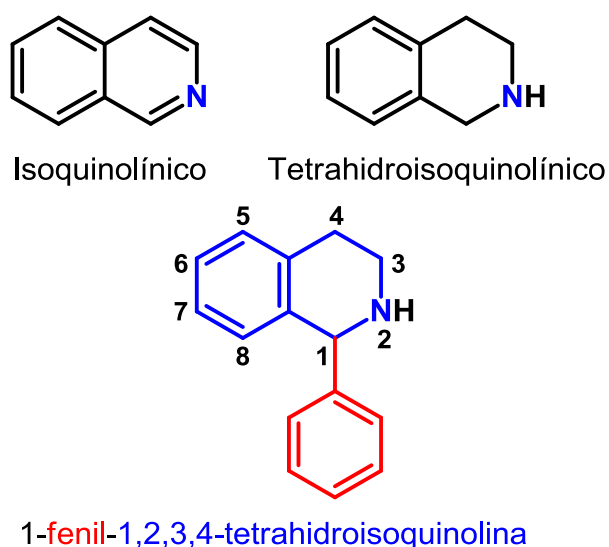


Figura 3 - Núcleos isoquinolínico, tetrahydroisoquinolínico e tetrahydroisoquinolínico 1- substituído

Alguns subgrupos mais importantes são as benzilisoquinolinas representadas pela papaverina, as isoquinolinas oxoaporfínicas representadas pela liriodenina, e as isoquinolinas azafluorantênicas representadas pela triclisisina (Figura 4).

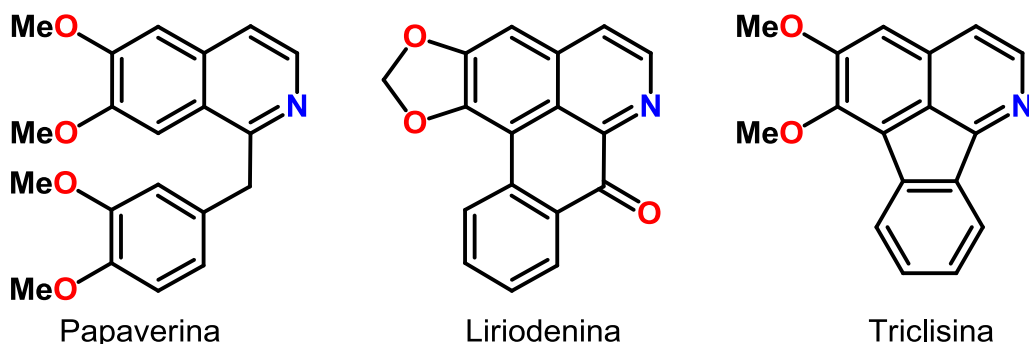


Figura 4 - Papaverina, liriodenina e triclisisina

Os alcaloides fenil tetrahydroisoquinolínicos criptostilina I, criptostilina II e criptostilina III (Figura 5), foram os primeiros alcaloides a serem isolados da natureza com o grupo fenil em C-1 (GRUNDON, 1976)

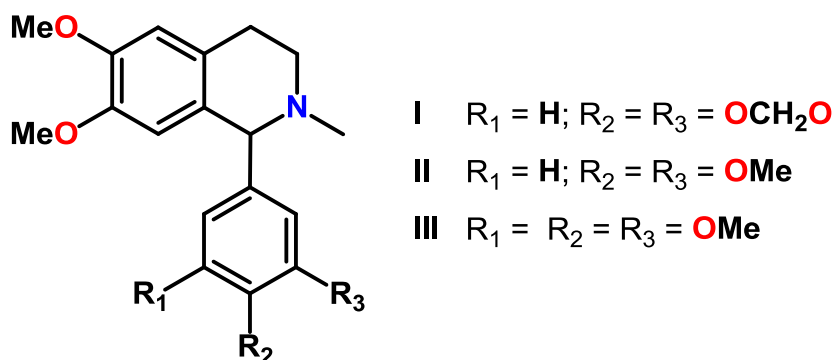
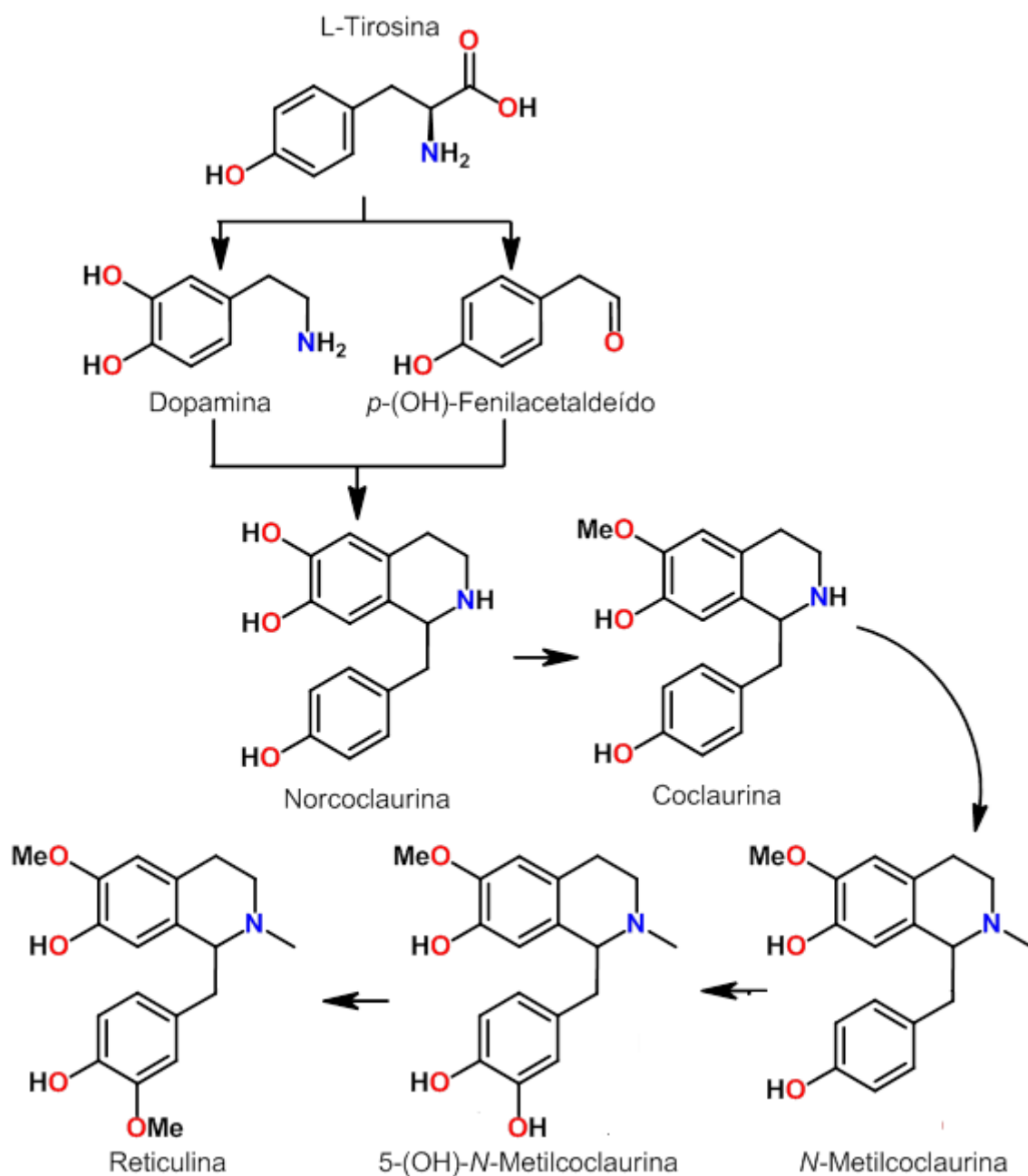


Figura 5 - Criptostilinas I, II, III,

A maioria dos alcaloides isoquinolínicos é derivada biossinteticamente dos benzilisoquinolínicos. O esquema 1 mostra a rota biossintética a partir de *L*-tirosina, para a formação da estrutura benzilisoquinolínica (DEWICK, 1997).



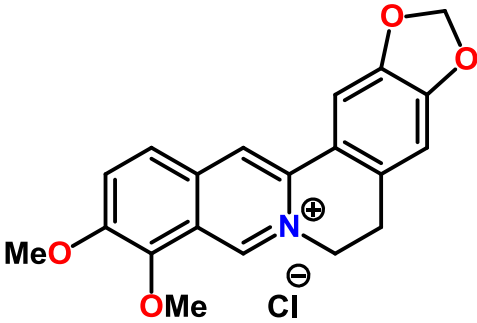
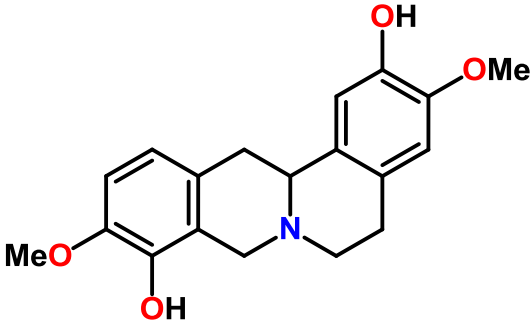
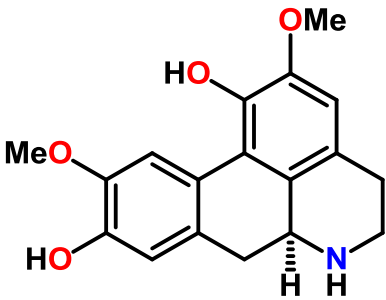
Esquema 1- Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir da L-tirosina (DEWICK,1997)

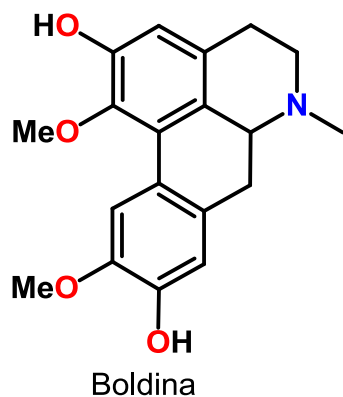
Atualmente estes alcaloides possuem numerosas aplicações na medicina como agentes terapêuticos (STÖCKIGT et al. 2011).

As Criptostilinas I-III foram isoladas a partir da *Cryptostylis fulva* e são de considerável significância biológica, numerosos análogos das criptostilinas têm sido estudados como antagonistas farmacológicos para o receptor D1 de dopamina (MUNCHHOF; MEYERS, 1995).

A tabela 1 a seguir apresenta mais exemplos, obtidos da literatura, de alcaloides isoquinolínicos com atividade farmacológica, alguns dos quais se tornaram medicamentos.

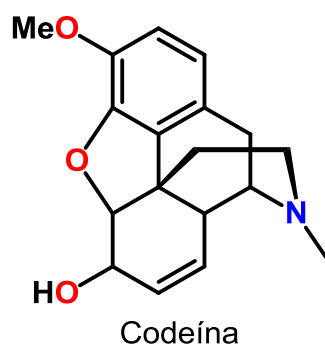
Tabela 1- Alcaloides isoquinolínicos que apresentam atividade farmacológica e biológica

Alcaloides	Atividade Farmacológica/ Biológica	Referências
 <p>Berberina</p>	Infecção nos olhos; dor de barriga; hipotensora; anti-inflamatória	(CORDELL; QUINN- BEATTIE; FARNSWORTH, 2001b; CHUN et al, 1979)
 <p>Discretamine</p>	Hipotensor	(SILVA et al., 2009)
 <p>Norisoboldina</p>	Anti-inflamatória	(LUO et al., 2010)

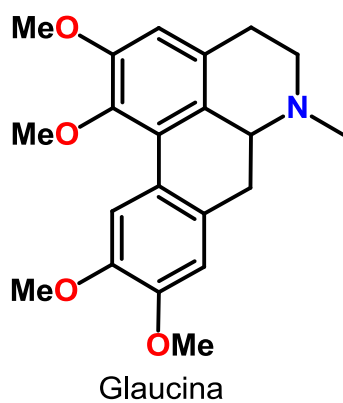


Estomacal

(CORDELL;
QUINN-
BEATTIE;
FARNSWORTH,
2001b)

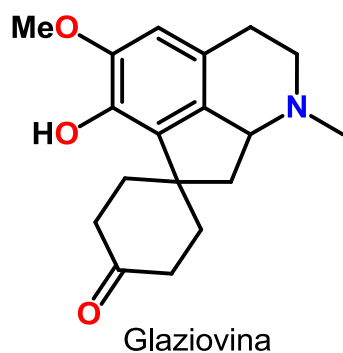
Antitussígeno e
analgésico

(CORDELL;
QUINN-
BEATTIE;
FARNSWORTH,
2001b)



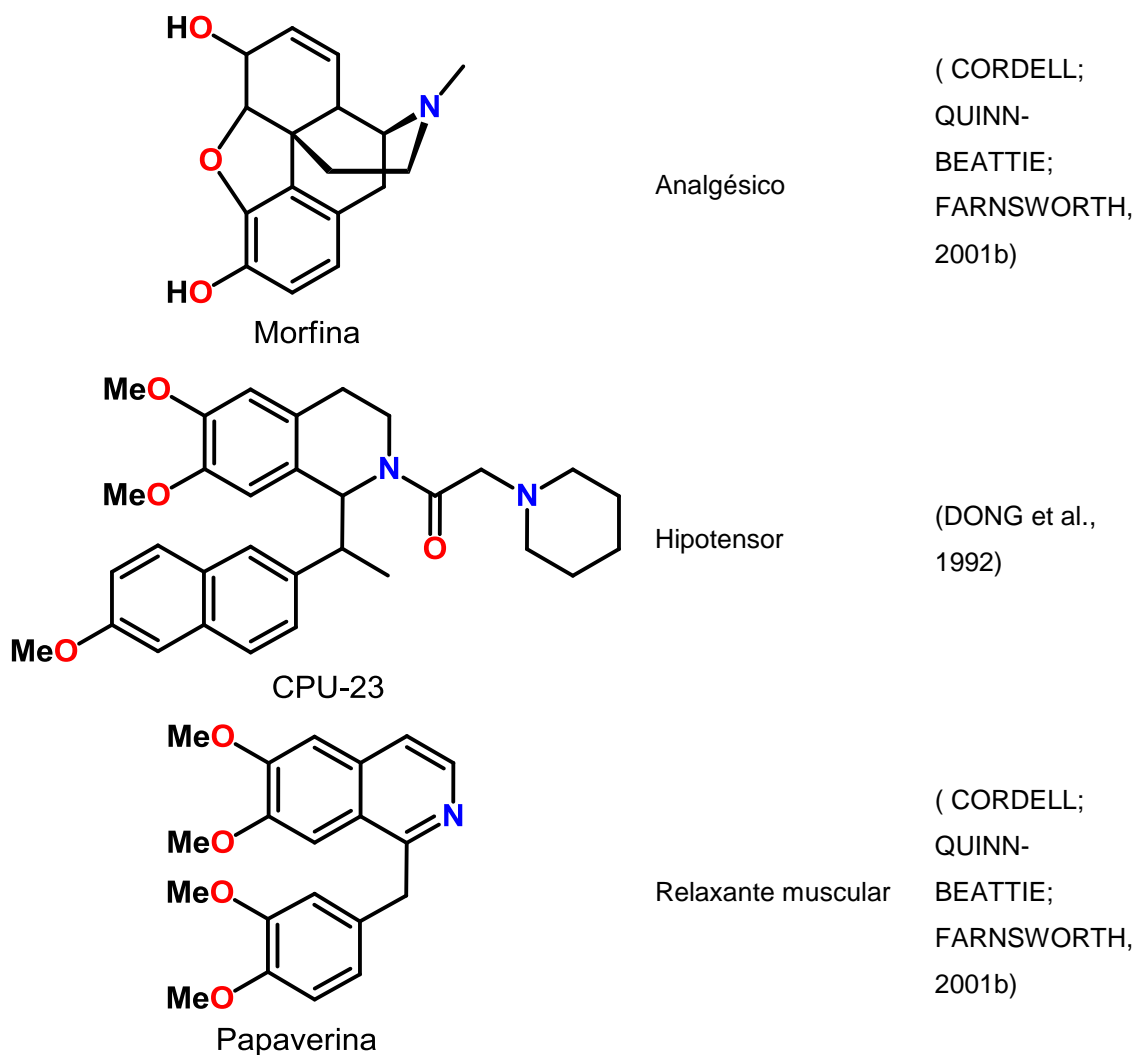
Antitussígeno

(CORDELL;
QUINN-
BEATTIE;
FARNSWORTH,
2001b)



Antidepressivo

(CORDELL;
QUINN-
BEATTIE;
FARNSWORTH,
2001b)



A importância destes produtos naturais na descoberta e inspiração de drogas é comprovada e, por conseguinte, a sua síntese é de interesse significativo (STÖCKIGT et al, 2011). Em particular, as tetrahydroisoquinolinas 1-substituídas, embora simples, são de grande interesse não apenas como alcalóides em si, mas também como intermediários chave, úteis na síntese de alcalóides mais complexos (AMAT et al., 2010).

3.1.1 Alcaloides Isoquinolínicos com atividade hipotensora

A discretamina (Tabela 1), alcalóide isoquinolínico isolado de *Duguetia magnolioidea* Maas, produziu hipotensão acompanhada de taquicardia em ratos normotensivos não anestesiados. O efeito hipotensor induzido por discretamina é provavelmente devido a uma vasodilatação periférica, pelo

menos, em parte, devido à liberação de NO a partir do endotélio vascular e ativação consequente de guanilil ciclase solúvel (GC) nas células musculares lisas vasculares (SILVA et al., 2009).

A Berberina (Tabela 1) é amplamente distribuída em várias famílias botânicas, tais como Berberidaceae e Papaveraceae, Fumaraceae, Menispermaceae, e muitas outras (PREININGER, 1986), a infusão intravenosa deste alcaloide isoquinolínico em ratos diminuiu a pressão sanguínea de maneira dose-dependente e o significativo efeito hipotensivo foi acompanhado por bradicardia (CHUN; YIP; LAU, 1979).

CPU-23 (1-{1-[(6-metoxi)-naft-2-il]}-propil-2-(1-piperidine)-acetil-6,7-dimetoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina) (Tabela 1), uma tetrahydroisoquinolina substituída derivada dos produtos de clivagem da tetrandrina (*bis*-benzil-tetrahydroisoquinolina), induziu hipotensão e bradicardia de maneira dose-dependente em ratos Sprague-Dawley, espontaneamente hipertensos e em ratos WKI pareados por idade, normotensos (DONG et al., 1992).

DL-Tetrahidropalmatina (Figura 6), um alcalóide encontrado nas plantas da espécie *Carydalis* quando administrado intravenosamente em ratos anestesiados induziu proporcional hipotensão, bradicardia e diminuição na liberação de serotonina hipotalâmica (5-HT) (CHUEH et al, 1995).

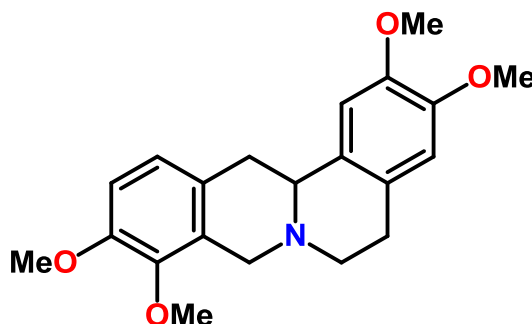


Figura 6 – Estrutura da DL-Tetrahidropalmatina

3.1.2 Alcalóides Isoquinolínicos com atividade anti-inflamatória

A Berberina (Tabela 1) (7, 8, 13, 13a-tetradecidro- 9,10-dimetoxi-2,3 metilenodioxi berberinium), inibe o nível de prostaglandina (PGE_2) e a expressão de cicloxigenase2 (COX2). Esta atividade anti-inflamatória foi evidente *in vitro* e *in vivo* (KUO; CHI; LIU, 2004).

Norisoboldina (Tabela 1), alcaloide isoquinolínico majoritário de *Radix Linderae*, as raízes secas de *Lindera aggregata* (família Lauraceae), inibe a ativação de macrófagos e a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias (LUO et al., 2010).

YS-51 (1-(β -naftilmetil)-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina) (Figura 7), alcaloide tetrahidroisoquinolínico sintético, inibe a expressão da enzima óxido nítrico sintase, e a produção de óxido nítrico, em osteoblastos (CHAEA et al., 2007).

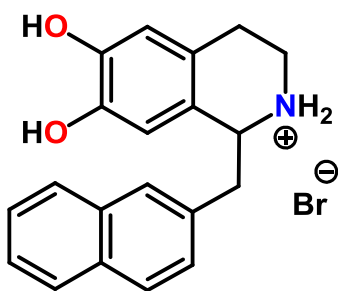


Figura 7 - Estrutura química de YS-51

3.2 Síntese de Isoquinolinas

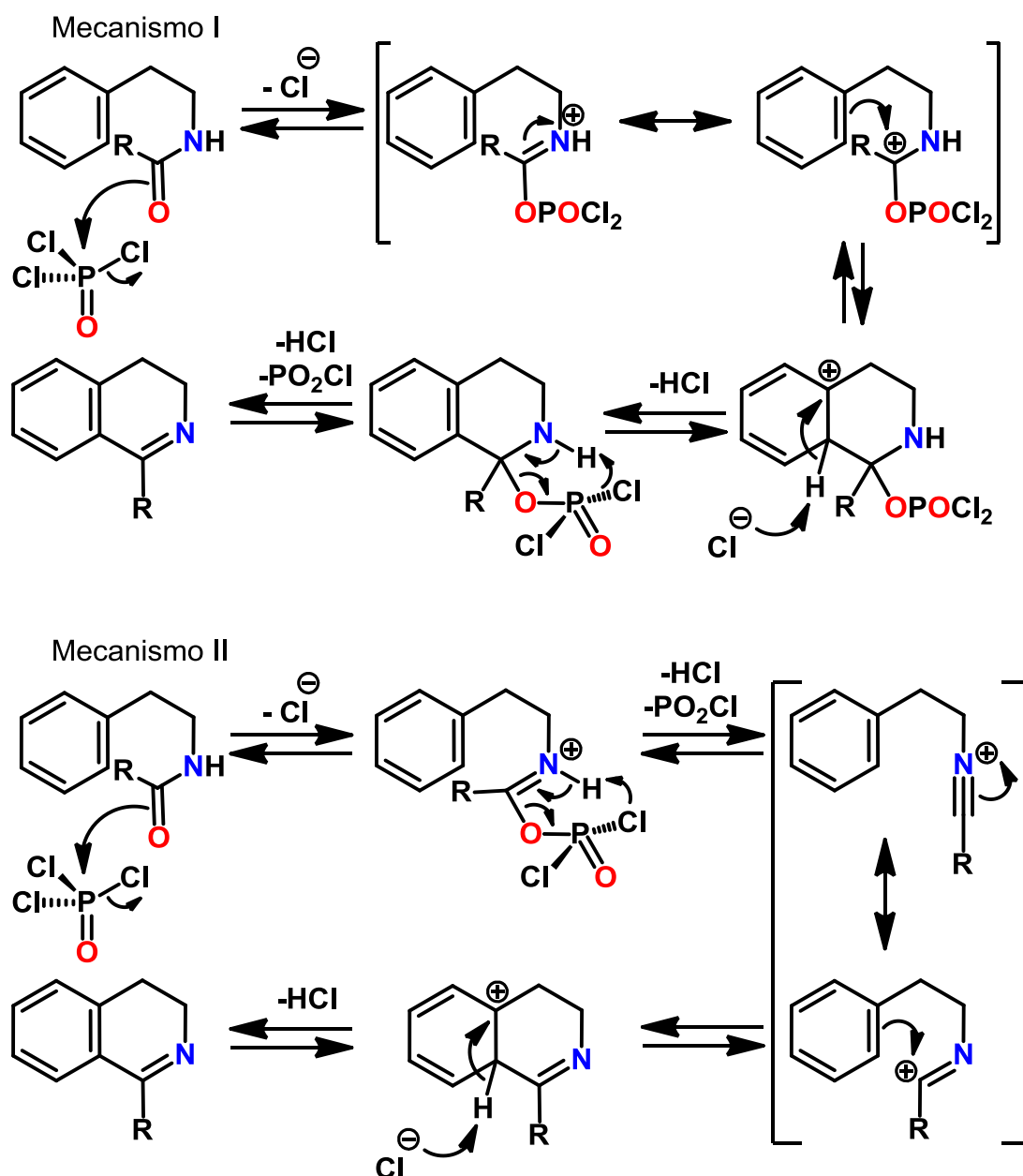
O acesso a este sistema heterocíclico tem envolvido historicamente a aplicação da reação de Bischler-Napieralski ou de Pictet-Spengler (AWUAH; CAPRETTA, 2010).

