

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

**Síntese de diidropirimidinonas análogas ao Monastrol e avaliação pré-clínica do
LaSOM 65**

Rômulo Faria Santos Canto

Porto Alegre, Janeiro de 2010.

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

**Síntese de diidropirimidinonas análogas ao Monastrol e avaliação pré-clínica do
LaSOM 65**

Dissertação apresentada pelo acadêmico
Rômulo Faria Santos Canto para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Vera LuciaEifler-Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Dennis Russowsky

Porto Alegre, Janeiro de 2010.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 12.01.2010 pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adrianna Raffin Pohlmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Dyeison Antonow
University of London

Prof. Dr. Eduardo Rolim de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

C232s Canto, Rômulo Faria Santos

Síntese de diidropirimidinonas análogas ao monastrol e avaliação pré-clínica do LaSOM 65 / Rômulo Faria Santos Canto. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xvi, 281 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Diidropirimidinonas. 2. Trietilortoformato. 3. Atividade antifúngica. 4. Antineoplásicos. 5. Farmacocinética 6. Síntese orgânica. I. Lima, Vera Lucia Eifler. II. Russowsky, Denis. III. Título.

CDU: 547.05

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos sem a qual este trabalho não seria possível, e aos Laboratórios de Síntese Orgânica Medicinal, K-210 (IQ-UFRGS), Laboratório 22 do Departamento de Bioquímica (UFRGS), Gene Targeted Drug Design Research Group (University of London), Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos (UFPE), Departamento de Química Orgânica (UCA-ES), Laboratório do Setor de Acarologia Entomologia (Veterinária-UFRGS), e ao Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM-UFRGS) que disponibilizaram equipamentos, materiais e mão-de-obra especializada para a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente um agradecimento especial à minha esposa Andrea, que sempre esteve ao meu lado, tanto nas horas boas quanto nas ruins, me dando incentivo e amor incondicional.

À minha mãe Dora que nunca me deixou faltar nada e me transmitiu todas as condições (genéticas e ambientais) para que pudesse seguir o rumo do conhecimento.

Aos meus amigos e familiares, os próximos e os nem tão próximos que ajudaram a moldar o ser que sou hoje. Vó Célia e vô Doralvo, tios Doralvino e Sara, Niça e Sérgio, Nanci e Carlos Eduardo, Beto e Ana, Ricardo e Conceição, Helson e Bebete, Bia e Marco Antônio. Primos Dani, Maurício, Xandi, Karen, Celena, Fábio, Gu (Gamen), Camila, Dado, Aninha, Ricardinho, Rogerinho, Robertinho, André e Anne. Frederico, Meleca, Janvier, Pitú e Lavoisier. Salete, Nilza, Xú, Leo, Alexandre, Aline e Nina (PG). Anna, Lica, Márcia, Maria Olinda, Tia Rosa e aos demais.

Aos meus orientadores Vera e Dennis, obrigado pela oportunidade de desenvolver minhas capacidades e pela orientação. Pela iniciação no mundo acadêmico e científico. Pelas comemorações e discussões, principalmente aquelas regadas a trago nos bares por aí, onde a criatividade é posta à tona.

Aos meus colegas de faculdade e laboratório ao longo destes anos. Thiaguinho, Cedric, Stela, Mônica, Daia, Maristela, Allan, Felipe, Elisa, Grace, Madson, Fabrício, Francine, Damiana, Flávia, Flavinha, Ju, Tiago, Mozu, Cris, Mariane, Maurício, Pablo e todos os outros, não necessariamente nesta ordem.

Ao pessoal que dedicou seu tempo às análises dos compostos, Cris, Dennis, Maristela, Joyce e aos alunos de IC que tiveram que aprender a fazer os p.f. tantas vezes.

A todos os grupos de pesquisa e professores que embarcaram em parcerias, nem sempre tão produtivas, ou que de alguma forma me propiciaram a oportunidade de vivenciar novas áreas de pesquisa e conhecimentos. Ana e Andressa e o pessoal da BQ, Teresa e Flávia e o pessoal do CBIM, Gilsane e Sandra e o pessoal da Fito, Germani e o pessoal da TecBio, Vera Ribeiro e o pessoal da Veterinária, Thurson e Dieyson e o pessoal de Londres, Stela e o pessoal da farmaco, Teresinha e o pessoal de PE, Edu, Aloir, Paulo, Joel, Marco Antônio, Régis e o pessoal do IQ, Hugo e Walter (BioTec), muito obrigado pela oportunidade.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”

