

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Síntese de 3,4-diidropirimidin-2(1H)-tionas N-1 aril substituídas com
potencial atividade antitumoral

ITAMAR LUÍS GONÇALVES

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Síntese de 3,4-diidropirimidin-2(1H)-tionas N-1 aril substituídas
com potencial atividade antitumoral**

Dissertação apresentada por Itamar Luís Gonçalves para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Eifler-Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano

Porto Alegre, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20.07.2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Dyeison Antonow

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Dr. Fabrício Figueiró

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a Gilsane Lino Von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Gonçalves, Itamar Luís

Síntese de 3,4-diidropirimidin-2(1H)-tiones N-1 aril substituídas com potencial atividade antitumoral / Itamar Luís Gonçalves. -- 2016.
191 f.

Orientadora: Vera Lucia Eifler-Lima.

Coorientador: Daniel Fabio Kawano.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. planejamento de fármacos. 2. reação de Biginelli. 3. atividade antineoplásica. 4. diidropirimidinonas. I. Eifler-Lima, Vera Lucia , orient. II. Kawano, Daniel Fabio, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, ao Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (UFRGS) e ao Laboratório 22 do Departamento de Bioquímica (UFRGS), que disponibilizaram equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela compreensão e educação que recebi ao longo dos anos.

Às pessoas especiais com as quais tive contato durante a graduação, e em considerável parte contribuíram para minha formação em diferentes aspectos.

Aos professores Vera Lucia Eifler-Lima e Daniel Fábio Kawano pela colaboração ao presente trabalho, e recepção.

Aos meus colegas de bancada/laboratório, pelas discussões produtivas, e pelas horas de descontração, Gabriel, Guilherme, Thomas, Anna, Fabiana, Thaís, Gustavo Luciano, Maristela, Isabel e Mariana.

Ao grupo da professora Ana Maria Oliveira Battastini, pela colaboração na presente investigação, bem como por consecutivas colaborações.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilização de infraestrutura, acesso às bases de dados de periódicos, e profissionais qualificados com os quais tive contato durante a pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

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

Aos membros da banca examinadora, por se disponibilizarem em participar deste momento, e contribuir com o presente trabalho.

A todos que de alguma forma colaboram para a execução do presente trabalho, e anteriormente não foram mencionados.

RESUMO

Introdução: A partir da descoberta da reação de Biginelli, diidropirimidinonas/tionas funcionalizadas têm se destacado como protótipos no desenvolvimento de fármacos, considerando diferentes alvos. O primeiro representante deste grupo de moléculas, com ação inibitória sobre a divisão celular, foi o monastrol, o qual é caracterizado como um inibidor alostérico da cinesina mitótica 5 (Eg5). Este mecanismo de ação representa um alvo promissor para a terapia antineoplásica, considerando que a Eg5 é uma proteína motora envolvida no movimento dos microtúbulos durante a divisão celular. Recentes investigações mostraram que a inserção de um anel aromático no N-1 do núcleo diidrotiopirimidínico seria capaz de otimizar a interação do ligante com a Eg5. **Objetivos:** Nesse sentido, a presente pesquisa teve por objetivo obter diidropirimidin-2-tionas N-1 aril substituídas, e avaliar seu potencial antiproliferativo em células de glioma. **Métodos:** Foi sintetizada uma quimioteca de 26 diidropirimidin-2-tionas N-aril substituídas, através da reação de Biginelli promovida por cloreto de trimetilsilano, utilizando uma série de ariltioureas previamente obtidas. A partir da análise do *docking* destes compostos com a Eg5, foram selecionados 4 deles para avaliação da atividade citotóxica em linhagem celular de glioma, utilizando o ensaio MTS. **Resultados:** Os derivados do monastrol substituídos em N-1 com 4NO₂-Ar (LaSOM 301) e 4OMe-Ar (LaSOM 309) foram mais ativos que o monastrol na linhagem celular investigada. Enquanto o monastrol apresentou valor de IC₅₀ superior à 100 µM, os compostos LaSOM 301 e LaSOM 309 apresentaram valores de IC₅₀ de respectivamente 54,69 ± 4,92 µM e 57,74 ± 2,78 µM. Adicionalmente, o composto LaSOM 308, embora isento da hidroxila em *meta*, presente no monastrol, e N-1 substituído com 4OMe-Ar apresentou valor de IC₅₀ inferior ao monastrol (78,26 ± 4,18 µM). **Conclusões:** As condições reacionais utilizadas, permitiram a funcionalização do N-1 de diidropirimidin-2-tionas com diferentes substituintes. A inserção de um anel aromático substituído no N-1, do núcleo diidrotiopirimidínico consistiu em uma modificação estrutural capaz de gerar compostos com atividade antineoplásica, superior ao monastrol.