3.2.1 Reação de Bischler-Napieralski

A reação de Bischler-Napieralski (BISCHLER; NAPIERALSKI, 1893) tem sido utilizada na síntese total de diversos alcaloides isoquinolínicos, através do aquecimento de derivados acil da β -ariletilamina com pentóxido de fósforo ou outros agentes desidratantes, resultando na 3,4 dihidroisoquinolina

correspondente (BERGSTROM, 1944) que na maioria dos casos deve ser reduzida, pois a maior parte dos alcaloides isoquinolínicos são 1,2,3,4, tetrahydroisoquinolinas (CARVALHO, 1995).

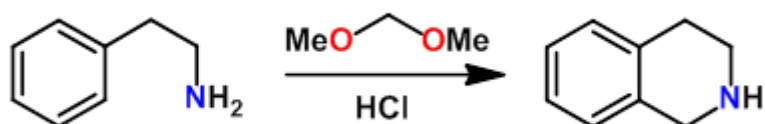
Dois mecanismos têm sido propostos para a reação de Bischler-Napieralski. O mecanismo I envolve um intermediário diclorofosforil imino-éster, enquanto o mecanismo II envolve um intermediário nitrílio iônico, ambos apresentados entre chaves (Esquema 2).



Esquema 2 - Mecanismo de ação da reação de Bischler-Napieralski

3.2.2 Reação de Pictet-Spengler (RPS)

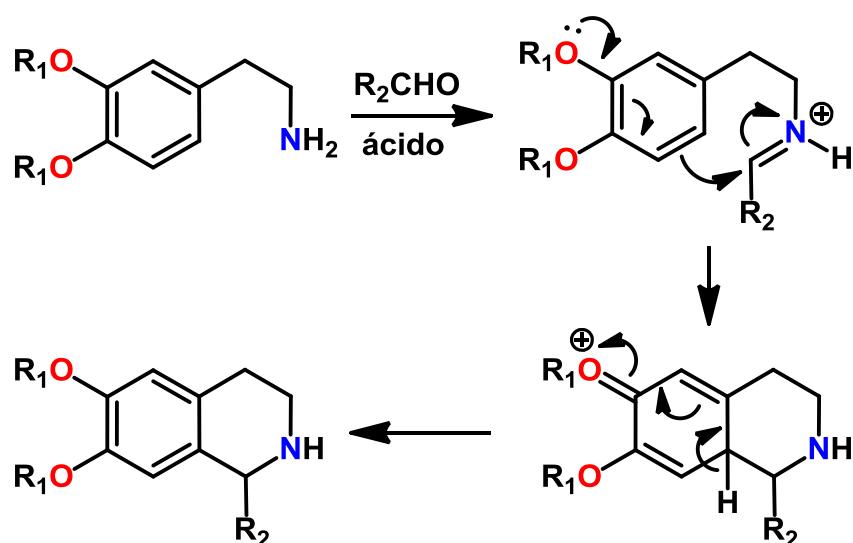
Em 1911, na Universidade de Genebra, os químicos Amè Pictet e Theodor Spengler aqueceram β -feniletilamina e o formaldeído dimeilacetal na presença de ácido clorídrico, os dois compostos foram submetidos a uma reação de cicloadição (PICTET; SPENGLER, 1911).



Esquema 3 - Ciclização realizada por Amè Pictet e Theodor Spengler

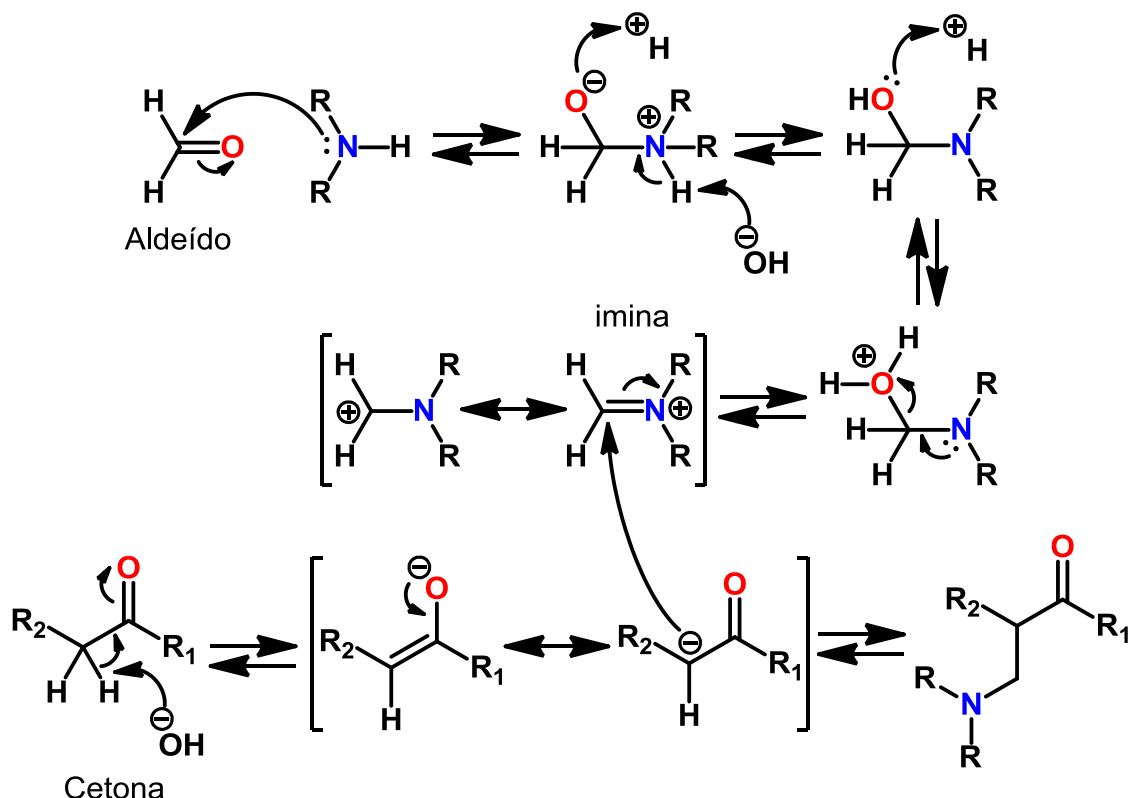
O novo produto formado foi o alcaloide 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina. A reação foi nomeada reação de Pictet-Spengler (RPS), e agora é uma reação utilizada para a síntese de uma grande variedade de compostos heterocíclicos. Em 2011, a RPS comemorou 100 anos de sucesso nos laboratórios químicos. Durante este longo período, até os dias de hoje, tornou-se uma das estratégias sintéticas mais bem sucedidas, especialmente dirigida para a síntese de isoquinolinas e alcalóides indólicos (STÖCKIGT et al., 2011).

O mecanismo da RPS envolve dois passos fundamentais (Esquema 4):



Esquema 4 - Mecanismo de ação Reação de Pictet – Spengler

- 1) Primeiro a condensação de uma β -feniletilamina com compostos carbonílicos alifáticos ou aromáticos, sob catálise ácida para gerar uma imina, este passo envolve uma reação do tipo Mannich (MANNICH; HEILNER, 1922) sendo esta uma das metodologias sintéticas mais importantes para formar ligações carbono-carbono entre uma cetona enolizável, um aldeído e uma amina secundária em meio ácido, o que a torna de especial importância na síntese de alcaloides indólicos e isoquinolínicos. Um dos mecanismos aceitos para a reação de Mannich é mostrado no Esquema 5, primeiro ocorre a reação entre o aldeído e a amina em meio ácido, levando à formação de um íon imínio intermediário. Em condições ácidas, a cetona enolizável encontra-se em equilíbrio com seu tautômero enólico, que é suficientemente nucleofílico para atacar o íon imínio, formando o íon oxônio. O equilíbrio seguinte (uma reação ácido-base de Bronsted) favorece o sal de amônio do composto β -aminocarbonílico (VIEIRA, 2006).



Esquema 5 - Mecanismo de ação da reação do tipo Mannich

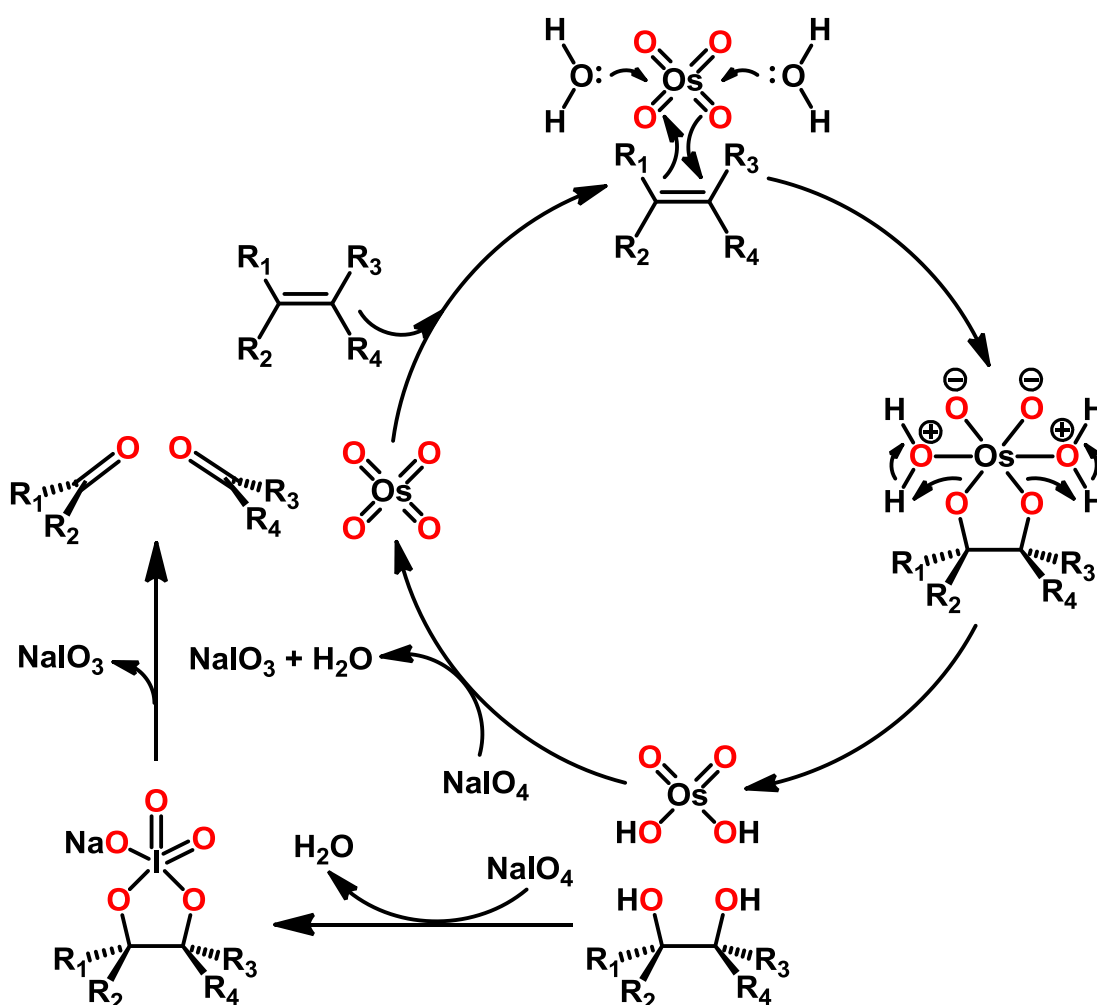
- 2) O segundo passo consiste na ciclização, por substituição eletrofílica aromática, sob catálise ácida do cátion imínio resultante, para gerar a 1,2,3,4 tetrahydroisoquinolina.

A RPS é usualmente executada em um solvente aprótico e na presença de um catalisador ácido, prossegue mais facilmente quando o anel aromático da feniletilamina é ativado por um substituinte doador de elétron (QUEVEDO; BAQUERO; RODRIGUEZ, 2010), pois estes aumentam a densidade eletrônica do anel aromático favorecendo o ataque nucleofílico ao intermediário imínio. Também tem sido proposto que o uso de um catalisador e de um agente desidratante aumenta o rendimento e a regiosseletividade da reação. Nenhuma relação foi estabelecida entre o pH da reação e o rendimento ou regiosseletividade (VANDEN EYNDEN; STAMBULI, 2008).

As condições suaves e os bons rendimentos faz com que esta reação seja amplamente utilizada na síntese de uma grande variedade de 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinas (VIEIRA, 2006).

3.3 Oxidação de Lemieux-Johnson

Esta reação foi relatada pela primeira vez por Lemieux e Johnson em 1956 (PAPPO et al, 1956). Trata-se da conversão de olefinas em dois aldeídos individuais por meio de uma clivagem oxidativa de uma ligação dupla carbono-carbono com tetróxido de ósmio e periodato de sódio (Esquema 6), esta combinação de reagentes é referida como reagente de Lemieux-Johnson (WANG, 2010). O tetróxido de ósmio é utilizado em quantidades catalíticas, durante a reação ele é constantemente reoxidado pelo periodato de sódio (SANTOS; MAGALHÃES 1991).



Esquema 6 - Mecanismo de ação Reação de Lemieux-Johnson

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os materiais de partida das rotas sintéticas e todos os reagentes utilizados no decorrer do trabalho foram obtidos comercialmente através de diversas empresas fornecedoras Merck, Vetec, Aldrich, Fluka etc.

As reações foram realizadas sob agitação magnética através de barras magnéticas recobertas com teflon e placas agitadoras magnéticas com aquecimento e sob refluxo utilizando manta aquecedora, e coluna de Vigreux.

Os solventes foram removidos em rotaevaporadores sob pressão reduzida e o solvente residual, em dessecador contendo sílica gel acoplado à bomba de vácuo.

A purificação dos compostos foi realizada por cromatografia de adsorção em coluna (CC) utilizando como fase estacionária, sílica gel 60, ART 7734 da *MERCK*, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. O acompanhamento reacional foi realizado através de cromatografia analítica em camada delgada (CCDA), em cromatofolhas com sílica gel 60 F₂₅₄ suportada em placa de alumínio *MERCK* (com revelador para UV e espessura de 0,2 mm). A visualização dos compostos ocorreu através dos seguintes reveladores: $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4/(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (0,2/0,5/1,2/18,8), 0,5% de dinitrofenilhidrazina em HCl 2M e/ou pela exposição das placas à lâmpada de irradiação ultravioleta com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C) uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro MERCURY-VARIAN (LMCA/UFPB) operando a 200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C) e VARIAN- NMR-SYSTEM (LMCA/UFPB) operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-as em clorofórmio deuterado (CDCl_3) da *MERCK*. Os

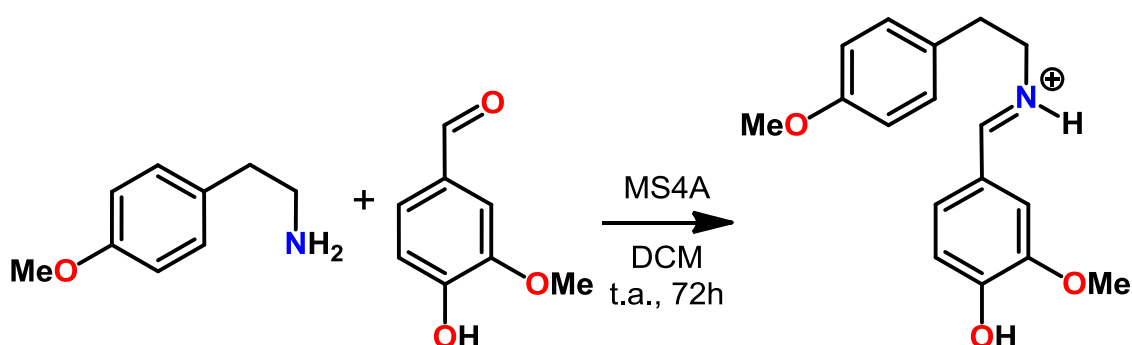
deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas do solvente clorofórmio ($\delta_{\text{H}} = 7,24$ ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados, clorofórmio ($\delta_{\text{C}} = 77,00$ ppm).

As multiplicidades das bandas de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *d* (duplete), *t* (triplete), *m* (multiplete).

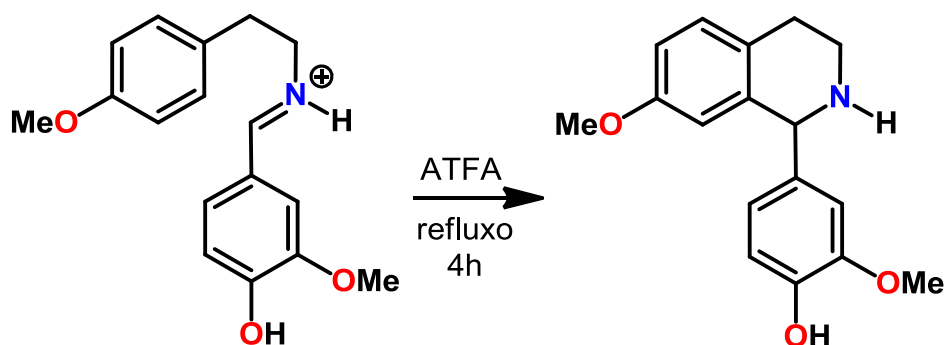
4.2 Métodos

4.2.1 Síntese dos alcaloides feniltetrahydroisoquinolínicos

4.2.1.1 Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydro isoquinolina.



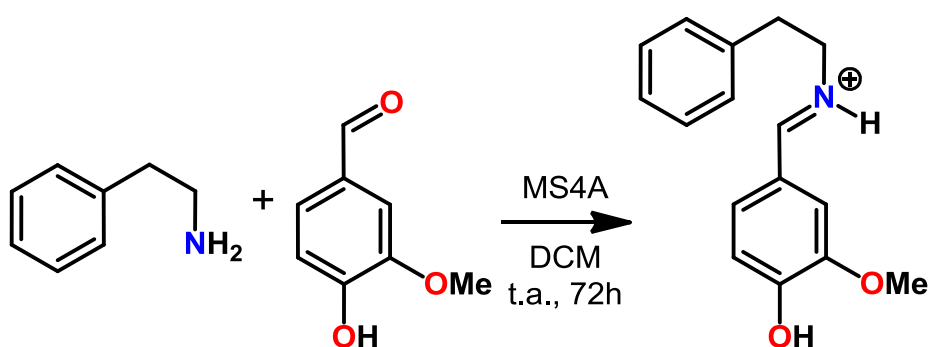
Em balão de fundo redondo de 50mL, seco, equipado com agitação magnética, colocou-se DCM recém destilado (15mL), adicionou-se peneira molecular 4Å (2g), 4-metoxifeniletilamina (2g; 13,22 mmol) e vanilina (2g; 13,14mmol), deixou-se sob agitação durante 72h. Filtrou-se com celite, lavou-se com DCM e concentrou-se em rotaevaporador obtendo-se o composto intermediário.



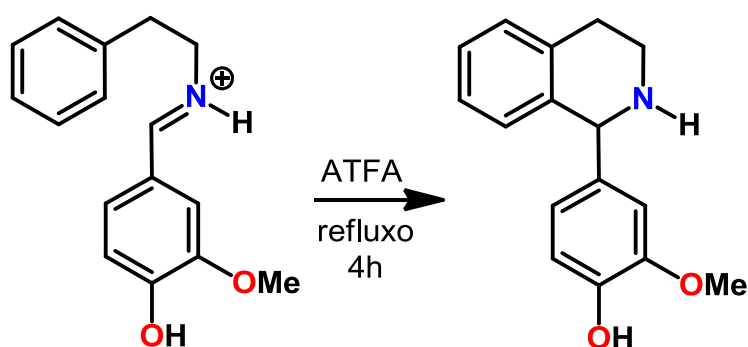
Ao composto intermediário obtido anteriormente, adicionou-se 15 mL de ATFA e deixou-se sob refluxo durante 4h. A reação foi diretamente submetida a cromatografia em coluna “Flash” (eluente: hexano/EtOAc/dietilamina 6:4:0,4), posteriormente foi realizada nova purificação em cromatografia em coluna “Flash” (eluente: hexano/EtOAc/dietilamina 4:1:0,1) levando a obtenção de 3,5 g do alcaloide (93,45% de rendimento), um líquido oleoso amarelado.

CCD: $R_f = 0,76$ (EtOAc/hexano 35%; revelador: cério/molibdico e irradiação ultravioleta)

4.2.1.2 Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina.



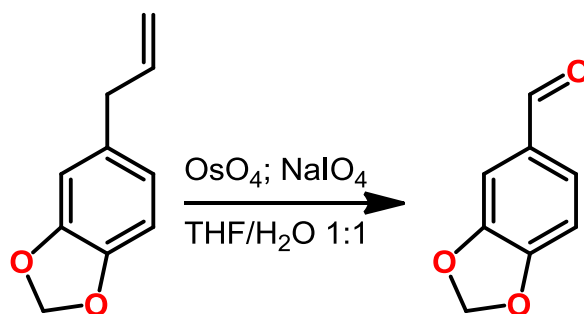
Em balão de fundo redondo de 50mL, seco, equipado com agitação magnética, colocou-se diclorometano previamente seco (15mL), adicionou-se peneira molecular 4 Å (2g), feniletilamina (2,1g; 17,33mmol) e vanilina (2,03g; 13,34mmol), deixou-se sob agitação durante 72h. Filtrou-se com celite, lavou-se com DCM e concentrou-se em rotaevaporador obtendo-se o composto intermediário.



Ao composto intermediário obtido anteriormente, adicionou-se 15 mL de ATFA e deixou-se sob refluxo durante 4h. A reação foi diretamente submetida a cromatografia em coluna “Flash” (eluente: hexano/EtOAc/dietilamina 88:10:2), posteriormente foi realizada nova purificação em cromatografia em coluna “Flash” (eluente: hexano/EtOAc/dietilamina 95:5:1) levando a obtenção de 3,5 g do alcaloide (93,45% de rendimento), um líquido oleoso amarelado.

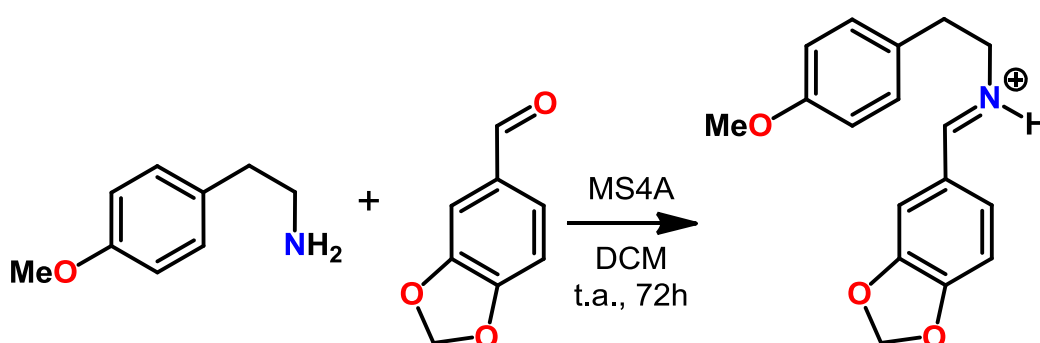
CCD: $R_f = 0,42$ (EtOAc/hexano 35%; revelador: cério/molibdico e irradiação ultravioleta)

4.2.1.3 Síntese da 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina.



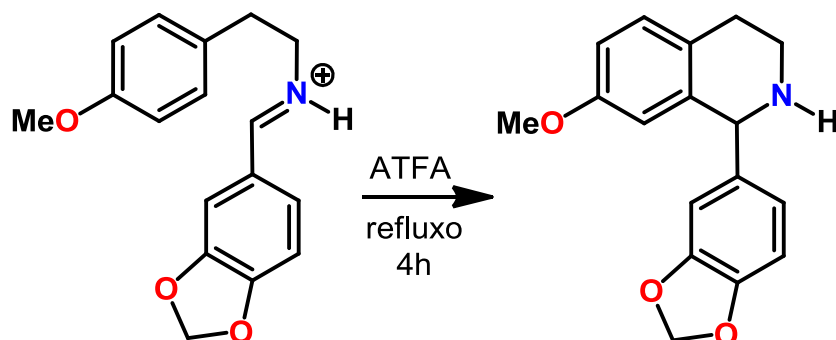
Em balão de 250 mL equipado com agitação magnética, colocou-se 0,5g de safrol (0,5g; 3,08mmol), NaIO_4 (3,6g) e de THF:H₂O 50% (100mL), agitou-se até completa dissolução. Adicionou-se OsO_4 à 0,4% (0,5mL), e a mistura permaneceu sob agitação por 48h. Adicionou-se solução supersaturada de tiosulfato de sódio até a reação ficar límpida, o THF foi evaporado em rotaevaporador, foram adicionados 200 mL de solução supersaturada de NaCl e foi realizada a extração em ampola de separação com EtOAc. As fases orgânicas foram combinadas e tratadas com Na_2CO_3 e concentrada em rotaevaporador.

CCD: $R_f = 0,54$ (EtOAc/hexano 0,5%; revelador: DNP 0,5%)



Em balão de fundo redondo de 50mL, seco, equipado com agitação magnética, colocou-se diclorometano previamente seco (15mL), adicionou-se peneira molecular 4Å (0,7g), 4-metoxifeniletilamina (0,5g; 3,33 mmol) e a

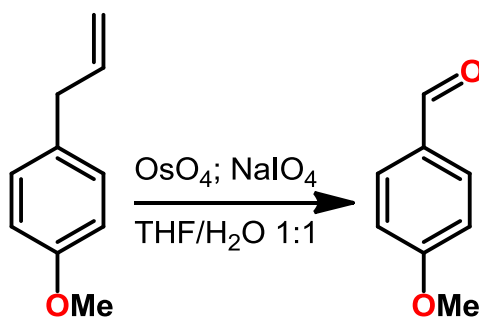
substância obtido anteriormente (0,5g; 3,33mmol), deixou-se sob agitação durante 72h. Filtrou-se com celite, lavou-se com DCM e concentrou-se em rotaevaporador obtendo-se o composto intermediário.



Ao composto intermediário obtido anteriormente, adicionou-se 15 mL de ATFA e deixou-se sob refluxo durante 4h. A reação foi diretamente submetida a cromatografia em coluna “Flash” (eluente: hexano/EtOAc/dietilamina 97:2:1), levando a obtenção de 0,5 g do alcaloide (50% de rendimento), um líquido oleoso amarelado.

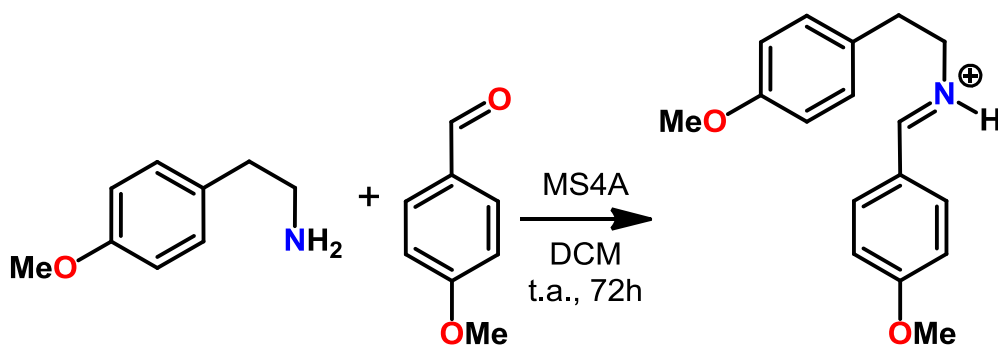
CCD: $R_f = 0,75$ (EtOAc/hexano 35%; reveladores: cério/molibdico e irradiação ultravioleta)

4.2.1.4 Síntese da 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina.

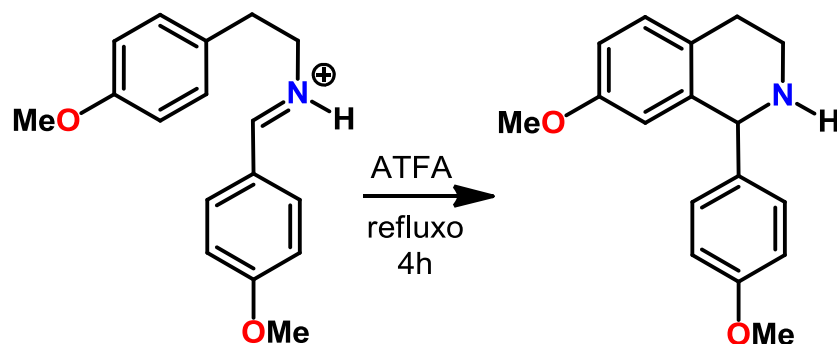


Em balão de 250 mL equipado com agitação magnética, colocou-se 0,5g de estragol (0,5g; 3,37mmol), NaIO_4 (3,6g) e de THF:H₂O 50% (100mL), agitou-se até completa dissolução. Adicionou-se OsO_4 à 0,4% (0,5mL), e a mistura permaneceu sob agitação por 48h. Adicionou-se solução supersaturada de tiosulfato de sódio até a reação ficar límpida, o THF foi evaporado em rotaevaporador, foram adicionados 200 mL de solução supersaturada de NaCl e foi realizada a extração em ampola de separação com EtOAc. As fases orgânicas foram combinadas e tratadas com Na_2CO_3 e concentradas em rotaevaporador.

CCD: $R_f = 0,54$ (EtOAc/hexano 1%; revelador: DNP 0,5%)



Em balão de fundo redondo de 50mL, seco, equipado com agitação magnética, colocou-se diclorometano previamente seco (15mL), adicionou-se peneira molecular 4Å (0,7g), 4-metoxifeniletilamina (0,5g; 3,33 mmol) e o composto obtido anteriormente (0,5g; 3,65mmol), deixou-se sob agitação durante 72h. Filtrou-se com celite, lavou-se com DCM e concentrou-se em rotaevaporador obtendo-se o composto intermediário.



Ao composto intermediário obtido anteriormente, adicionou-se 15 mL de ATFA e deixou-se sob refluxo durante 4h. A reação foi diretamente submetida a cromatografia em coluna “Flash” (eluente: hexano/EtOAc/dietilamina 97:2:1), levando a obtenção de 0,5 g do alcaloide (50% de rendimento), um líquido oleoso amarelado.

CCD: $R_f = 0,75$ (EtOAc/hexano 35%; reveladores: cério/molibdico e irradiação ultravioleta)

4.2.2 Ensaios Biológicos

4.2.2.1 Estudo da atividade anti-inflamatória de MTHP

*Este ensaio foi realizado por Renata Marcia Costa Vasconcelos aluna do laboratório de Imunofarmacologia orientanda da Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam.

Peritonite induzida por zimosan

O modelo de inflamação peritoneal induzida por zimosan permite analisar a migração celular no sítio inflamatório, bem como a produção e liberação de mediadores da inflamação no fluido peritoneal.

Camundongos ($n=6$) foram tratados, via oral, 1h antes do estímulo inflamatório, com 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidro isoquinolina (MTHP) (2,5 mg/kg) ou droga controle (AAS 200 mg/kg), além de um grupo controle não tratado. Decorrido o intervalo de 1h, a peritonite foi

induzida pela injeção intraperitoneal (I.P.) de 500 μ L de uma suspensão de zimosan 2 mg/mL em solução salina 0,9% (DOHERTY *et al.*, 1985; KOLACZKOWSKA *et al.*, 2010). O grupo basal foi previamente tratado com solução salina 0,9% e recebeu injeção de 500 μ L de solução salina I.P., servindo como controle da eficácia na indução da inflamação.

Quatro horas após a injeção do zimosan, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o peritônio exposto para a obtenção do lavado peritoneal com a injeção de 1 mL de PBS gelado, seguido de 1 min de massagem e coleta do exsudato contendo fluidos e leucócitos. As amostras foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas (1200 rpm, 10 min, 4° C). Os sobrenadantes coletados e armazenados a -20° C foram utilizados para dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10). As células sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de PBS gelado, diluídas em solução de Turk na proporção de 1:40 e contadas em microscopia óptica, com ajuda de hemocítômetro.

Após a contagem e determinação do número de células totais, uma alíquota contendo $1,5 \times 10^6$ células de cada amostra foi adicionada a 3 mL de PBS (4° C) e centrifugada (1200 rpm, 10 min, 4° C). Após esta lavagem, o sobrenadante foi descartado e, para impedir ligações inespecíficas, as células foram mantidas na presença de 2 μ L de soro de camundongo diluído (1:100) por 5 min. Posteriormente as células foram incubadas com os anticorpos anti-MAC-3 e anti-GR-1, diluídos conforme recomendação do fabricante. Decorridos 30 min de incubação, as células foram novamente diluídas em 1 mL de PBS e centrifugadas (1200 rpm, 10 min, 4° C); o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 300 μ L de PBS e levadas ao citômetro de fluxo para análise diferencial por tamanho e granulosidade e por fluorescência. Para obtenção dos dados, foi utilizado o software CellQuest para Macintosh (BD Biosciences™).

4.2.2.2 Efeito de MTHP no sistema cardiovascular de ratos normotensos

*Estes ensaios foram realizado por Leônidas das Graças Mendes Júnior aluno do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão orientando do Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga.

Para realização dos protocolos experimentais foram empregadas metodologias *ex vivo* e *in vivo*, desenvolvidas no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão e no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso de 250-300g provenientes do Biotério Prof. George Thomas, mantidos sob condições controle de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (6 - 18 horas), tendo livre acesso à água e alimentação (ração-Purina®).

Foram utilizadas as seguintes drogas: fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (Ach), N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), (1H-(1,2,4-)oxadiazolo (4,3-a)-quinoxalin-1-one (ODQ) e indometacina (INDO), todos da Sigma-Aldrich Brasil®. A droga teste foi a 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydro isoquinolina.).

A indometacina foi dissolvida juntamente com o bicarbonato de sódio a 5 % em água destilada e o ODQ foi dissolvido com o Dimetilsulfóxido (DMSO). As demais soluções foram dissolvidas em água destilada.

Nos protocolos *ex vivo* foram utilizadaS a soluções nutritiva Tyrode aerada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2), o pH mantido em torno de 7,4 e temperatura de 37°C . Para a preparação das soluções nutritivas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) , cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), todos da Sigma-Aldrich Brasil®.

Na confecção dos cateteres, utilizados nos protocolos *in vivo*, foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 - 0,61 mm, respectivamente) de 4 cm para o cateter arterial e 2,5 cm para o cateter

venoso, soldados por aquecimento a tubos de polietileno PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 - 0,96 mm, respectivamente) de 22 cm. Após a canulação, os cateteres foram preenchidos com solução salina (0,9%) + 500 UI de heparina e a extremidade PE-50 de cada cateter foram obstruída com pino de metal.

Os resultados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Foi aplicado o teste *t* de Student ou a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), foi utilizado o pós-teste de Tukey pareado para múltiplas comparações. O nível de significância foi fixado com $p < 0,05$.

4.2.2.2.1 Medida direta de pressão arterial (PA) em ratos normotensos não anestesiados

Os ensaios *in vivo* foram realizados para obtenção de medidas de pressão arterial (PA) em animais não anestesiados e com livre movimentação após administração de doses randômicas de maneira intravenosa da droga em estudo.

Inicialmente os animais foram anestesiados com uma combinação de cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, IP, respectivamente) e submetidos a um procedimento cirúrgico para implantação dos cateteres na aorta abdominal e na veia cava caudal, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal.

A PA foi medida 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do caráter arterial a um transdutor de pressão. As alterações de pressão foram registradas no sistema PowerLab™ de aquisição de dados (LabTrax 2-24T, World Precision Instruments, Sarasota, Flórida, EUA) conectado a um computador processando o software DataTrax 2 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA).

4.2.2.2.2 Efeito de MTHP sobre a pressão arterial em ratos normotensos não anestesiados.

Para a obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimação por um período de no mínimo 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida foi administrado nitroprussiato de sódio (NPS) (10 µg/Kg, i.v.), um clássico doador de óxido nítrico, para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 minutos, doses crescentes de MTHP foram administradas, de forma randômica com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores basais. Os valores de PAM foram computados antes e após a administração da droga, e suas variações foram expressas como Δ (delta) da PAM.

4.2.2.2.3 Ensaios farmacológicos utilizando anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato

Os animais foram eutanasiados, foi realizada a identificação da artéria mesentérica cranial, esta foi retirada através de uma laparotomia e seccionada em anéis de 1-2 mm. Os anéis livres de tecido conectivo e adiposo foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode (TANAKA et al., 1999), a 37 °C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Para o registro das tensões isométricas os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado ao sistema de aquisição PowerLab™ de aquisição de dados (software versão 4.2, ADInstruments, MA, EUA). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de estabilização de 60 minutos. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos para prevenir a produção de metabólitos indesejáveis (ALTURA; ALTURA, 1970).

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis pré-contraídos com 10 µM fenilefrina (FEN) após adição de 10 µM de acetilcolina (ACh). Os anéis com relaxamento superior a 90 % sobre a pré-contracção com FEN foram considerados com endotélio funcional (E+). Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10 % foram considerados sem endotélio

funcional (E-). Os anéis sem endotélio funcional foram obtidos através do atrito entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal.

- Efeito de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contráídos com fenilefrina (10 μ M)

Após um período de 60 minutos de estabilização de uma segunda contração induzida por FEN, foram aplicadas concentrações cumulativas e crescentes de MTHP (1 pM – 1 mM) para obtenção de uma curva concentração-resposta. Os efeitos foram avaliados em anéis com o endotélio funcional e anéis com o endotélio removido, em ambas as preparações a concentração de FEN (1 nM - 10 μ M) foi ajustada para obtenção de contrações de magnitude semelhante.

- Efeito de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).

Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, foi adicionado de MTHP (1 pM – 1 mM) de maneira cumulativamente e crescente aos anéis pré-contráídos com solução de Tyrode KCl 60 mM. O aumento na concentração de potássio de 4 mM para 60 mM foi obtido junto com a redução na concentração milimolar de sódio afim de manter a equimolaridade.

- Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na resposta induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato.

Após a verificação da presença do endotélio conforme descrito anteriormente, as preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos foram incubadas por 30 minutos com 100 μ M de N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), um inibidor competitivo da sintase do óxido nítrico (REES et al., 1990; MONCADA et al., 1991). Após este período, uma contração tônica com FEN (1 nM - 10 μ M) foi obtida e após um período de estabilização de 60 minutos, na fase tônica (platô) desta curva, foi administradas concentrações crescentes da MTHP (1 pM – 1 mM).

- Avaliação da participação da enzima Guanilil Ciclase na resposta vasorelaxante induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato.

Preparações de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato, com endotélio intacto foram incubadas por 30 minutos com ODQ (10 μ M), um inibidor da enzima guanilil ciclase (GARTHWAITE et al, 1995). Após este período, uma contração tônica com FEN (1 nM - 10 μ M) foi obtida e concentrações crescentes e cumulativas de MTHP (1 pM – 1 mM) foram adicionadas ao banho.

- Análise do efeito através da inibição das cicloxigenases sobre a resposta vasorelaxante induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato.

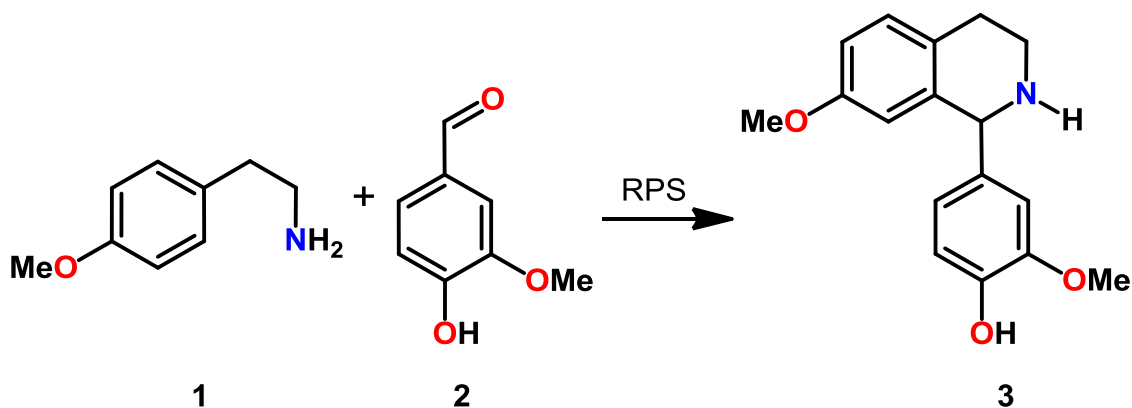
Conforme mencionado, após a verificação da integridade do endotélio, os anéis de artéria mesentérica superior foram pré-incubados com indometacina 10 μ M (inibidor não específico das ciclooxigenases) (CLARK; FUCHS, 1997), durante 30 minutos. Após este período, uma contração tônica de FEN (1 nM - 10 μ M) foi obtida e concentrações crescentes e cumulativas de MTHP (1 pM – 1 mM) foram adicionadas ao banho.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos alcaloides fenil tetrahydroisoquinolínicos

Focamos nossa atenção inicial no desenvolvimento e adaptação de um protocolo apropriado para a ciclização de β -ariletilaminas, passo fundamental na obtenção de alcaloides isoquinolínicos. Este passo é realizado através da aplicação da reação de Bischler-Napieralski ou de Pictet-Spengler. Após pesquisar diversos protocolos nos inspiramos no de Cheng *et. al.* por descrever uma metodologia passível de ser executada em nossa realidade laboratorial, a qual aplica a reação de Pictet-Spengler, conforme item 4.2.1.1. A princípio utilizamos como matéria prima a 4-metoxifeniletilamina (**1**) e a vanilina (**2**), reagentes comercialmente disponíveis e cujo produto previsto seria uma isoquinolina inédita, a 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina (**3**) (Esquema 7).



Esquema 7 - Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina (**3**)

O produto da reação foi o esperado, obtido com excelente rendimento (93,45%), apresentou-se na forma de um líquido oleoso de coloração amarelo claro.

A caracterização deste composto inédito se deu através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional.

A análise espectral de RMN ^{13}C , utilizando a técnica APT (Figura 8; Tabela 2) permitiu observar a presença de dezessete sinais de carbonos. Destes sinais, seis foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, sete a carbonos metínicos, dois a carbonos metoxílicos e dois metilênicos, compatíveis com o produto esperado da reação.

O espectro de RMN ^1H e suas expansões (Figura 9 e 10; Tabela 2), mostraram absorções na região de aromático apresentando um conjunto de sinais, contendo dois duplos dupletos em δ_{H} 6,817 e δ_{H} 6,500 com acoplamento *orto* ($J= 8,5$ e $8,0$ Hz) e *meta* ($J= 2,5$ Hz), dois dupletos em δ_{H} 7,091 e δ_{H} 6,766 com acoplamento *orto* ($J= 8,5$ e $8,0$ Hz) e dois dupletos em δ_{H} 6,914 e δ_{H} 6,537 ($J=2,5$ Hz) mostrando acoplamento *meta*, referente aos dois anéis aromáticos trissubstituídos; sendo que um faz parte do núcleo 1,2,3,4 tetraisoquinolínico e o outro é o substituinte fenil deste núcleo na posição 1. Na mesma região apareceu um simpleto largo em δ_{H} 6,714, referente ao hidrogênio α -nitrogênio, sinal confirmado através do espectro HMQC (Figura 13) que mostrou correlação com o carbono metínico em 56,798 que juntamente com os quatro multipletos em δ_{H} 3,436-3,498, δ_{H} 3,885-3,934, δ_{H} 2,977-3,047, δ_{H} 2,787-2,827 referentes aos quatro hidrogênios metilênicos e com o grupamento fenil completam o núcleo 1,2,3,4 tetraisoquinolínico. Foi possível observar também a presença de metoxilas aromáticas em δ_{H} 3,700 e δ_{H} 3,815, completando assim a estrutura do composto 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (**3**).

Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)

C	(δ_{C} ppm)	(δ_{H} ppm)
1	56,798	6,714(1H,s)
2	39,270	3,436-3,498 (1H, <i>m</i>) 3,885-3,934 (1H, <i>m</i>)
3	28,300	2,977-3,047 (1H, <i>m</i>) 2,787-2,827 (1H, <i>m</i>)
4	125,500	-
5	129,772	7,091 (1H, J=8,5, <i>d</i>)
6	114,542	6,817 (<i>dd</i> , J=8,5Hz e J=2,5Hz, 1H)
7	158,112	-
8	112,918	6,537 (1H, J=2,5, <i>d</i>)
9	134,547	-
1'	132,828	-
2'	111,559	6,914 (1H, J=2,5, <i>d</i>)
3'	146,719	-
4'	145,670	-
5'	113,924	6,766 (1H, J=8,0, <i>d</i>)
6'	122,110	6,500 (<i>dd</i> , J=8,0Hz e J=2,5Hz, 1H)
OCH_3 -7	55,316	3,700 (3H,s)
OCH_3 -5'	55,968	3,815 (3H,s)