Palavras-chave: planejamento de fármacos, reação de Biginelli, atividade antineoplásica

ABSTRACT

Introduction: Since the Biginelli reaction discovery, functionalized dihydropyrimidinones/thiones have been emerged as prototypes for drug design in different targets. Monastrol was the first representative molecule of this group with inhibitory effect on cell division, which produces kinesin-5 (Eg5) inhibition. This action of mechanism is a promising target for anticancer therapy, whereas the motor protein Eg5 is involved in microtubule movement during the cell division. Recent results showed that the aromatic ring at N-1 position of dihydrothiopyrimidinic core would be able to optimize the interaction of the ligand with the Eg5. **Objectives:** In this context, this study aimed to obtain dihydropyrimidin-2-thiones N-1 aryl substituted, and to evaluate their antiproliferative activity on glioma cells. **Methods:** A chemical library of 26 dihydropyrimidin-2-thiones N-1 aryl substituted were synthesized employing the Biginelli reaction promoted by trimethylchlorosilane. Considering the results of docking analysis of these compounds with Eg5, four of them were selected for cytotoxic activity assessment on glioma cells, employing MTS assay. **Results:** The monastrol derivatives N-1 substituted with 4NO₂-Ph (LaSOM 301) and 4OMe-Ph (LaSOM 309) showed higher activity than monastrol, in cell line studied. While monastrol showed IC₅₀ value higher than 100 μM, LaSOM 301 and LaSOM 309 compounds showed IC₅₀ values of 54.69 ± 4.92 μM and 57.74 ± 2.78 μM, respectively. Nevertheless, the LaSOM 309 compound, without hydroxyl group present in monastrol, and with N-1 4OMe-Ph substituted also showed IC₅₀ value lower than monastrol (78.26 ± 4.18 μM). **Conclusions:** Reactional conditions employed in these research, allowed the N-1 functionalization of dihydropyrimidin-2-thiones, with several substituents. The insertion of a substituted aromatic ring at N-1 position, of dihydrothiopyrimidinic core, was a structural change able to generate compounds with antineoplastic activity, higher than monastrol.

Key-words: drug design, Biginelli reaction, antiproliferative activity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	22
1.1. Alvos para terapia antineoplásica	22
1.2. Desenvolvimento de inibidores da Eg5	23
1.2.1. Diidropirimidinonas como potenciais ligantes para Eg5.....	25
Referências	29
2. OBJETIVOS	32
3. CAPÍTULO 1 – SÍNTESE DE 3,4-DIIDROPIRIMIDIN-2(1H)-TIONAS N-1 ARIL SUBSTITUÍDAS	34
3.1. Introdução	34
3.1.1. Reação de Biginelli	34
3.1.2. Aspectos mecanísticos da reação de Biginelli	35
3.1.3. Síntese de diidropirimidinonas/tionas N-1 substituídas.....	37
3.1.4. Preparação das tioureias substituídas	41
3.2. Resultados e discussão	43
3.2.1. Obtenção de ariltioureias	43
3.2.2. Síntese de diidropirimidin-2-tionas N-1 aril substituídas	44
3.2.3. Discussão dos espectros de RMN de hidrogênio e carbono	49
3.2.4. Bandas características observadas nos espectros no infravermelho	54
3.2.5. Cálculos dos descritores moleculares para a regra dos 5 de Lipinski.....	56
3.3. Materiais e métodos	57
3.3.1. Método geral para síntese de ariltioureias 162a-n.....	57
3.3.2. Protocolo geral para síntese de diidropirimidinonas N-1 aril substituídas 164a-n e 165a-n.....	58
3.3.4. Cálculos dos descritores moleculares para a regra dos 5 de Lipinski.....	58
3.3.5. Caracterização dos compostos.....	58
3.4. Conclusões	69
Referências	70

4. CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTIEOPLÁSICA DE 3,4-DIIDROPIRIMIDIN-2-TIONAS N-1 ARIL SUBSTITUÍDAS EM LINHAGEM DE GLIOMA C6	74
4.1. Introdução	74
4.1.2. Investigações anteriores do LaSOM relacionadas ao efeito antineoplásico de diidropirimidinonas/tionas	75
4.2. Resultados e discussão	77
4.2.1. Seleção dos compostos	77
4.2.2. Viabilidade celular	77
4.2.3. Ciclo celular	79
4.3. Material e métodos.....	83
4.3.1. Ensaio de viabilidade celular.....	83
4.3.2. Avaliação do ciclo celular.....	83
4.3.3. Análise dos dados.....	83
4.4. Conclusões	84
Referências.....	84
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	88
ANEXOS	90
ANEXO 1 – Moléculas obtidas	90
ANEXO 2 – Dados espectrais.....	92
ANEXO 3 – Manuscrito submetido para o periódico <i>Tetrahedron</i> - Thioureas as Building Blocks for Generation of Heterocycles and Compounds with Pharmacological Activity	158

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de ação dos fármacos que afetam a dinâmica dos microtúbulos. A colchicina age inibindo a polimerização dos microtúbulos, embora liga-se à um sítio diferente ao dos alcaloides da vinca.	22
Figura 2 - Estrutura do monastrol	23
Figura 3 - Inibidores não diidropirimidínicos da Eg5 que passaram por ensaios clínicos.	24
Figura 4 - Produtos naturais com atividade inibitória sobre a Eg5.....	25
Figura 5 - Análogos da S-tritilcisteína com atividade sobre a Eg5.....	25
Figura 6 - Derivados do monastrol com atividade antineoplásica sobre Eg5	26
Figura 7 - Interações intermoleculares do monastrol com sítio de ligação da Eg5, identificando três bolsões hidrofóbicos existentes na proteína que podem ser explorados pelo inibidor (Figura gerada utilizando o programa Discovery Studio Visualizer 3.1)	27
Figura 8 - Núcleo diidropirimidínico com destaque aos substituintes alvo de grande fração das investigações que visam a realização de modificações moleculares em diidropirimidinonas.....	28
Figura 9 - Estratégia geral para obtenção de diidropirimidin-2-tionas N-1 aril funcionalizadas	32
Figura 10 - Reação de Biginelli.....	34
Figura 11 - Produção científica relacionada a diidropirimidinonas nas últimas duas décadas, na base <i>web of science</i> . A pesquisa foi realizada utilizando os termos " <i>Biginelli</i> ", " <i>dihydropyrimidinones</i> "; " <i>3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones</i> " " <i>dihydropyrimidinethiones</i> " e " <i>3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thiones</i> ".	35
Figura 12 - Mecanismos possíveis para a reação de Biginelli. Em (a) mecanismo em que inicia-se pela condensação do aldeído com a (tio)ureia envolvendo a formação de um íon inimum, em (b) a primeira etapa consiste em uma condensação de Knoevenagel, e em (c) a primeira etapa envolve a formação de uma enamina.	36
Figura 13 - N-3 acilação de DHPM.....	37
Figura 14 - Alquilação seletiva do N-1 de diidropirimidinonas via reação de Mitsunobu ..	37
Figura 15 - Síntese de DHPMs N1-alquiladas utilizando diferentes protocolos.....	38
Figura 16 - Síntese de diidropirimidin-2-tionas N-1 funcionalizadas empregando TMSCl como agente promotor da reação	39
Figura 17 - Recentes modificações efetuadas em N-1 do núcleo diidropirimidínico.....	39
Figura 18 - DHPMs N-1 substituídas com atividade farmacológica	40
Figura 19 - Aspectos mecanísticos da reação de Biginelli promovida por TMSCl.....	41
Figura 20 - Síntese de tioureias substituídas.....	42
Figura 21 - Síntese de tioureias substituídas.....	42
Figura 22 - Síntese de ariltioureias. (i) acetona, refluxo, 15 min; (ii) acetona, refluxo, 30 min; (iii) hidróxido de sódio, 5-10% 10-30 min.....	43
Figura 23 - Síntese de diidropirimidin-2-tionas N-1 aril substituídas. (i) DMF, ultrassom, 1 h; TMSCl temperatura ambiente 48-72 h.....	45
Figura 24 - Compostos em que foram observados sinais duplicados nos espectros de RMN C^{13}	48