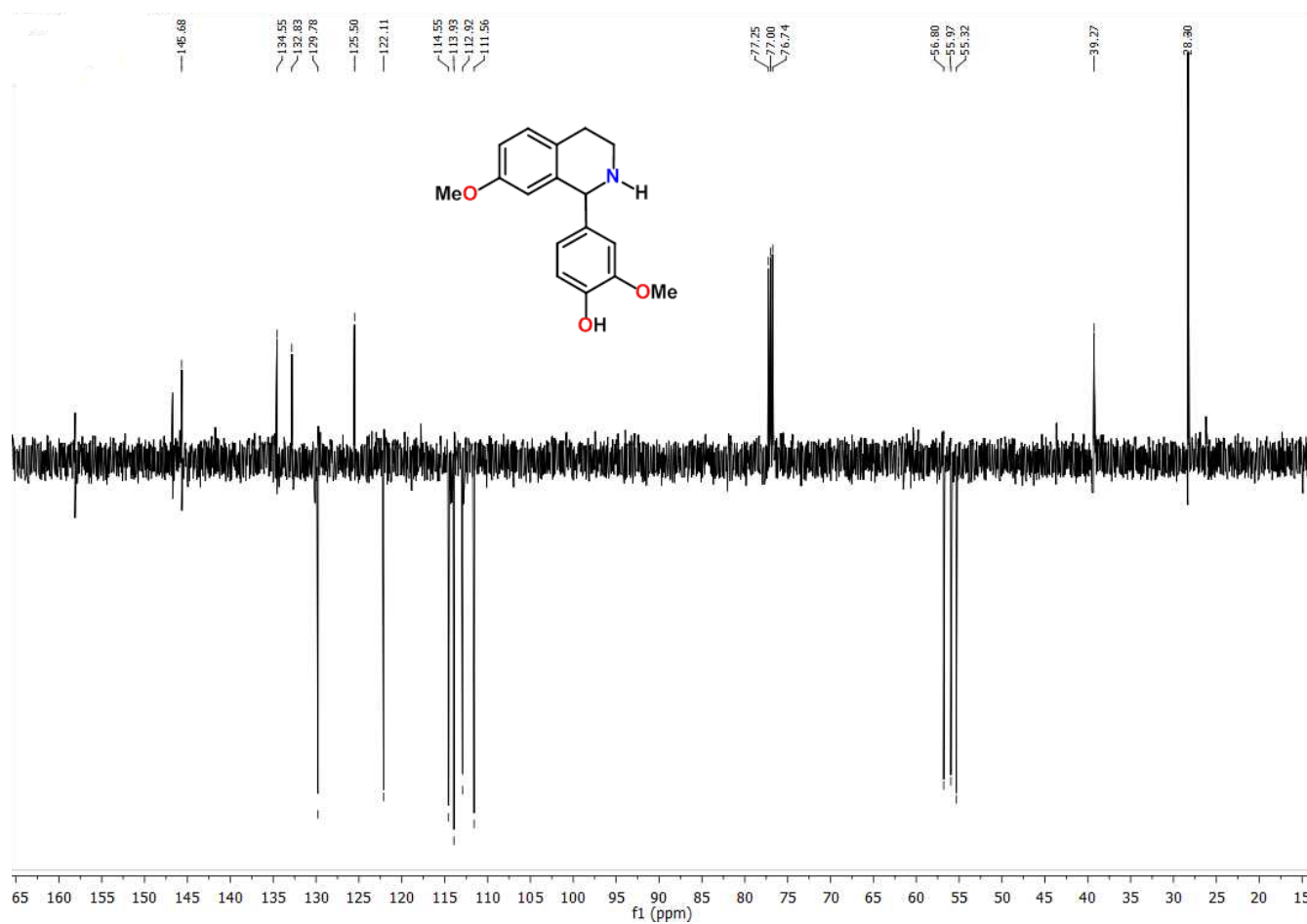


Figura 8 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

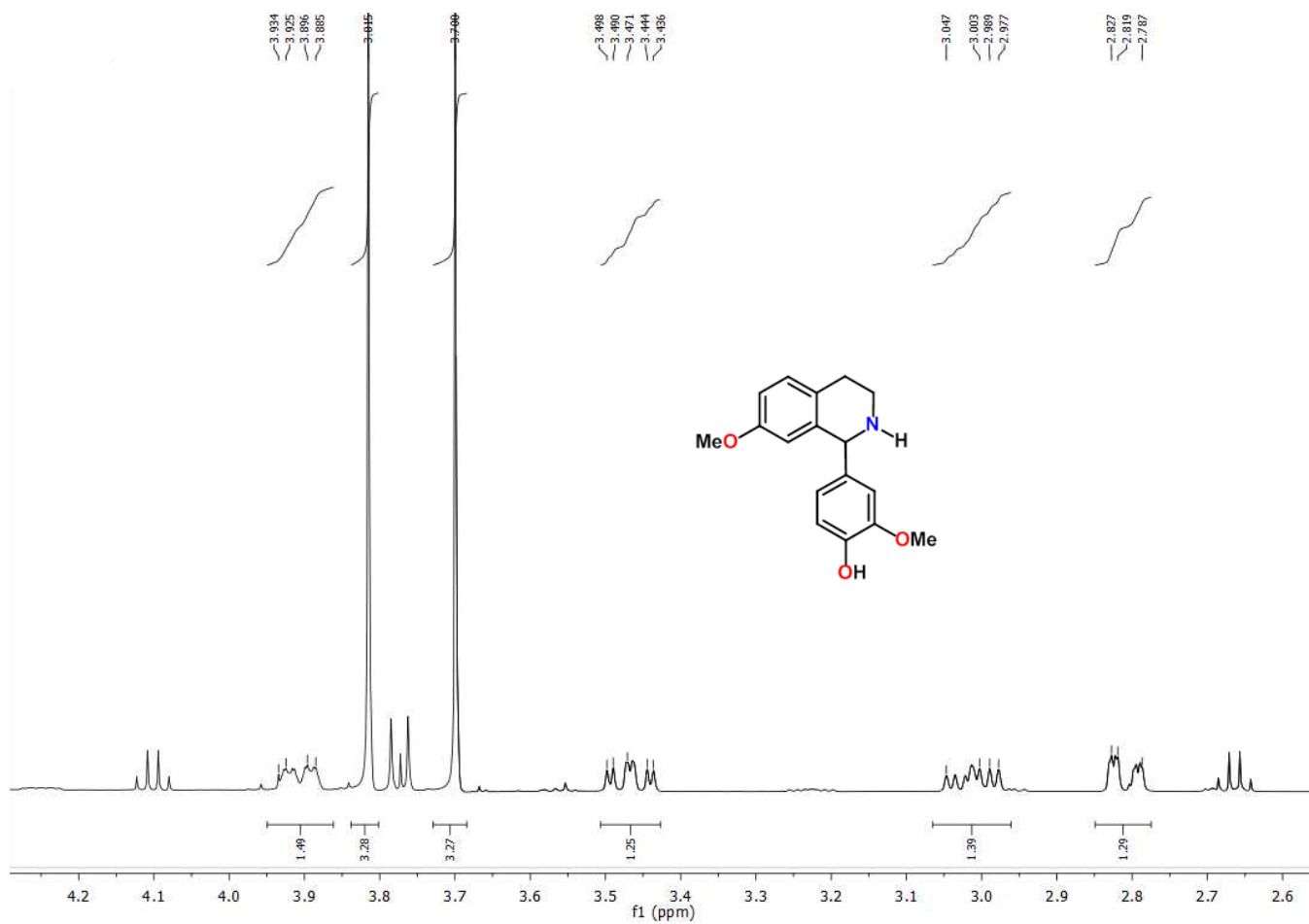


Figura 9 - Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

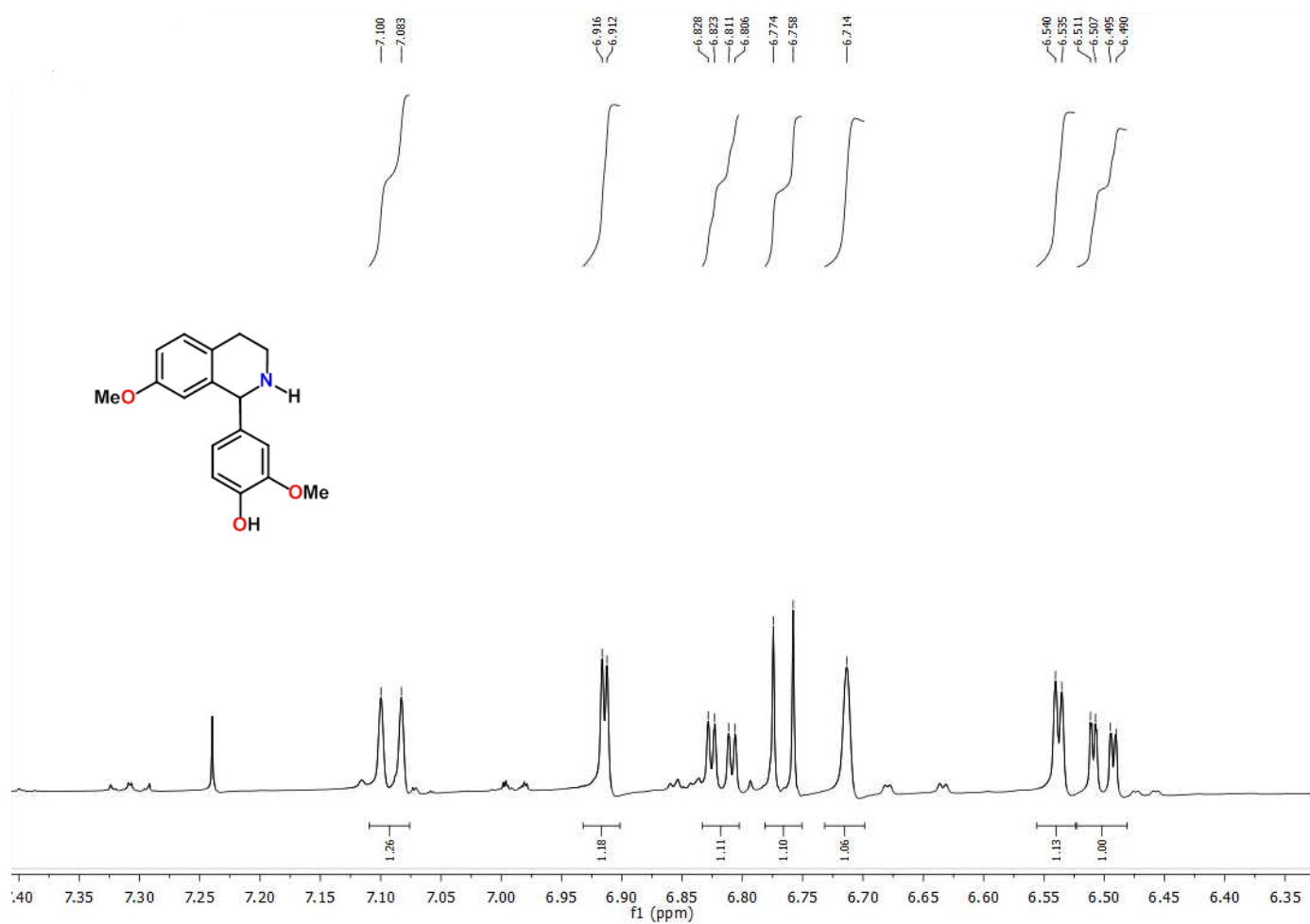


Figura 10 - Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

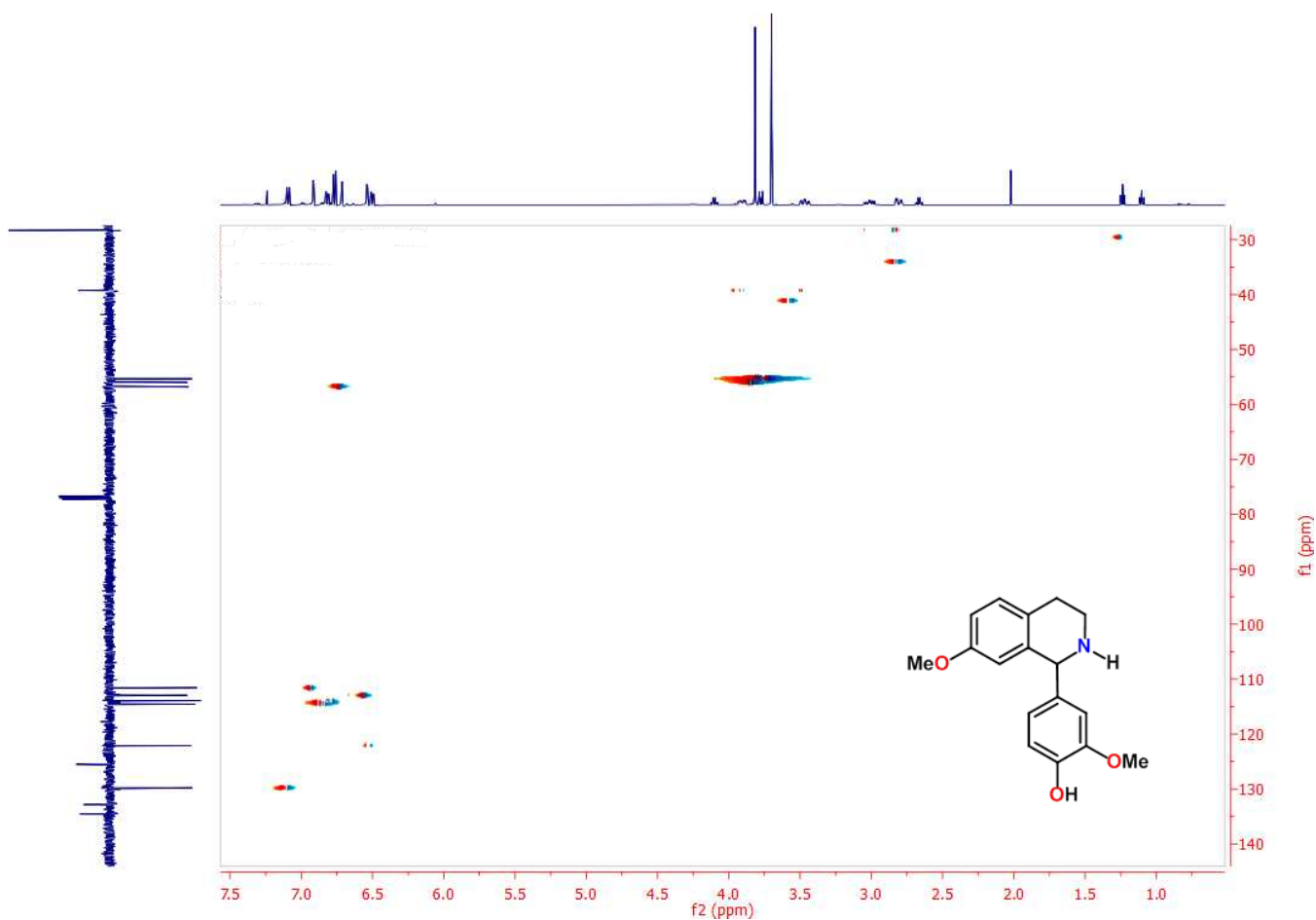


Figura 11- Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMQC (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

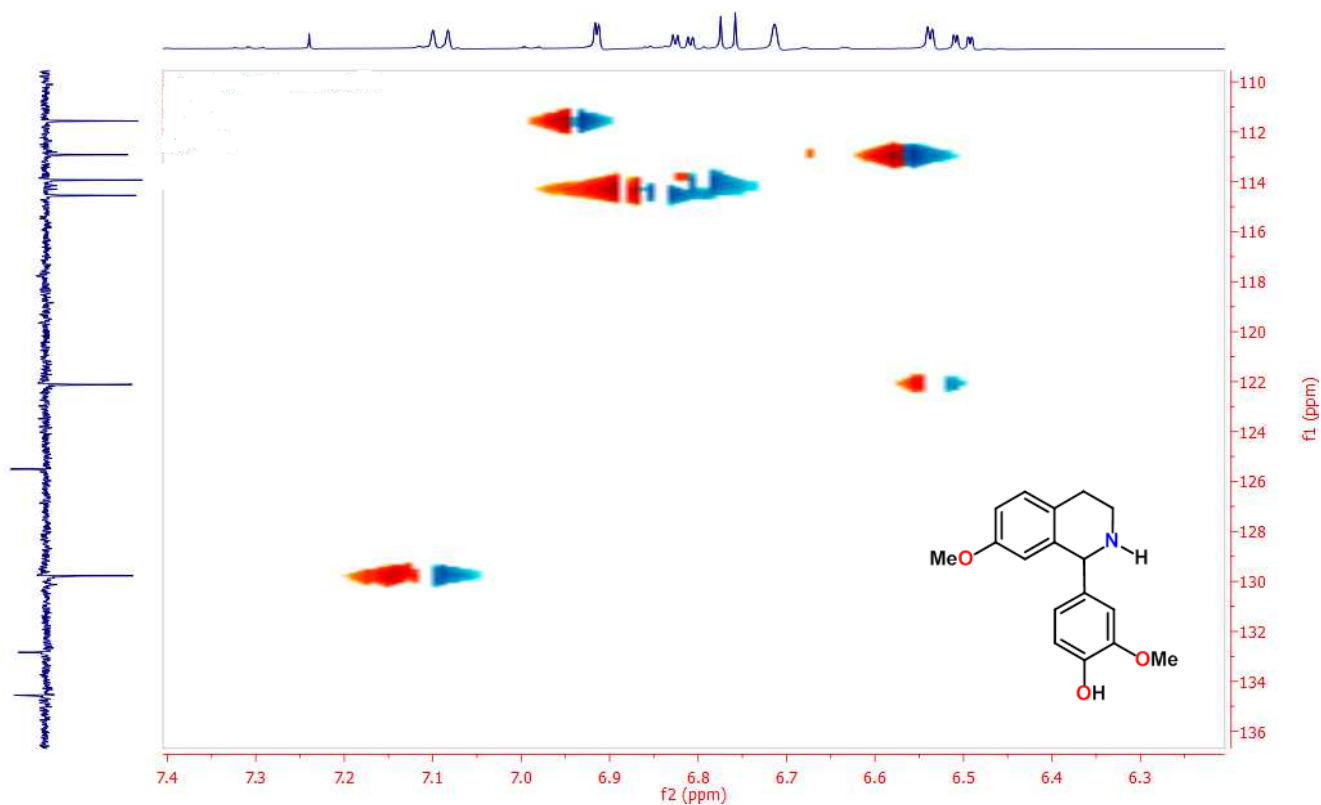


Figura 12 – Expansão 1 - Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMQC (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

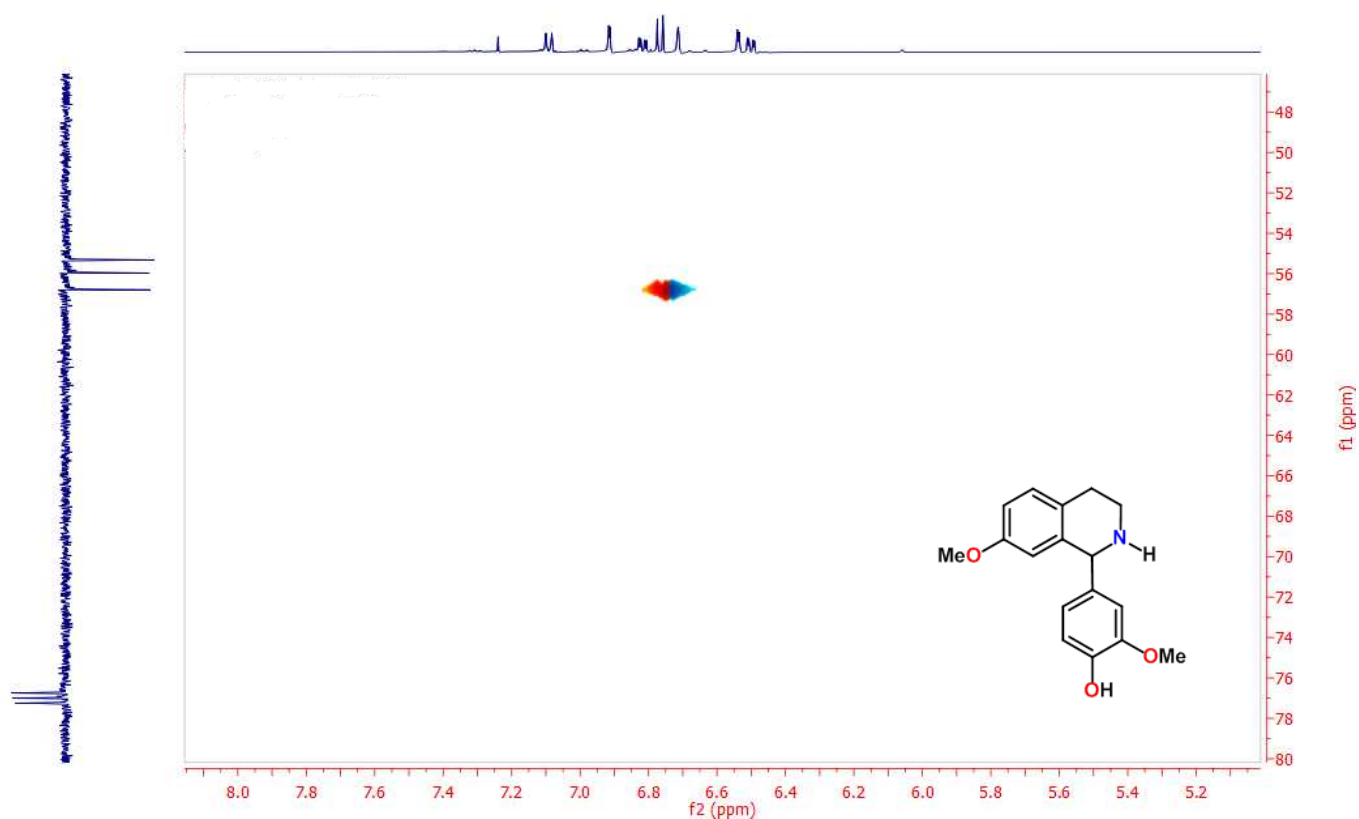
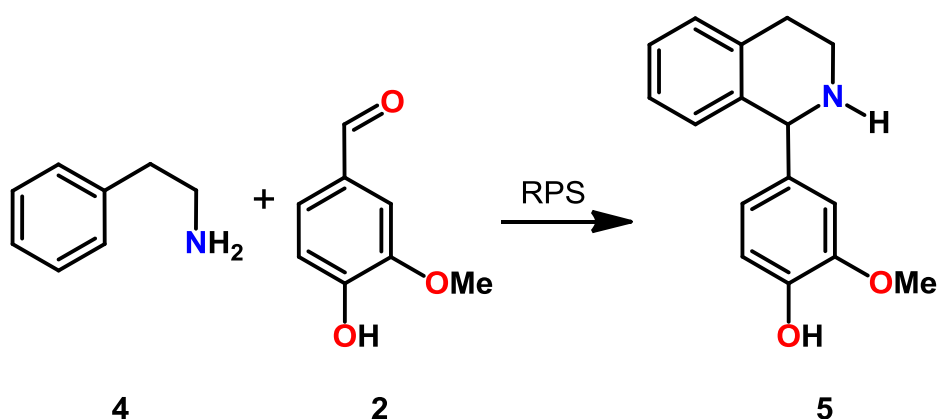


Figura 13 - Expansão 2 - Espectro de RMN de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

Em um segundo momento, utilizando a mesma metodologia conforme item 4.2.1.2, utilizamos como matéria prima a vanilina (**2**), e a feniletilamina (**4**), reagentes comercialmente disponíveis e cujo produto previsto seria uma isoquinolina também inédita, a 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahidro isoquinolina (**5**) (Esquema 8).



Esquema 8 - Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahidro isoquinolina (**5**)

O produto da reação foi o esperado, obtido com excelente rendimento (93,45%), apresentou-se na forma de um líquido oleoso de coloração amarelo claro.

A caracterização deste composto inédito se deu através da análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C unidimensional.

A diferença deste composto (**5**) para o composto (**3**), é a ausência da metoxila na posição 7, que pode ser constatada através da análise espectral de RMN ¹³C, (Figura 14; Tabela 3), com a ausência do sinal em δ_c 55,31 e em δ_c 158,112 referentes ao carbono metoxílico e ao carbono quaternário α -metoxila respectivamente e a presença de um sinal de carbono metínico sp^2 a mais.

O espectro de RMN ¹H (Figuras 15 e 16; Tabela 3) por sua vez mostrou um conjunto de sinais semelhante ao que apareceu no espectro do composto **3**: Um duplo duplete em δ_H 6,473 com acoplamento *orto* ($J= 8,5$ Hz) e *meta* ($J= 2$ Hz), um duplete em δ_H 6,763 com acoplamento *orto* ($J= 8,5$ Hz) e um duplete em δ_H 6,901 ($J= 2$ Hz) mostrando acoplamento *meta*, na região do aromático e

uma metoxila aromática em δ_H 3,807. Este conjunto de sinais corresponde ao grupamento fenil dissustituído presente tanto na estrutura do composto **3** quanto do composto **5**.

O núcleo 1,2,3,4 tetrahydroisoquinolínico é evidenciado pela presença de um simpleto largo em δ_H 6,746, referente ao hidrogênio α -nitrogênio, de quatro multipletos em δ_H 3,471-3,532, δ_H 3,912-3,949, δ_H 2,976-3,124, δ_H 2,853-2,896 referentes aos quatro hidrogênios metilênicos, sinais estes também presentes no espectro de RMN 1H da substância **3**, juntamente com um multiplete em δ_H 7,160-7,250 referente aos quatro hidrogênios do anel aromático.

Tabela 3 - Dados de RMN de 1H (500 MHz), ^{13}C (50 MHz) da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydro isoquinolina registrados em $CDCl_3$ (δ em ppm e J em Hz)

C	(δ_C ppm)	(δ_H ppm)
1	56,630	6,746 (1H,s)
2	39,130	3,471-3,532 (1H,m) 3,912-3,949 (1H,m)
3	29,030	2,976-3,124 (1H,m) 2,853-2,896 (1H,m)
4	133,340	-
5	128,790	7,160-7,250 (4H,m)
6	127,410	7,160-7,250 (4H,m)
7	126,530	7,160-7,250 (4H,m)
8	128,790	7,160-7,250 (4H,m)
9	133,480	-
1'	132,970	-
2'	111,500	6,901 (1H, J=2,0, d)
3'	146,630	-
4'	145,520	-
5'	113,840	6,763 (1H, J=8,5, d)
6'	122,050	6,473(dd, J=8,5Hz e J=2,0Hz, 1H)
OCH ₃	55,910	3,807 (3H,s)

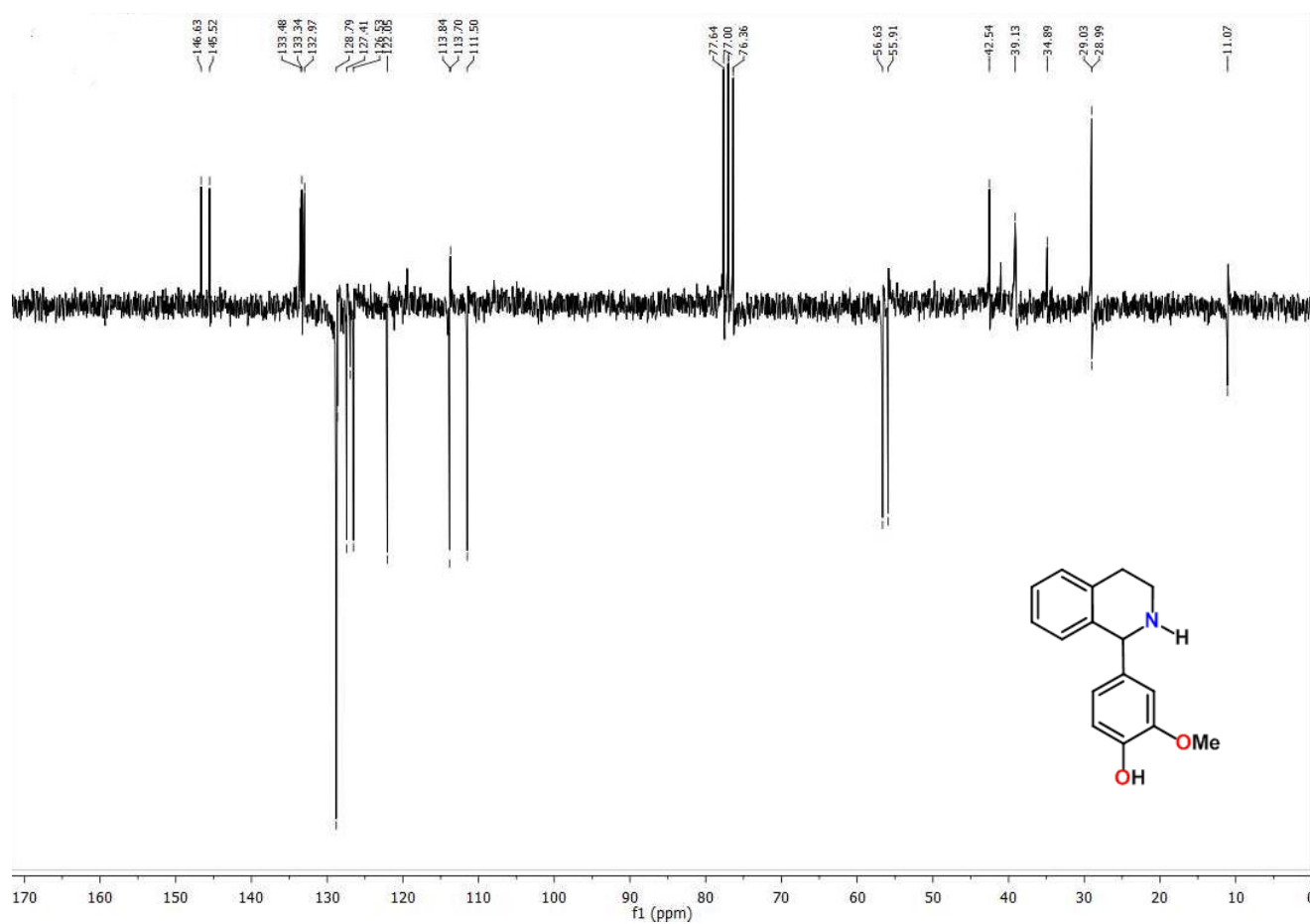


Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro isoquinolina

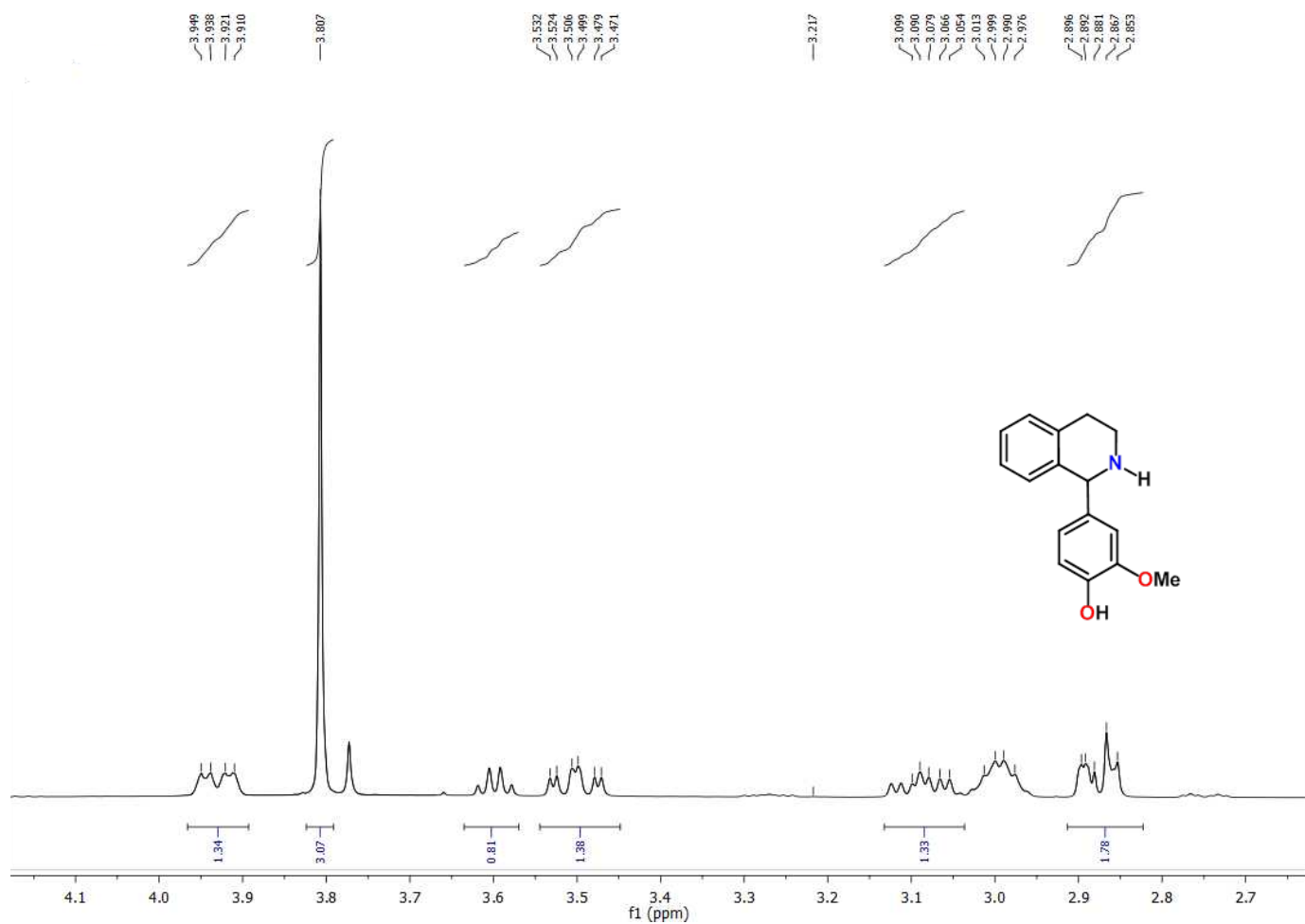


Figura 15 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro isoquinolina

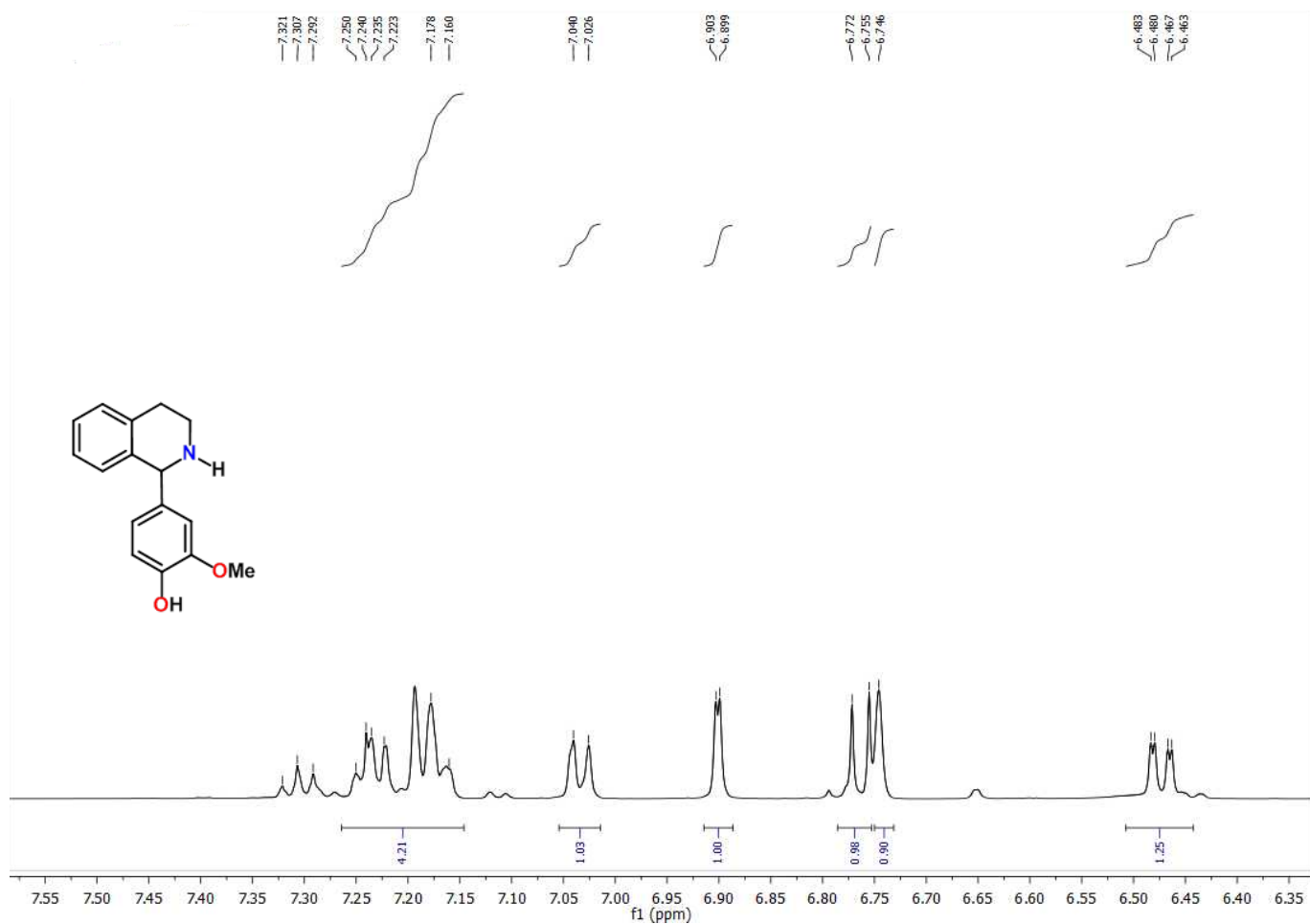
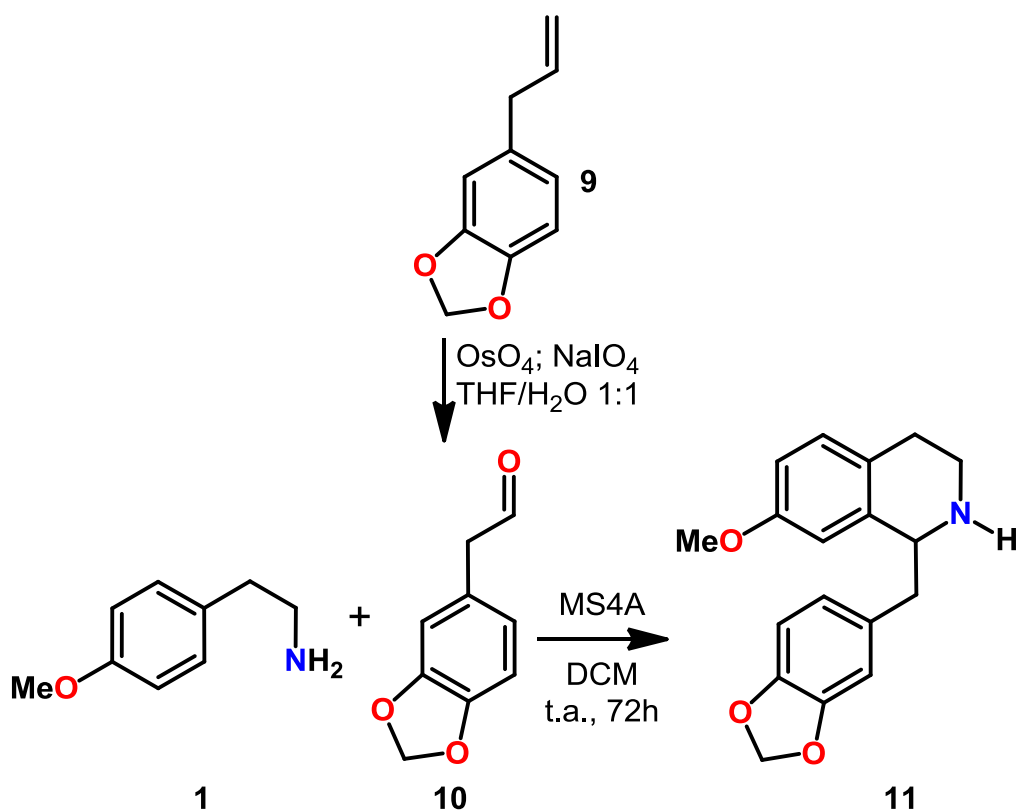


Figura 16 - Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahidro isoquinolina

Após conclusão da primeira etapa que consistiu no desenvolvimento e adaptação de um protocolo apropriado para a ciclização de β -ariletilaminas, que resultou na obtenção de dois alcalóides fenilisoquinolínicos inéditos, tivemos como proposta chegar ao núcleo benzilisoquinolínico, partindo do abundante e barato safrol **9** para a produção do aldeído correspondente **10**, aplicando a oxidação de Lemieux-Johnson utilizando o tetróxido de ósmio como catalisador, periodato de sódio como agente oxidante e uma mistura THF:água 1:1 como solvente, para em seguida se fazer reagir o aldeído obtido com a metoxitiramina **1** para resultar na benzilisoquinolina **11** (Esquema 9).



Esquema 9 - Proposta para a síntese da benzilisoquinolina **11**

A princípio achávamos ter obtido o composto **11**, porém após análise detalhada dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, constatamos que o produto obtido foi o alcaloide fenilisoquinolínico **14**, (Figura 17).

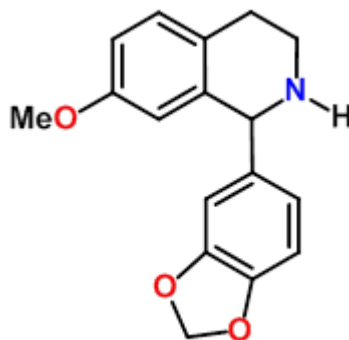


Figura 17 - Estrutura química de 14

A análise espectral de RMN ^{13}C , utilizando a técnica APT (Figura 18; Tabela 4) permitiu observar a presença de dezessete sinais de carbonos e não de dezoito que seria o caso de a estrutura do produto ser compatível com **8**. Destes sinais, seis foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, sete a carbonos metínicos, um a carbono metoxílico e três metilênicos, compatíveis com a estrutura química de **14**.

O espectro de RMN ^1H e sua expansão (Figuras 19 e 20; Tabela 4), confirmou o núcleo 1,2,3,4 tetrahidroisoquinolínico que é evidenciado pela presença de um simpleto largo em δ_{H} 6,692, referente ao hidrogênio α -nitrogênio, de quatro multipletos em δ_{H} 3,439-3,501, δ_{H} 3,900-3,937, δ_{H} 2,97-3,040 e δ_{H} 2,786-2,824 referentes aos quatro hidrogênios metilênicos com acoplamentos geminais e vicinais e de um duplete em δ_{H} 7,090 com acoplamento orto ($J=8,5$ Hz), um duplo duplete em δ_{H} 6,817 com acoplamento orto ($J=8,5$ Hz) e meta ($J=2,5$ Hz) e um duplete em δ_{H} 6,529 com acoplamento meta ($J=2,5$ Hz) referentes aos 3 hidrogênios do anel aromático.

O espectro de RMN ^1H mostrou ainda os hidrogênios metoxílicos aparecendo como um simpleto em δ_{H} 3,707. O substituinte fenil trissubstituído é evidenciado pela presença de um duplo duplete em δ_{H} 6,665 com acoplamento orto ($J=8,0$ Hz) e meta ($J=1,5$ Hz) de um duplete em δ_{H} 6,700 com acoplamento orto ($J=8,0$ Hz) e de um duplete em δ_{H} 6,715 com acoplamento meta ($J=1,5$). O CH_2 do grupamento dioximetileno é confirmado

pela presença de um simpleto em 5,917. Todos os sinais foram confirmados através de RMN bidimensional, HMQC (Figura 21) e HMBC (Figura 22).

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (50 MHz) da 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)

C	(δ_{C} ppm)	(δ_{H} ppm)
1	56,533	6,692 (1H,s)
2	39,231	3,439-3,501 (1H,m) 3,900-3,937 (1H,m)
3	28,224	2,971-3,040 (1H,m) 2,786-2,824 (1H,m)
4	125,416	-
5	129,820	7,090 (1H, J=8,5, d)
6	114,490	6,817 (dd, J=8,5Hz e J=2,5Hz, 1H)
7	158,092	-
8	112,841	6,529 (1H, J=2,5, d)
9	134,686	-
1'	134,415	-
2'	109,360	6,715 (1H, J=1,5, d)
3'	147,811	-
4'	147,422	-
5'	108,034	6,700 (1H, J=8,0, d)
6'	122,778	6,665(dd, J=8,0Hz e J=1,5Hz, 1H)
CH_2	101,197	5,917 (2H,s)
OCH_3	55,287	3,707 (3H,s)

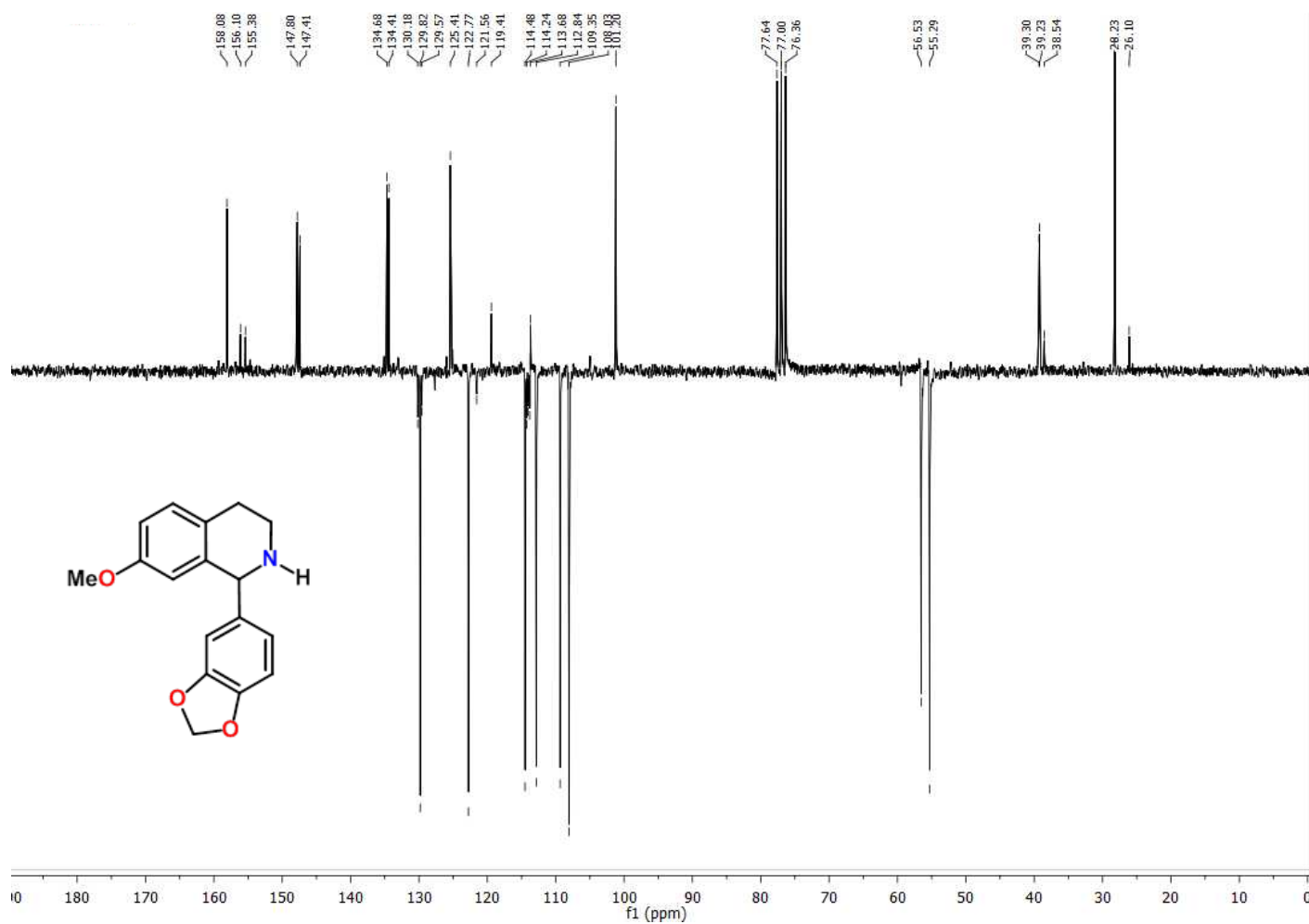


Figura 18 - Espectro de RMN ¹³C-APT (50 MHz, CDCl₃) de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