Figura 25 - Reações em que os produtos não foram obtidos com êxito. (i) DMF, ultrassom, 1 h; TMSCl temperatura ambiente 48-72 h.....	48
Figura 26 - Diidropirimidin-2-tionas N-1 aril substituídas previamente obtidas	49
Figura 27 - Espectro de RMN H^1 em 60 MHz do composto 165-a (LaSOM 305) em $CDCl_3$	50
Figura 28 - Experimento HECTOR do composto 165-g (LaSOM 301).	52
Figura 29 - Espectro de RMN C^{13} desacoplado do composto 165-a (LaSOM 305).....	53
Figura 30 - Valores aproximados de deslocamento químico observados nos espectros de RMN H^1 (a) e C^{13} (b) na série de compostos sintetizados.	53
Figura 31 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 164-f (LaSOM 308).	56
Figura 32 - Distribuição dos valores de logP e peso molecular para os compostos sintetizados. (■) série com 3-OHAr em C-4 do núcleo diidropirimidínico; (□) série com anel aromático não substituído em C-4 do núcleo diidropirimidínico. Na direita de cada ponto, encontra-se especificado o substituinte do anel aromático ligado ao N-1.	57
Figura 33 - DHPMs previamente obtidas pelo grupo de pesquisa.....	76
Figura 34 - Compostos que tiveram seu efeito avaliado sobre a proliferação celular em cultura de glioma.....	77
Figura 35 - Efeito dos análogos do monastrol sobre a viabilidade celular em linhagem de glioma murino C6. Em (a) monastrol, em (b) LaSOM 301, em (c) LaSOM 289, em (d) LaSOM 308 e em (e) LaSOM 309. O valor expresso representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * diferente em relação ao grupo DMSO com valor de $p < 0,05$; ** diferente em relação ao grupo DMSO com valor de $p < 0,01$; *** diferente em relação ao grupo DMSO com valor de $p < 0,001$; **** diferente em relação ao grupo dmsO com $p < 0,0001$, considerando a anova seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	78
Figura 36 - Sobreposição dos perfis de viabilidade celular da linhagem de glioma C6 em função da concentração dos compostos avaliados. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.....	79
Figura 37 - Histogramas de distribuição da população de células analisada em relação ao estágio do ciclo celular. Em (a) células de glioma C6 foram tratadas com DMSO, em (b) com monastrol 100 μm , em (c) com o composto LaSOM 301 50 μm e em (d) com o composto LaSOM 309 50 μm	80
Figura 38 - Comparação da distribuição da população de células analisadas em relação ao estágio do ciclo celular. Células de glioma C6 foram tratadas com monastrol 100 μm , LaSOM 301 e LaSOM 309 50 μm . Depois da marcação com iodeto de propídio, a caracterização do ciclo celular foi realizada através da citometria de fluxo. Valores de cada população de células foram expressos em média \pm desvio padrão, e determinados a partir da medida digital da área do histograma. **** a população de células na fase G_2/M foi diferente em relação ao DMSO com $p < 0,0001$	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ariltioureias sintetizadas	44
Tabela 2 - Diidropirimidin-2-tionas N-1 aril substituídas sintetizadas.....	45
Tabela 3 - Valores de deslocamento químico e multiplicidade visualizados nos espectros de RMN H ¹ em 60 MHz	51
Tabela 4 - Valores característicos dos estiramentos presentes nos compostos sintetizados	55
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ para a diminuição da viabilidade celular da linhagem de glioma C6 pelos compostos avaliados	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	Attenuated total reflectance
DHPM	Diidropirimidinona
DMF	Dimetilformamida
Ecto-5'NT	Ecto-5'-nucleotidase
Eg5	Cinesina mitótica 5
Fase S	Fase <i>Synthesis</i> do ciclo celular
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
G ₁	Fase Gap 1 do ciclo celular
G ₂	Fase Gap 2 do ciclo celular
G ₂ /M	Fase Gap2 do ciclo celular/ mitose
Hz	Hertz
IC ₅₀	Valor de concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática, viabilidade ou proliferação celular
³ J	Constante de acoplamento via três ligações
² J	Constante de acoplamento via duas ligações
LaSOM	Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal
MTS	sal de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
ppm	Partes por milhão
RMN C ¹³	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN H ¹	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
TMSCI	Cloreto de trimetilsilano

EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS

Análises Cromatográficas

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica Merck 60 F254. As separações desenvolvidas por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando Sílica Gel 60 para coluna cromatográfica 0.063-0.2 mm marca Fluka.