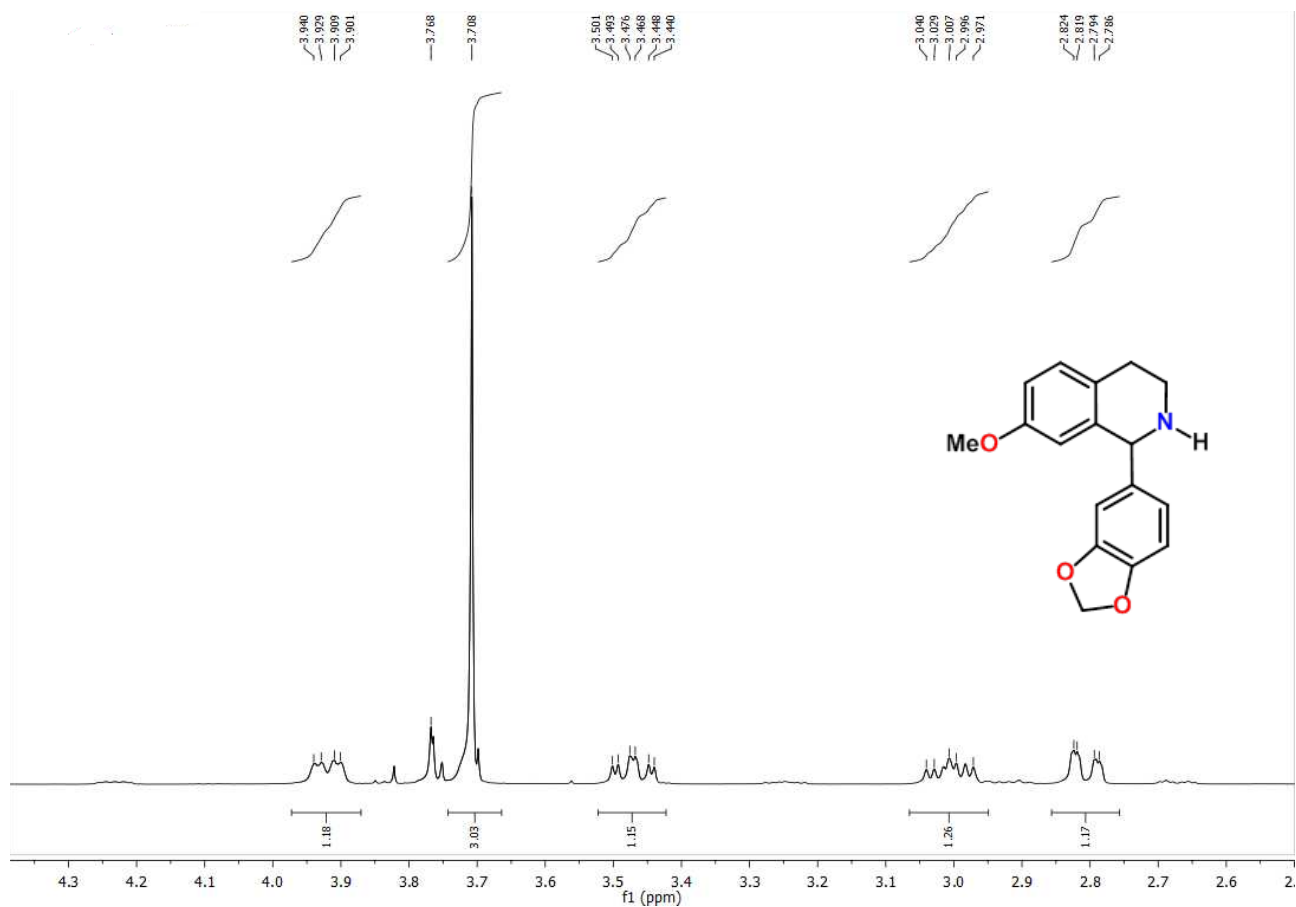


Figura 19 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

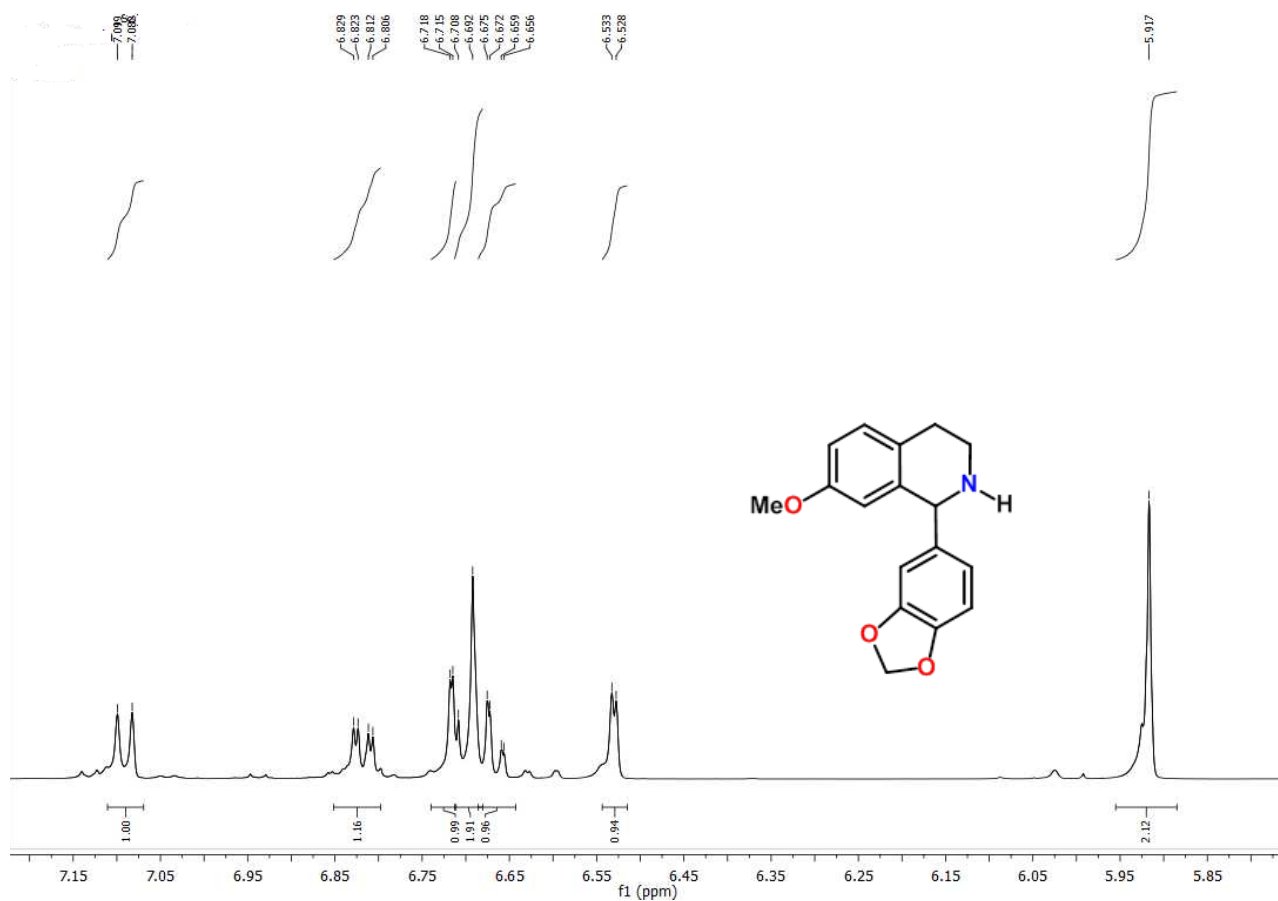


Figura 20 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina

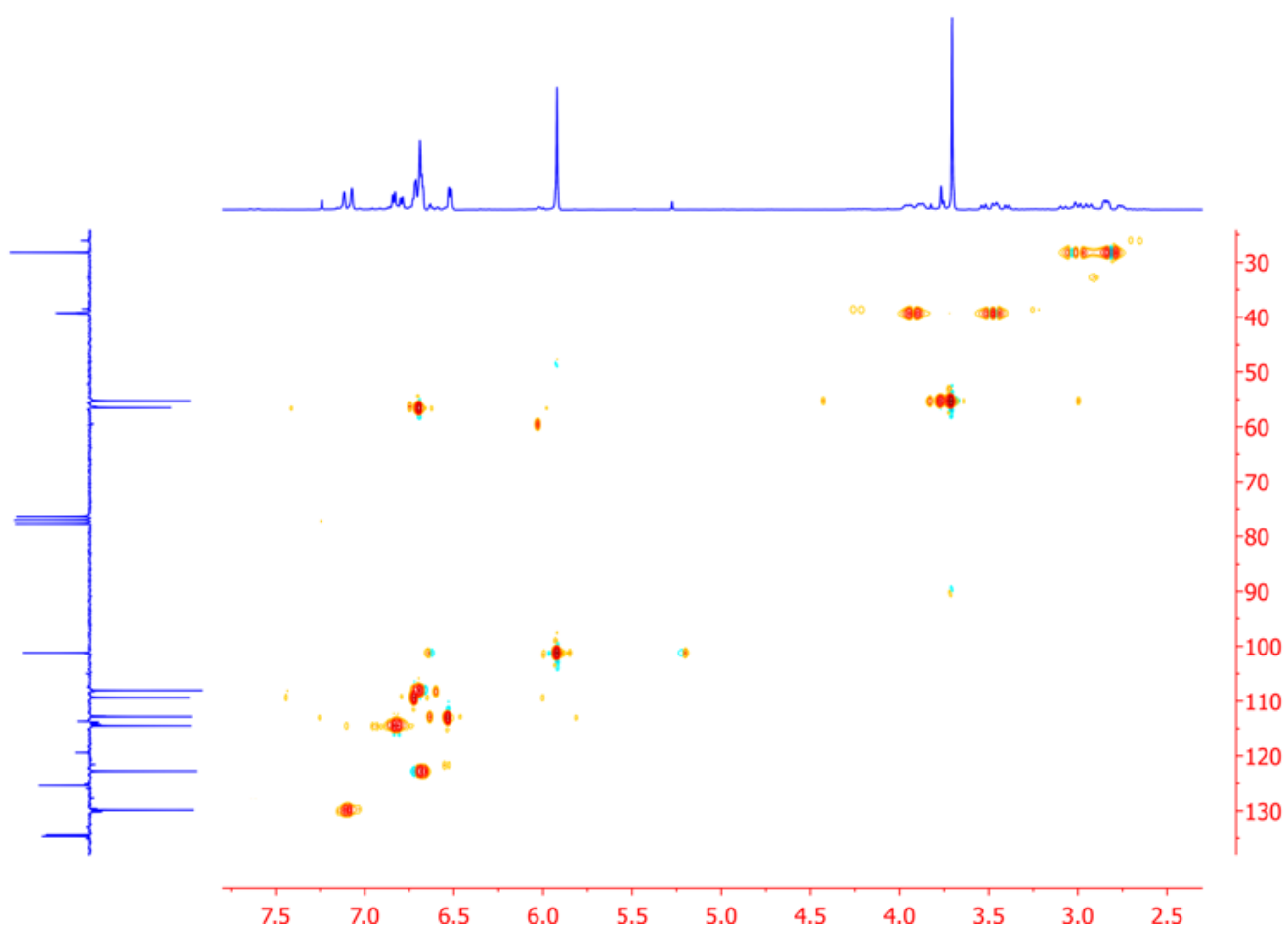


Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMQC (500 MHz, CDCl_3) de de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina

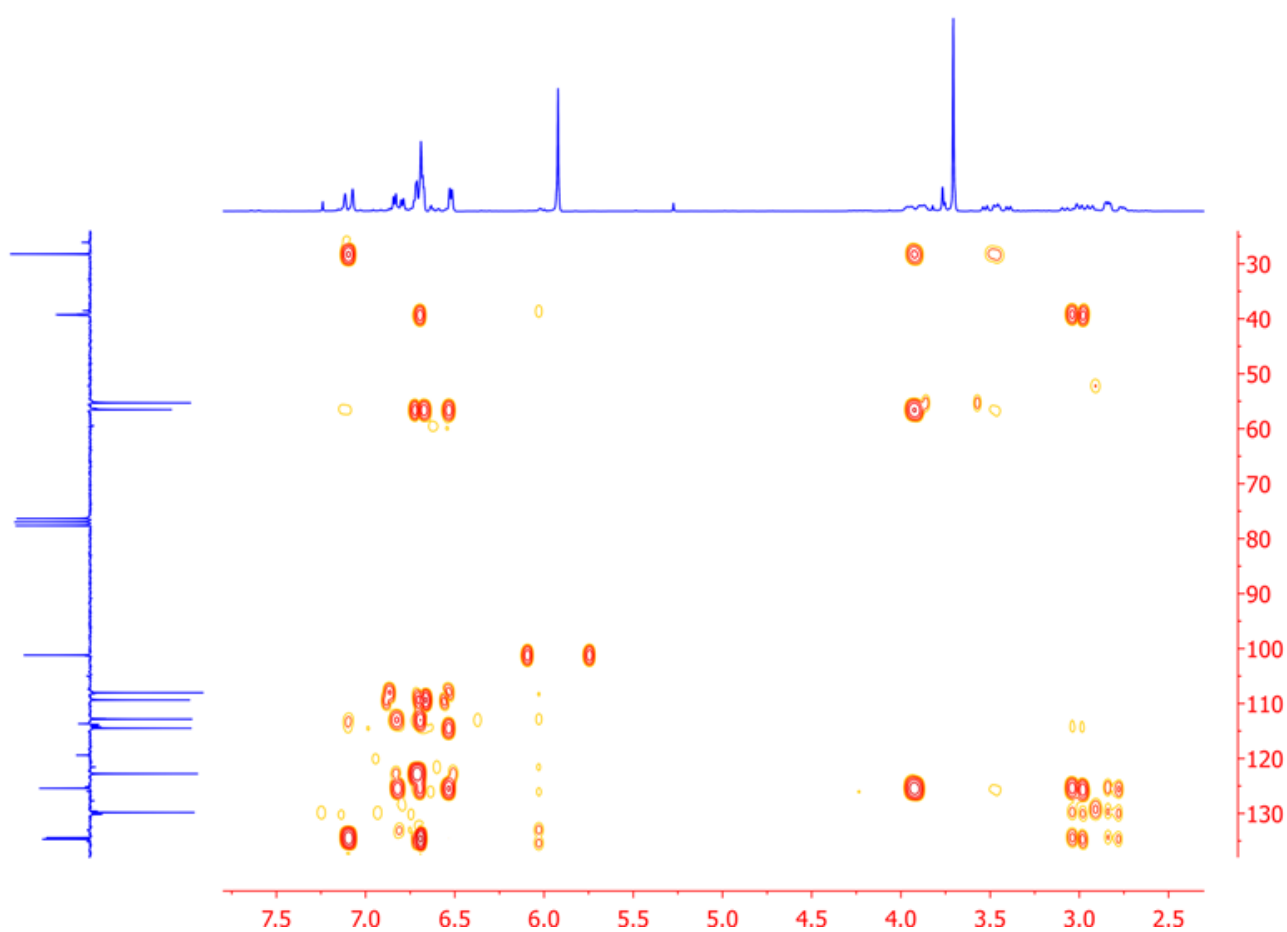
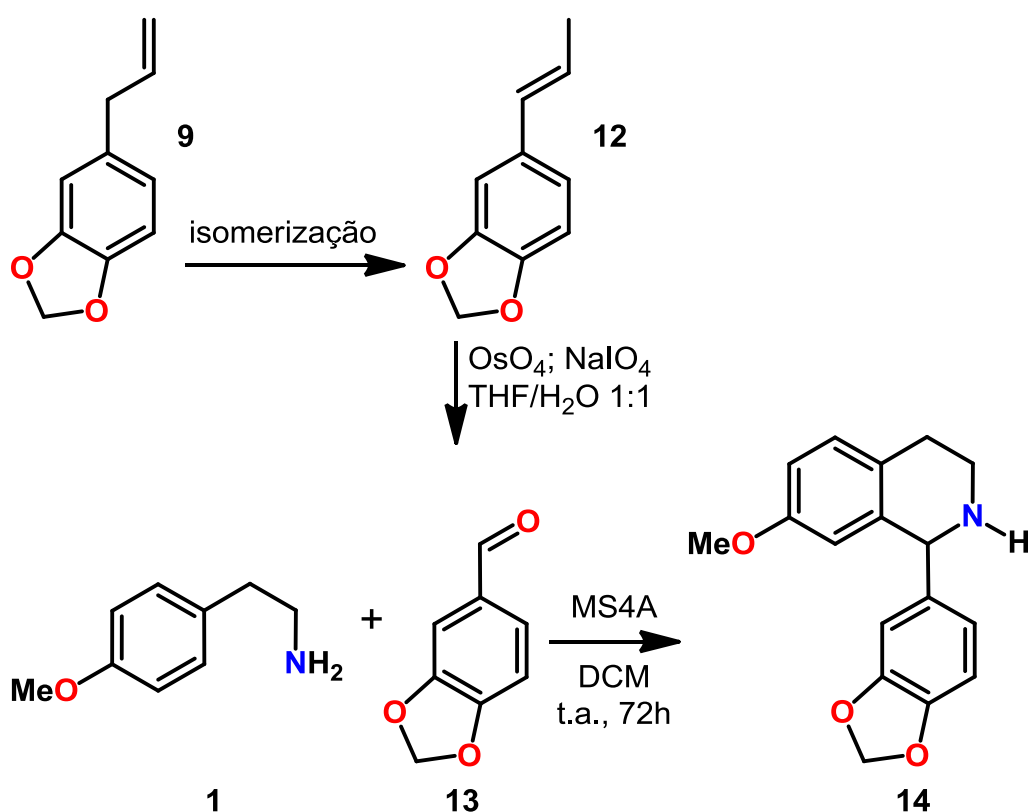


Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H x ^{13}C – HMBC (500 MHz, CDCl_3) de de 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

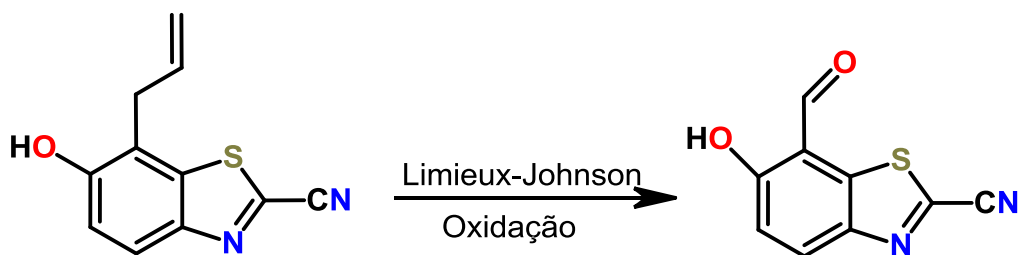
A formação do núcleo fenilisoquinolínico e não do benzilisoquinolínico justifica-se pela mudança de posição da dupla terminal, durante a oxidação de Lemieux-Johnson, que fica então conjugada com o sistema aromático do anel, sofrendo em seguida a ação do tetróxido de ósmio para a formação do aldeído benzóico correspondente.

Depois da isomerização e oxidação, fizemos então o acoplamento através da reação de Piquet-Spengler (Esquema 10).

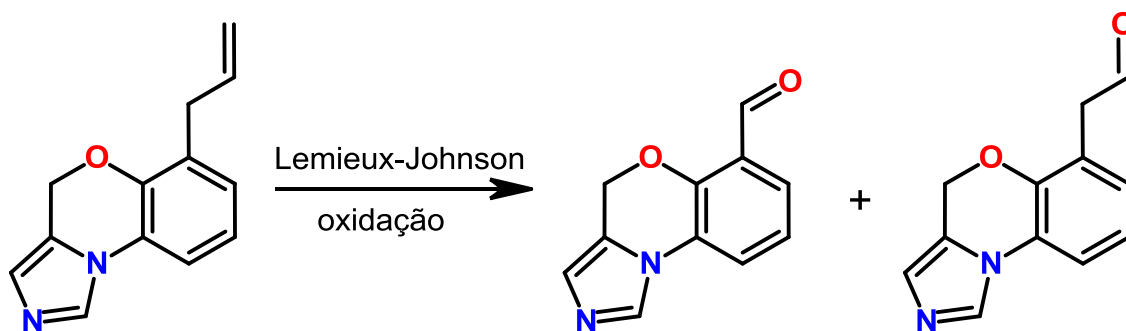


Esquema 10 - Síntese da 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

Este tipo de comportamento de alil-benzênicos frente ao tetróxido de ósmio não é novidade na química, como se pode observar nestas duas patentes em que ocorre algo similar (Esquema 11).



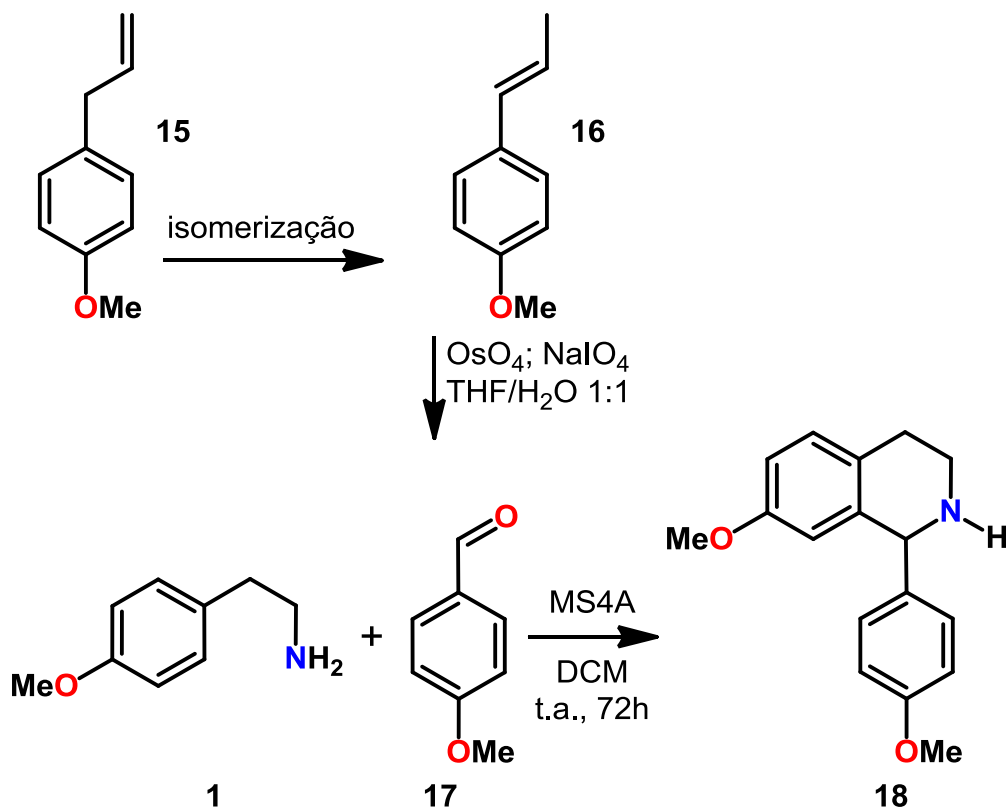
Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 2010180191, 19 Aug 2010



PCT Int. Appl., 2006024517, 09 Mar 2006

Esquema 11 - Patentes em que ocorre isomerização na reação de Limieux-Johnson

Executamos então o mesmo protocolo para obtenção de mais uma fenilisoquinolina através da isomerização do alilbenzeno estragol seguida da oxidação de Lemieux-Johnson para posterior acoplamento com a metoxifenietilamina conforme descrito em 4.2.1.4, os reagentes de partida são comercialmente disponíveis e o produto previsto é uma isoquinolina previamente relatada, obtida através da reação de Bishler-Napieralski (DOI; SHIRAI; SATO; 1997), a 7-metoxi-1-(4-metoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (**18**) (Esquema 12).



Esquema 92 - Síntese da 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

O produto obtido apresentou-se sob a forma de um líquido oleoso de coloração amarelo claro.

A caracterização deste composto se deu através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C unidimensional.

A análise espectral de RMN ^{13}C (Figura 23; Tabela 5) permitiu observar a presença de dezessete sinais de carbonos. Destes sinais, seis foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, sete a carbonos metínicos, dois a carbonos metoxílicos e dois metilênicos, compatíveis com o produto esperado da reação.

O espectro de RMN ^1H e sua expansão (Figuras 24 e 25; Tabela 4), confirmou o núcleo 1,2,3,4 tetrahidroisoquinolínico que é evidenciado pela presença de um simpleto largo em δ_{H} 6,740, referente ao hidrogênio α -nitrogênio, de quatro multipletos em δ_{H} 3,360-3,510, δ_{H} 3,820-3,950, δ_{H} 2,930-3,100 e δ_{H} 2,750-2,860 referentes aos quatro hidrogênios metilênicos com acoplamentos geminais e vicinais e de um duplete em δ_{H} 7,100 com acoplamento orto ($J=8,0$ Hz), um duplo duplete em δ_{H} 6,810 com acoplamento

orto ($J=8,0$ Hz) e meta ($J=4,0$ Hz) e um duplete em δ_H 6,520 com acoplamento meta ($J=4,0$ Hz) referentes aos 3 hidrogênios do anel aromático.

Foi possível observar também a presença de metoxilas aromáticas em δ_H 3,770 e δ_H 3,700. O substituinte fenil dissustituído é evidenciado pela presença de dois dupletos em δ_H 6,800 e δ_H 7,130 ambos com acoplamento orto ($J=8,0$ Hz), cada um equivalendo a 2 hidrogênios.

Tabela 5 - Dados de RMN de 1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) de 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina registrados em $CDCl_3$ (δ em ppm e J em Hz).

C	(δ_C ppm)	(δ_H ppm)
1	56,320	6,740 (1H,s)
2	39,280	3,360-3,510 (1H,m) 3,820-3,950 (1H,m)
3	28,300	2,930-3,100 (1H,m) 2,750-2,860 (1H,m)
4	125,470	-
5	129,810	7,100 (1H, $J=8,0$, d)
6	114,440	6,810 (dd, $J=8,0$ Hz e $J=4,0$ Hz, 1H)
7	158,070	-
8	112,760	6,520 (1H, $J=4,0$, d)
9	134,640	-
1'	133,000	-
2'	130,200	7,130 ($J=8,0$ Hz, 2H,d)
3'	113,800	6,800 (2H, $J=8,0$, d)
4'	159,310	-
5'	113,800	6,800 (2H, $J=8,0$, d)
6'	130,200	7,130 ($J=8,0$ Hz, 2H,d)
OCH ₃	55,270	3,770 (3H,s)
OCH ₃	55,330	3,700 (3H,s)

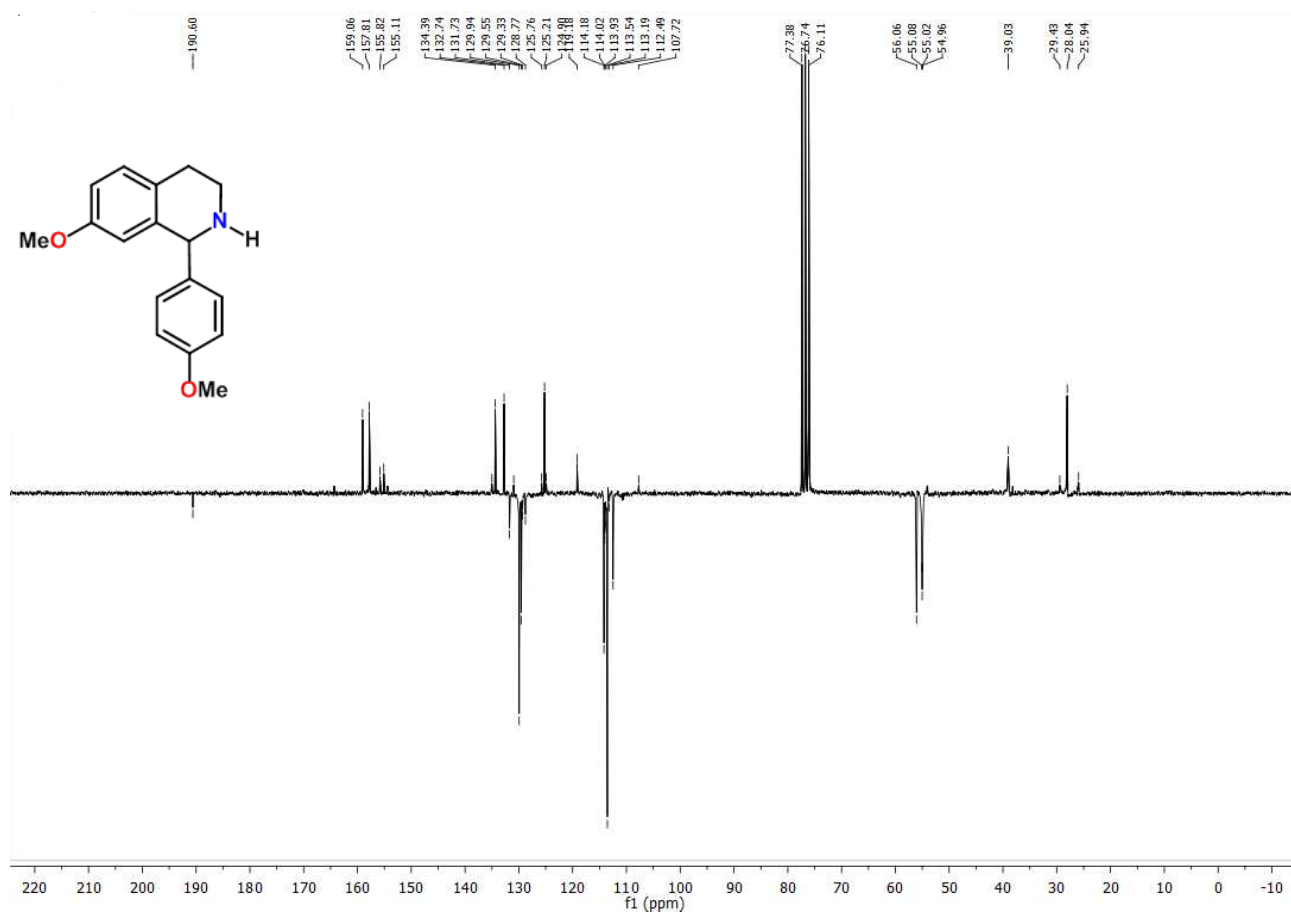


Figura 63 - Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina

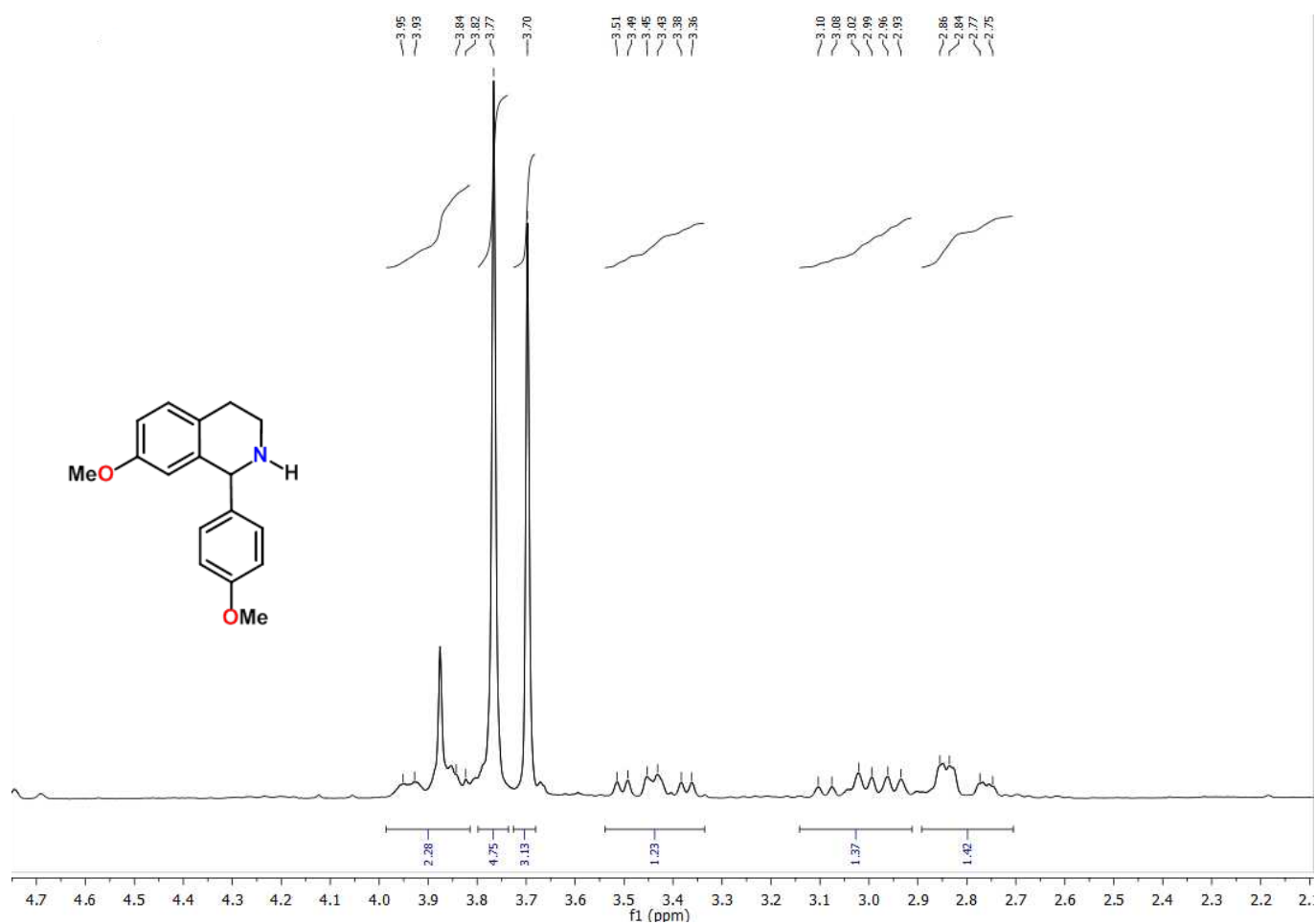


Figura 24 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina

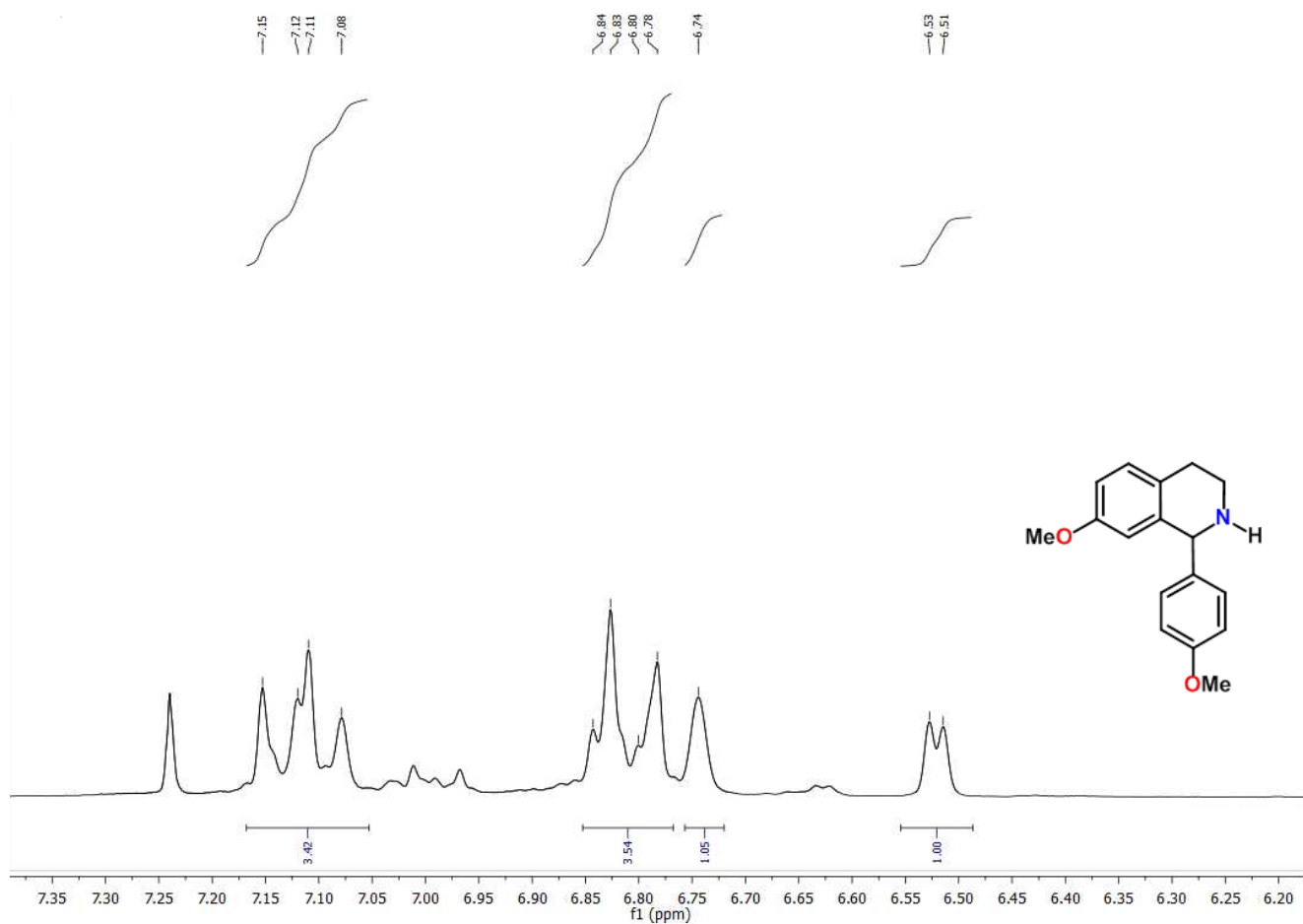


Figura 25 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina

O número de alcaloides que contém o esqueleto tetraisoquinolínico 1-substituído é extenso, principalmente o 1-benzilisoquinolínico. Embora não tenhamos chegado ao núcleo benzilisoquinolínico, sintetizamos três alcalóides inéditos contendo o esqueleto 1-fenilisoquinolínico: 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina, 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina e um previamente relatado, 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina utilizando uma metodologia experimental simples, aplicando a consagrada reação de Pictet-Spengler.

Os alcaloides obtidos são análogos das criptostilinas I, II e III isoladas a partir da planta *Cryptostylis fulva* as quais possuem considerável significância biológica. Estas novas fenilisoquinolinas são promissoras, pois embora simples, são de grande interesse tanto como alcaloides em si, quanto como intermediários chave, úteis na síntese de alcaloides mais complexos.

5.2 Ensaios Biológicos

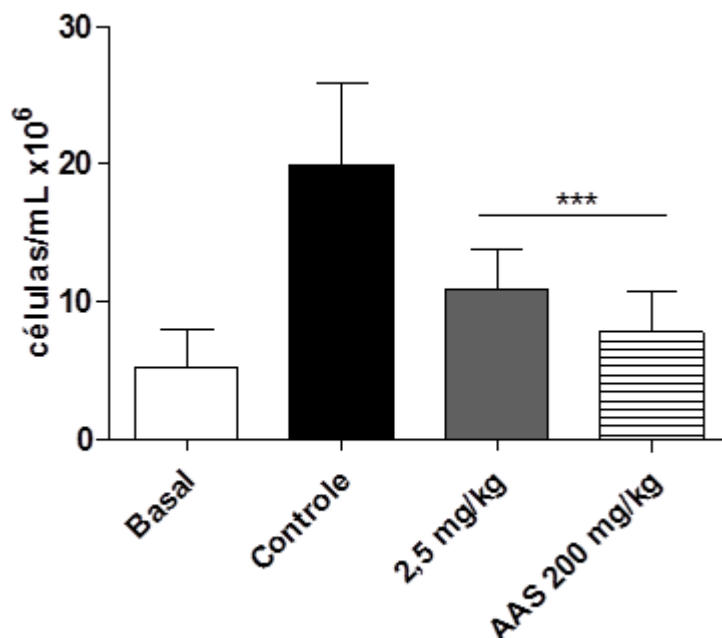
5.2.1 Efeito antiinflamatório de MTHP na peritonite induzida por zimosan

Para avaliar parâmetros como a migração de células e a liberação de citocinas no sítio inflamatório, utilizou-se o modelo experimental de peritonite induzida por zimosan. Quatro horas após o estímulo inflamatório, o lavado peritoneal colhido foi submetido à contagem de células totais em microscopia óptica, e o resultado está demonstrado na Figura 26. Nota-se o aumento significativo da migração celular para a cavidade abdominal de camundongos não tratados e injetados com zimosan ($p < 0,05$); a migração foi significativamente menor em camundongos tratados com MTHP e o AAS.

Após a centrifugação do lavado peritoneal para as análises do conteúdo celular, os sobrenadantes coletados foram utilizados na dosagem das citocinas características do processo inflamatório. As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6 e a citocina reguladora do processo inflamatório IL-10 foram dosadas por ensaio imunoenzimático, conforme orientações do fabricante dos reagentes empregados.

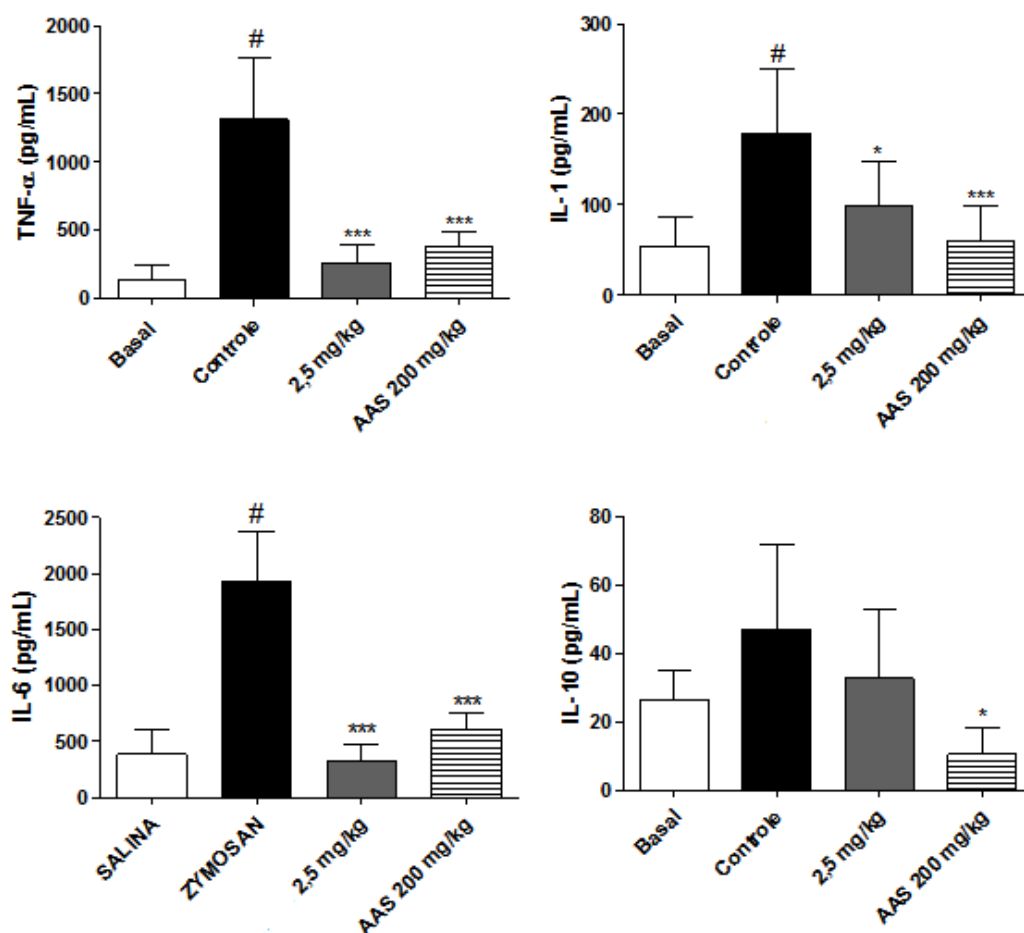
Tanto MTHP quanto o AAS reduziram significativamente a liberação dos mediadores pró-inflamatórios, induzida pela injeção de zimosan. Além disto, é possível observar que os animais tratados com MTHP não apresentaram redução significativa nos níveis de IL-10 do fluido peritoneal; o mesmo não aconteceu com os animais tratados com AAS, nos quais é possível verificar redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis deste mediador (Figura 27).

Figura 26 - Efeito do pré-tratamento com a 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina na celularidade do lavado peritoneal.



Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com 1,2,3,4,-tetrahydro-7-metoxi-1-(4-hidroxi-5-metoxifenil)isoquinolina (2,5 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção I.P. (500 µL) de zimosan (2 mg/mL). O grupo basal recebeu injeção I.P. (500 µL) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação da celularidade total e diferencial. O gráfico representa a média \pm S.E.M. da contagem total de células em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

Figura 277 - Efeito do pré-tratamento com a 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina nos níveis de citocinas do lavado peritoneal.



Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com 1,2,3,4,-tetrahydro-7-metoxi-1-(4-hidroxil-5-metoxifenil)isoquinolina (2,5 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção I.P. (500 µL) de zimosan (2 mg/mL). O grupo basal recebeu injeção I.P. (500 µL) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação dos níveis de TNF-α (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D). O gráfico representa a média \pm S.E.M. dos níveis de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

O zimosan é um carboidrato enriquecido em β -glucanas obtido da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*; é um clássico ativador da via alternativa do sistema complemento, além de estar relacionado à liberação e/ou ativação de diferentes mediadores inflamatórios. A formação do edema e a migração celular induzidas por esse produto são muito utilizadas para triagem de substâncias anti-inflamatórias. O zimosan é reconhecido pelo receptor Toll-like 2 (TLR2) e, principalmente por Dectina-1, receptor que reconhece a estrutura da β -glucana. A inflamação induzida por zimosan é dependente de um rápido influxo de leucócitos e formação de anafilatoxinas que contribuem com o aumento da migração celular por desempenharem ação quimiotática para PMNs. C5a induz direta e indiretamente a expressão da P-selectina em células endoteliais e ainda o zimosan induz a produção de citocinas como IL-1 e TNF- α , capazes de promover a expressão de selectinas nas células endoteliais, agindo de forma sinérgica aos fragmentos do complemento (DOHERTY *et al.*, 1985; LEITE *et al.*, 2007).

A injeção intraperitoneal do zimosan desencadeia um processo inflamatório autolimitado e de curta duração, servindo como modelo ideal para a avaliação dos mecanismos vasculares e celulares agudos. Em nosso trabalho, o zimosan foi utilizado como ferramenta para avaliar as alterações na migração celular e analisar os níveis de citocinas liberadas na cavidade peritoneal 4h após a indução da inflamação. Em animais pré-tratados com AAS ou MTHP, foi possível verificar reduções significativas na migração celular e nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias características da fase aguda, sendo que a dose da MTHP foi cento e trinta e oito vezes menor que a do AAS (200 mg/Kg v.o.)

Sugerimos que a redução significativa da migração celular caracterizou-se pela diminuição dos neutrófilos no sítio inflamatório, para confirmação são necessários experimentos em citometria de fluxo.

No modelo de peritonite induzida por zimosan, observamos a modulação da liberação de citocinas nos momentos iniciais da inflamação. TNF- α , IL-1 e IL-6 tiveram suas concentrações reduzidas no fluido peritoneal em camundongos tratados com AAS ou a MTHP.

A liberação de IL-10 também foi reduzida pelo tratamento com AAS, e não foi modificada com MTHP. Uma vez que a IL-10 participa da regulação do processo inflamatório, a manutenção de níveis mais elevados aparenta ser benéfica para a fase resolutive da inflamação, servindo como adjuvante dos mecanismos que reduzem a liberação de mediadores que amplificam a resposta. A ação do AAS na liberação de IL-10 varia em modelos experimentais distintos; células dendríticas tratadas com AAS e estimuladas com LPS tiveram a liberação de IL-10 reduzida, bem como outros mecanismos efetores alterados. (BUFAN *et al.*, 2009; HACKSTEIN *et al.*, 2001). Em linhagens distintas de células tumorais, o AAS tanto aumentou quanto reduziu a liberação da IL-10 (BERGMAN *et al.*, 2011), demonstrando que seu papel na modulação deste mediador não está completamente esclarecido. Estudos complementares são fundamentais para esclarecer se a MTHP é capaz de manter os níveis fisiológicos de IL-10 em diferentes condições, representando assim uma vantagem terapêutica nas condições inflamatórias agudas.

5.2.2 Efeito de MTHP no sistema cardiovascular de ratos normotensos

5.2.2.1 Efeito de MTHP sobre a pressão arterial em ratos normotensos não anestesiados.

Após o período de estabilização o valor da PAM foi de $120,8 \pm 3,2$ mmHg. A figura 28 mostra o efeito de MTHP (1, 5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) quando administrada em ratos normotensos não anestesiados, onde a droga foi capaz de induzir um efeito hipotensivo de maneira dependente de dose ($-10,2 \pm 1,93$; $-25,4 \pm 3,7$; $-31,6 \pm 4,0$; $-63,0 \pm 5,8$; $-68,8 \pm 4,1$ mmHg, $n=5$).

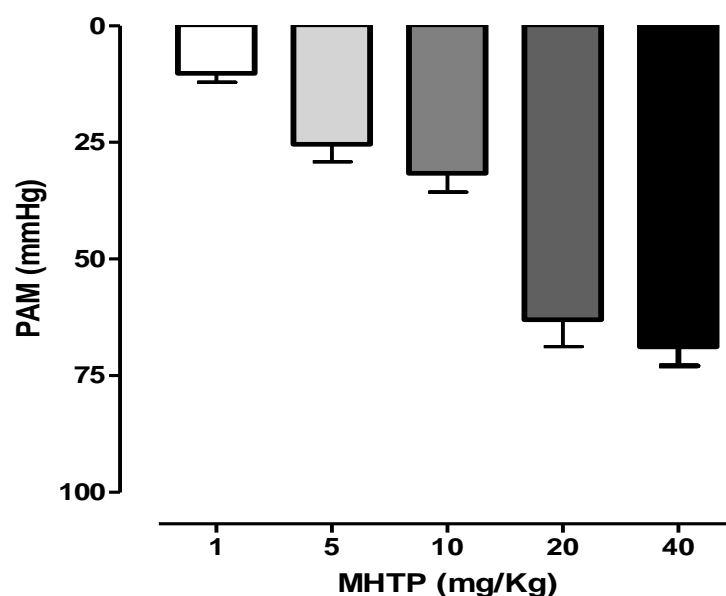


Figura 28 - Efeito hipotensor de MTHP em ratos normotensos não anestesiados. Valores expressos como média \pm e.p.m., $n=5$.