Determinação do Ponto de Fusão (PF)

As análises de ponto de fusão foram realizadas no equipamento Fisatom Mod.431 (São Paulo, Brasil), pertencente ao LaSOM/UFRGS, e não foram corrigidas.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN H^1 e RMN C^{13} foram obtidos em espectrômetro Anasazi operando na frequência de 60 MHz e 15 MHz, respectivamente. Os dados foram adquiridos conforme os parâmetros fornecidos pelo equipamento e processados no *software* MestRenova 6.0.2. Os valores de deslocamento químico foram expressos em partes por milhão (ppm), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os solventes utilizados nas análises foram DMSO- d_6 e $CDCl_3$. As constantes de acoplamento estão representadas pela letra *J* e expressas em Hz. As notações utilizadas para a multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN H^1 foram: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), e m (multiplete).

Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

As análises foram realizadas no Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) modelo Spectrum BXII marca Perkin Elmer, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com a utilização de ATR. As vibrações axiais e angulares foram expressas em cm^{-1} .

1. INTRODUÇÃO GERAL

O conteúdo das páginas 22 até 31 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

2. OBJETIVOS

Sintetizar diidropirimidin-2-tionas N-1 aril substituídas inéditas na literatura, derivadas do monastrol, com potencial atividade inibitória sobre a cinesina mitótica Eg5, e efetuar estudos *in vitro* para avaliar sua atividade sobre a viabilidade de células de glioma.

A estratégia utilizada para a obtenção de diidropirimidin-2-tionas N-1 aril funcionalizadas envolveu a prévia obtenção de ariltioureas com diferentes substituintes, as quais foram empregadas como blocos de construção na reação de Biginelli. Esta abordagem encontra-se resumidamente descrita na Figura 9.

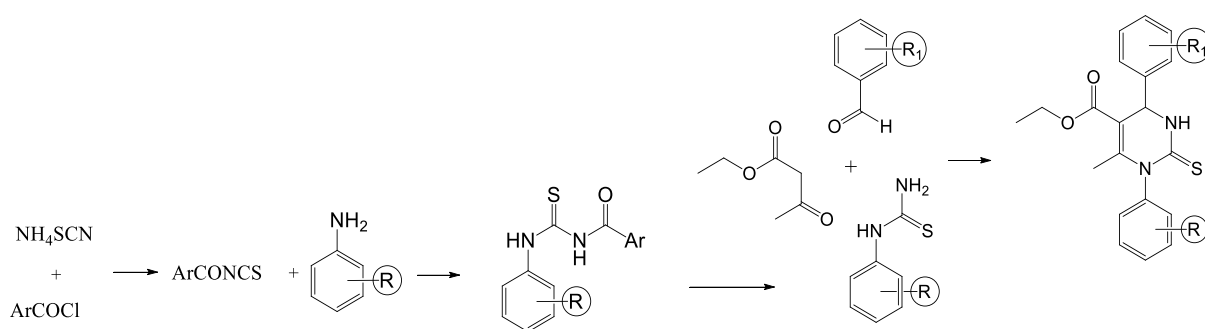


Figura 1 - Estratégia geral para obtenção de diidropirimidin-2-tionas N-1 aril funcionalizadas.

3. CAPÍTULO 1 – SÍNTESE DE 3,4-DIIDROPIRIMIDIN-2(1H)-TIONAS N-1 ARIL SUBSTITUÍDAS

O conteúdo das páginas 34 até 73 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

4. CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTIEOPLÁSICA DE 3,4-DIIDROPIRIMIDIN-2-TIONAS N-1 ARIL SUBSTITUÍDAS EM LINHAGEM DE GLIOMA C6

O conteúdo das páginas 74 até 87 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O conteúdo das páginas 88 até 89 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

ANEXOS

ANEXO 1 – Moléculas obtidas

O conteúdo das páginas 90 até 91 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

ANEXO 2 – Dados espectrais

O conteúdo das páginas 92 até 157 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

ANEXO 3 – Manuscrito submetido para o periódico *Tetrahedron* - Thioureas as Building Blocks for Generation of Heterocycles and Compounds with Pharmacological Activity

O conteúdo das páginas 158 até 191 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.