5.2.2.2 Efeito de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina ($10 \mu\text{M}$)

A pressão arterial (PA) reflete os efeitos combinados do débito e da resistência a esse fluxo oferecida pelos vasos periféricos, ou seja, representa a

pressão exercida pelo sangue contra as paredes arteriais, ela pode ser expressa pela seguinte equação: $PA = DC \times RVPT$ (resistência vascular periférica total) (McARDLE et al., 2003), assim, pode sofrer influencia de drogas que atuam sobre um, ou ambos parâmetros. Já a RVPT representa a resistência que a parede arterial impõe ao fluxo sanguíneo, e é portanto, determinada pelo diâmetro dos vasos (THRASHER, T. N., 2006). Desta forma drogas que induzem vasorrelaxamento findam em diminuir a pressão arterial.

Para avaliar se o efeito hipotensor pode ter sido ocasionado por uma diminuição na RVPT preparações de artéria mesentérica cranial foram utilizadas. Em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos com endotélio funcional, concentrações cumulativas de maneira crescente de MTHP (1 pM – 1 mM) adicionadas ao banho induziram um efeito vasorrelaxante ($E_{max} = 117,07 \pm 8,14\%$; $pD_2 = 6,44$; $n = 8$), após a remoção do endotélio funcional o efeito máximo não foi alterado ($E_{max} = 112,45 \pm 2,28\%$; $n = 11$), porém de acordo com o valor de pD_2 (4,95) a potência da droga foi significativamente diminuída demonstrando que o endotélio é fundamental no efeito induzido por MTHP (figura 29).

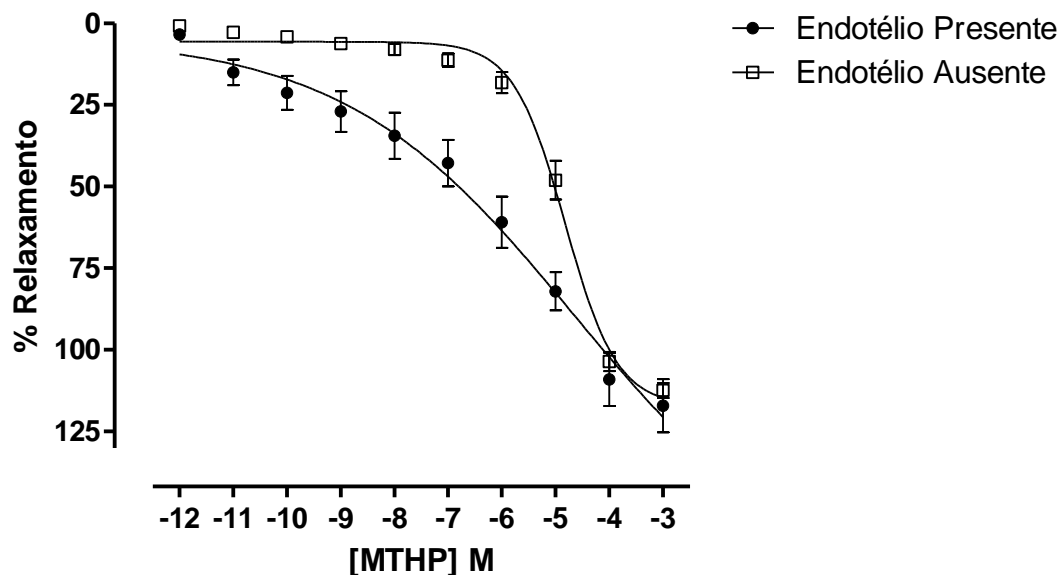


Figura 29 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraídos com FEN com e sem endotélio funcional. Valores expressos como média \pm e.p.m.

5.2.2.3 Efeito de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).

Em contrações obtidas com outro agente contraturante, solução de Tyrode modificada, com nível alto de K^+ , MTHP (1 pM – 1 mM) adicionado ao banho em concentrações cumulativas de maneira crescente induziu um efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica cranial isolada sem endotélio funcional ($E_{max} = 111,76 \pm 3,22\%$, $pD_2 = 5,05$; $n = 5$), esse efeito foi similar ao induzido por MTHP em anéis pre-contraídos com FEM ($E_{max} = 112,45 \pm 2,28\%$, $pD_2 = 4,95$; $n = 11$) (figura 30).

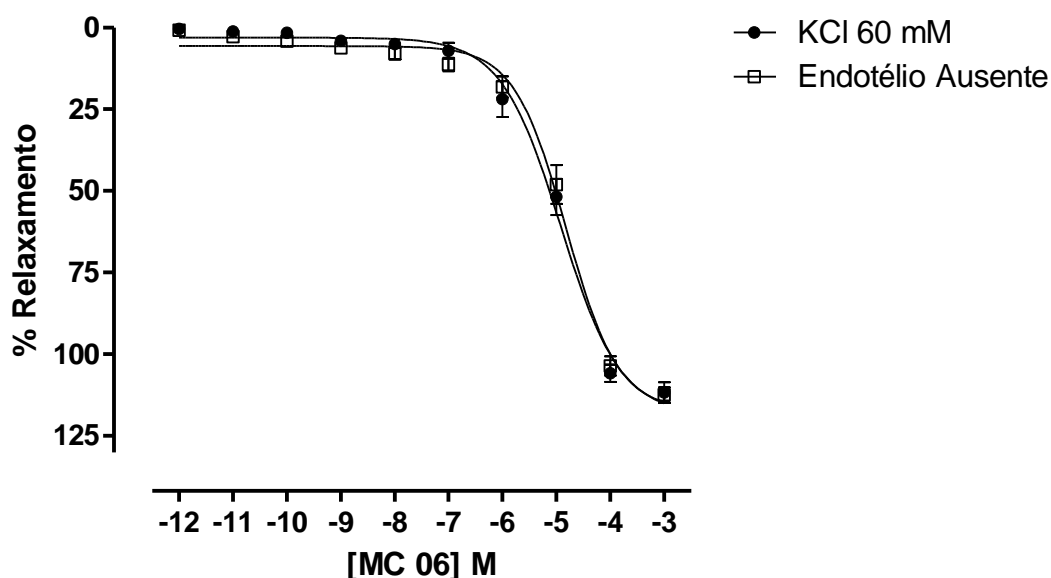


Figura 308 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com solução despolarizante KCl60 mM. Valores expressos como média \pm e.p.m.

5.2.2.4 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na resposta induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato.

O endotélio vascular secreta inúmeras substâncias biologicamente ativas, muitas dessas atuam nas células musculares dos vasos, onde modulam o tônus vascular. O mecanismo vasodilatador do endotélio é mediado pelos fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), como o óxido nítrico (NO),

prostaciclina, bradicinina, fator hiperpolarizante do endotélio (EDHF), metabólitos das cicloxigenases dentre outras (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; PALMER et al., 1987; MONCADA et al., 1991; COOKE; DZAU, 1997). Já os fatores constritores derivados do endotélio (EDCF), quando liberados, promovem contração, e incluem a angiotensina II (ANGII), endotelina (ET), prostanóides vasoconstritores, e espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (FÉIÉTOU et al., 1999; DE VRIESE et al., 2000).

A figura 31 mostra que a MTHP (1 pM – 1 mM) adicionada ao banho induziu um efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional ($E_{max} = 117,07 \pm 8,14\%$; $pD_2 = 6,44$; $n = 8$), após o bloqueio da enzima NOS o efeito máximo não foi alterado, porém a potência foi significativamente diminuída ($E_{max} = 101,03 \pm 2,76\%$; $pD_2 = 5,01$; $n = 5$).

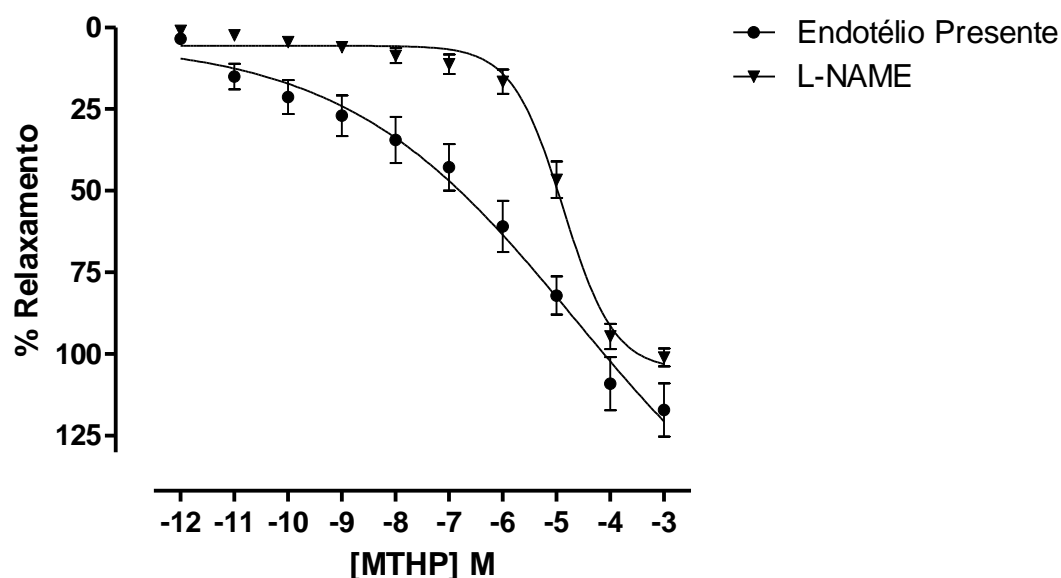


Figura 31 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional pré-contraídos com FEN na presença ou ausência de L-NAME. Valores expressos como média \pm e.p.m.

5.2.2.5 Avaliação da participação da enzima ciclase de guanilil solúvel na resposta vasorrelaxante induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato.

O NO é o principal fator vasorrelaxante proveniente do endotélio, promovendo isto principalmente pela ativação da enzima ciclase de guanilil solúvel (via NO-GMPc) (MURAD et al., 1993).

A figura 32 mostra que MTHP (1 pM – 1 mM) adicionado ao banho induziu um efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional ($E_{max} = 117,07 \pm 8,14\%$; $pD_2 = 6,44$; $n = 8$), após o bloqueio da enzima ciclase de guanilil solúvel, tanto por impedir a formação do NO, utilizando o L-NAME, como por impedir sua atuação no seu principal alvo, utilizando o ODQ o efeito máximo não foi alterado, porém a potência foi significativamente diminuída ($E_{max} = 105,84 \pm 4,34\%$; $pD_2 = 5,41$ $n = 5$), indicando que esta via parece estar sendo ativada de alguma forma por esta droga e induzindo, conseqüentemente, relaxamento.

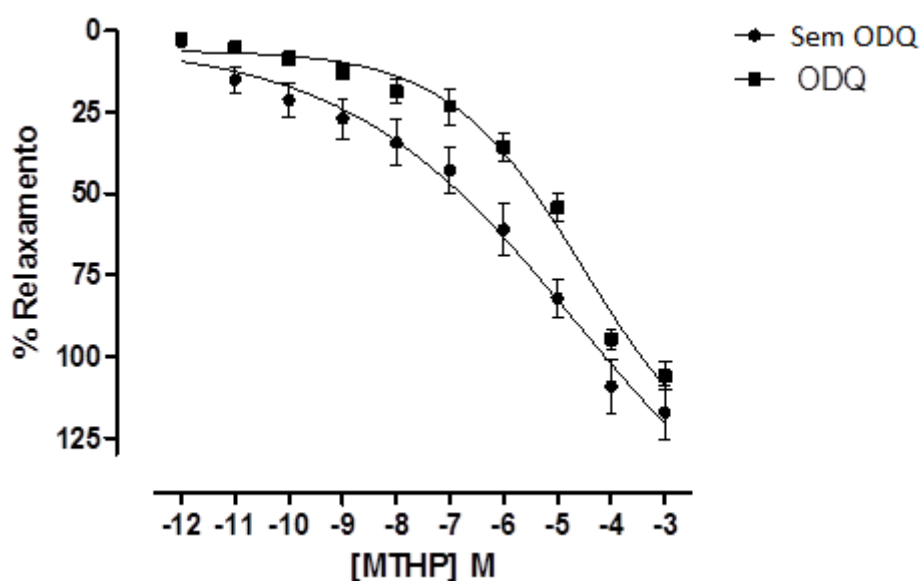


Figura 32 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional pré-contraídos com FEN na presença ou ausência de ODQ. Valores expressos como média \pm e.p.m..

5.2.2.6 Análise do efeito através da inibição das cicloxigenases sobre a resposta vasorrelaxante induzida por MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato.

Os produtos das ciclooxygenases, podem atuar de maneira a induzir vasorrelaxamento. A figura 33 mostra que a MTHP (1 pM – 1 mM) adicionada ao banho induziu um efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional ($E_{max} = 117,07 \pm 8,14\%$; $pD_2 = 6,44$; $n = 8$), após o bloqueio não específico das ciclooxygenases o efeito máximo não foi alterado, porém a potência foi significativamente diminuída ($E_{max} = 112,43 \pm 4,71\%$; $pD_2 = 5,40$ $n = 5$), levando a pensar que a droga pode estar atuando de maneira positiva na produção de metabolitos vasorrelaxantes oriundos das ciclooxygenases.

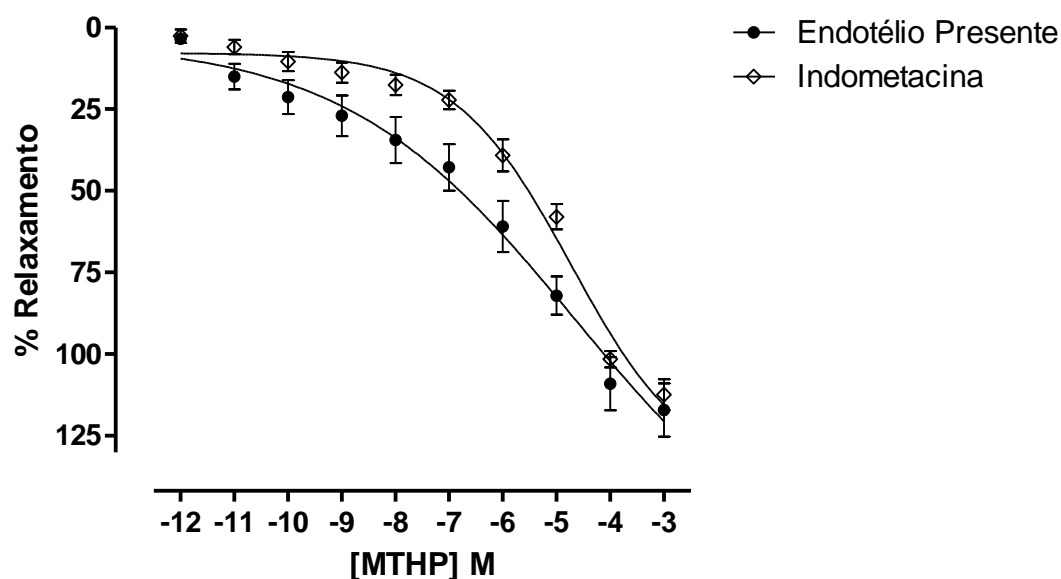


Figura 33 - Efeito vasorrelaxante de MTHP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato com endotélio funcional pré-contraídos com FEN na presença ou ausência de indometacina. Valores expressos como média \pm e.p.m.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

- ✓ Partindo-se de aldeídos e aminas comercialmente disponíveis e aplicando-se diretamente a consagrada reação de Pictet – Spengler, foram obtidos dois alcalóides fenil tetrahydroisoquinolínicos inéditos: 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina e 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina, ambos com excelente rendimento de 93,45%.
- ✓ Partindo-se de alilbenzenos comercialmente disponíveis, aplicando a reação de Limieux – Johnson para a obtenção do aldeído correspondente com subsequente submissão do mesmo à reação de Pictet – Spengler, foi obtido um alcaloide fenil tetrahydroisoquinolínico inédito: 1-(3,4metilenodioxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina e um previamente relatado: 1-(4-metoxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina, ambos com rendimento global de 50%.
- ✓ Os estudos biológicos realizados com MTHP sugerem que este composto tem efeitos anti-inflamatórios e hipotensores relacionados a diferentes mecanismos, e novos estudos são necessários para explorar seu potencial.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T. Differential effects of substrate depletion on drug induced contractions of rabbit aorta. **America Journal of Physiology**, V. 219: 1698-1705, 1970.

AMAT, M.; ELIAS, V.; LLOR, N.; SUBRIZI, F.; MOLINS, E.; BOSCH, J. A General Methodology for the Enantioselective Synthesis of 1-Substituted Tetrahydroisoquinoline Alkaloids. **European Journal of Organic Chemistry**, V.21: 4017–4026, 2010.

AWUAH, E.; CAPRETTA, A. Strategies and Synthetic Methods Directed Toward the Preparation of Libraries of Substituted Isoquinolines. **J. Org. Chem.**, V.75: 5627-5634, 2010.

BERGSTROM, F. W. Heterocyclic Nitrogen Compounds. Part IIA. Hexacyclic Compounds: Pyridine, Quinoline, and Isoquinoline. **Chem. Rev.**, V.35: 77-277, 1944

BERGMAN, M.; DJALDETTI, M.; SALMAN, H. *et al.* Inflammation and Colorectal Cancer: Does Aspirin Affect the Interaction between Cancer and Immune Cells? **Inflammation**, V. 34, n. 1: 22-28, 2011.

BHADRA, K.; KUMAR, G. S. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design. **Medicinal Research Reviews**, V.31: 821-862, 2011

BISCHLER, A.; NAPIERALSKI, B. Zur Kenntniss einer neuen Isocholinolsynthese. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, V. 26: 1903–1908, 1893

BUFAN, B.; MOJSILOVIC, S.; VUCICEVIC, D. *et al.* Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. **International immunopharmacology**, v. 9: 910-7, 2009.

CARVALHO, P. S., **Aplicação de Reações Aza-Wittig e Bischler-Napieralski na Obtenção de Intermediários Sintéticos de Alcalóides Aza-Homoaporfínicos** Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Campinas, 1995.

CHAEA, H.-J.; KIM, H.-R.; KANG, Y. J. *et al.* Heme oxygenase-1 induction by (S)-enantiomer of YS-51 (YS-51S), a synthetic isoquinoline alkaloid, inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B translocation in ROS 17/2.8 cells activated with inflammatory stimulants. **International Immunopharmacology**, V.12: 1559-1568, 2007

CHENG PI; NING HUANG; ZHI-YONG JIANG *et al.* 1-Aryltetrahydroisoquinoline analogs as active anti-HIV agents in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, V. 18, n^o. 7: 2475-2478, 2008.

CHUEH, F.-Y.; HSIEH, M.-T.; CHEN, C.-F. *et al.* Hypotensive and bradycardic effects of dl-tetrahydropalmatine mediated by decrease in hypothalamic serotonin release in the rat. **Japanese Journal of Pharmacology**, V.69: 177-180, 1995.

CHUN, Y. T.; YIP, T. T.; LAU, K. L. A biochemical study on the hypotensive effect of berberine in rats. **General Pharmacology: Vascular System**, V.10: 177-182, 1979.

CLARK, S. G.; FUCHS L. C. Role of nitric oxide and Ca²⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J Pharmacol Exp Ther** 282:1473–1479. 1997.

COOKE, J.P.; DZAU, V.J. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, arginine and cardiovascular disease. **Circulation**, 96: 379-382, 1997.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research: PTR**, V.15: 183-205, 2001.

DE VRIESE, A.S.; VERBEUREN, T. J.; VAN de VOORDE, J.; LAMEIRE, N.H.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction in diabetes. **Br. J. Pharmacol.**, V. 130: 963-974, 2000.

DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P.; BERGEAT, P. *et al.* Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E₂. **Prostaglandins**, V. 30, n. 5: 769-89, 1985.

DOI, S., SHIRAI, N.; SATO, Y. Abnormal products in the Bischler–Napieralski isoquinoline synthesis. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v.15: 2217-2222, 1997.

DONG, H.; LEE, C.-M.; HUANG, W.-L.; PENG, S.-X. Cardiovascular effects of substituted tetrahydroisoquinolines in rats. **British Journal of Pharmacology**, V.107: 262-268, 1992.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. The alternative: EDHF. **J. Moll. Cell. Cell. Cardiol.**, v. 31, n. 1: 15-22, 1999.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.B. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-376, 1980.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol Pharmacol**, 48: 184-8, 1995.

GRUNDON, M. F. The Alkaloids. **Royal Society of Chemistry**, 1976

HACKSTEIN, H.; MORELLI, A. E.; LARREGINA, A. T. *et al.* Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. **Journal of immunology**, V. 166, n. 12: 7053-62, 2001.

KOLACZKOWSKA, E.; KOZIOL, A.; PLYTYCZ, B. *et al.* Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, V. 215, n. 6: 492-504, 2010.

KUO, C.-L.; CHI, C.-W.; LIU, T.-Y. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, V. 203; 127-137, 2004.

LEITE, D. F.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S. C. *et al.* ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n. 3: 630-7, 2007.

LI, H. B.; CAI, Y.; QI, C. L.; LV, J. H. Effects and mechanism of berberine on the hypertensive renal injury rats induced by enriched high fat-salt-fructose diet. **Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials**, V.34: 412-415, 2001.

LUO, Y.; LIU, M.; DAI, Y.; YAO, X.; XIA, Y.; CHOU, G.; WANG, Z. Norisoboldine Inhibits the Production of Pro-inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells by Down-Regulating the Activation of MAPKs but Not NF- κ B. **Inflammation**, V.33: 389-397, 2010.

MANNICH, C.; E G. HEILNER "Synthese Von β -Ketobasen Aus Acetophenon, Formaldehyd Und Aminsäuren". **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, V.55 (2): 356–365, 1922

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 5° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.

MUNCHHOF, M. J.; MEYERS, A. I. A Novel Route to Chiral, Nonracemic 1-Alkyl- and 1-Aryl-Substituted Tetrahydroisoquinolines. Synthesis of (-)-Salsolidine and (+)-Cryptostyline II. **The Journal of Organic Chemistry**, V.60: 7086-7087, 1995.

MURAD, F.; FORSTERMANN, U.; NAKANE, M; POLLOCK, J.; TRACEY, R.; MATSUMOTO, T.; BUECHLER, W. The nitric oxide-cyclic GMP signal

transduction system for intracellular and intercellular communication. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.** 28:101-9, 1993.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.

PAPPO, R.; ALLEN, J.; LEMIEUX, R. U.; JOHNSON, W. S. Notes - Osmium Tetroxide-Catalyzed Periodate Oxidation of Olefinic Bonds. **The Journal of Organic Chemistry**, V. 21: 478-479, 1956.

PICTET, A.; SPENGLER, T. Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, V.44:2030–2036., 1911.

PREININGER, V. Chapter 1 Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. **The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology** V.29: 1-98, 1986

QUEVEDO, R.; BAQUERO, E.; RODRIGUEZ, M. Regioselectivity in isoquinoline alkaloid synthesis. **Tetrahedron Letters**, V.51:1774-1778, 2010.

SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, G. C. Clivagem oxidativa de ligações duplas carbono-carbono. Álcoois alílicos um caso particular. **Química Nova**, V.15(3): 211-218, 1992.

SHAMMA, M. The Isoquinoline Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. **Academic Press**, 1972.

SILVA, D. F.; PORTO, D. L.; ARAÚJO, I. G. *et al.* Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant effects induced by discretamine in rats. **Pharmazie**, V.64: 327-331, 2009.

SPERLINGA, E.; KOSSON, P.; URBANCZYK-LIPKOWSKA, Z. *et al.* 6-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline-3-carboxylic acid mimics active conformation of tyrosine in opioid peptides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, V.15: 2467-2469, 2005.

STÖCKIGT, J.; ANTONCHICK, A. P.; WU, F. *et al.* The Pictet-Spengler Reaction in Nature and in Organic Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, V. 50:8538-8564, 2011.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; SHIGENOBU, K.; Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **Br. J. Pharmacol.** 128: 1602-1608. 1999.

THRASHER, T.; Arterial baroreceptor input contributes to long-term control of blood pressure. **Curr. Hypertens. Rep.**, V.8 (3): 249-54, 2006.

VANDEN EYNDEN, M. J.; STAMBULI, J. P. Calcium-Catalyzed Pictet–Spengler Reactions. **Org. Lett.**, V. 10; 5289-5291, 2008.

VIEIRA, A. S., **Síntese estereosseletiva de α -fenilseleno- β -amino ésteres pela reação do tipo-Mannich e efeito promotor de tiofenol na reação de Pictet-Spengler**. Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

WANG, ZERONG. “Lemieux-Johnson Oxidation”. In **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**, 2010 John Wiley & Sons, Inc. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470638859.conrr389/abstract>.