Winston Churchill

RESUMO

Diidropirimidinonas são uma classe de compostos que apresentam atividade sobre diversos sistemas biológicos. Este trabalho objetivou realizar a síntese de DHPMs e submetê-las a triagem farmacológica para a identificação de protótipos antitumorais, antifúngicos, e carrapaticidas. Foi avaliado o papel do trietilortoformato como promotor da reação de Biginelli e a metodologia desenvolvida possibilitou a obtenção de 26 DHPMs com diversos padrões de substituição em bons rendimentos (64-97%). A reatividade das DHPMs foi investigada. Reações de S-alquilação levaram a 4 compostos em rendimentos de moderados a bons (58-99%). Foram obtidas as DHPMs contendo acetila no N3, COOH e amida no C5 em rendimentos de 35, 95 e 62%, respectivamente. Também foi desenvolvida uma rota convergente de síntese em fase sólida de DHPMs contendo diaminas como substituintes na posição 5. Reações de guanilação sobre DHPMs possibilitaram a síntese de uma 2-alquilamino-DHP inédita em 51% de rendimento. 14 compostos foram avaliados de forma inédita quanto à sua ação na proliferação de células tumorais de glioma humano (U118-MG) e murino (C6), e todos os compostos apresentaram ação antiproliferativa. Além disso, 3 compostos apresentaram ação superior ao Monastrol em ambas linhagens tumorais, e 5 apresentaram ação superior a este na linhagem humana. A avaliação inédita do mecanismo de ação antitumoral sobre a telomerase através da avaliação da capacidade estabilizante sobre sequências de DNA quadruplex com 12 DHPMs sintetizadas demonstrou que estes compostos não exercem efeito citotóxico através deste mecanismo. 4 compostos foram avaliados de forma inédita quanto à ação antitumoral em modelo animal de Sarcoma-180, demonstrando ótima atividade de inibição do crescimento tumoral (48-76%) na dose de 90mg/kg e baixa toxicidade. Os parâmetros farmacocinéticos do composto mais ativo foram determinados através de análise não-compartimental pela via iv (1 mg/kg) e ip (30 e 90 mg/kg), apresentando alta biodisponibilidade (71%) e perfil farmacocinético linear. 20 DHPMs foram avaliadas de maneira inédita quanto à atividade antifúngica sobre os fitopatógenos *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* e 9 delas apresentaram boa atividade de inibição (>60%). A atividade larvicida e ovicida sobre carrapatos da espécie *Ripicephalus (Boophilus) Microplus* foi avaliada de forma inédita para 8 DHPMs, e nenhuma das moléculas foi capaz de matar as larvas ou inibir a eclosão dos ovos destes ectoparasitas.

Palavras-chave: Diidropirimidinonas, trietilortoformato, agente antitumoral, atividade antifúngica, farmacocinética

ABSTRACT

Synthesis of Dihydropyrimidinones Monastrol analogues and pre-clinical evaluation of LaSOM 65

Dihydropyrimidinones are a class of compounds presenting wide range of pharmacological activities. The aim of this work was to synthesize a library of DHPM analogues and screen this library for potential anticancer, antifungal and acaricidal drug prototypes. Triethylorthoformate was evaluated to promote the Biginelli reaction and 26 DHPM were obtained in good yields (64-97%). The reactivity of these compounds was investigated in alkylation, acylation, guanylation, and hydrolysis reactions. S-alkylation gave 4 compounds in moderate to high yields (58-99%). DHPM containing N3-acetyl, C5-COOH and C5-amide as substituent were synthesized in 35, 95, and 62%, respectively. A convergent route of solid-phase organic synthesis toward C5-amide DHPM derivatives was also developed. A new 2-alkylamino-DHP was obtained in 51% yield through guanylation reaction. 14 compounds were evaluated for their antiproliferative properties against human (U118-MG) and murine (C6) glioma cell lines. All 14 compounds showed antiproliferative activity in both cell lines compared to control. Three compounds were more active than Monastrol in both cell lines and five (LaSOM 63, 65, 74, 75 and 77) in the human cell line. The stabilization potential of DNA-quadruplex sequences of 12 DHPMs was investigated for the first time. None of the tested compounds showed appreciable activity in this assay, what indicates that their cytotoxic activity is not related to telomerase inhibition. 4 compounds (LaSOM 61, 63, 64 and 65) were investigated as anticancer agents in the Sarcoma-180 animal model. The results showed high inhibition of tumor grown (48-76%, 90 mg/kg, indicated by weight loss) and low levels of toxicity. Pharmacokinetic parameters were determined for the more active compound through non-compartmental analysis of iv (1 mg/kg) and ip (30 and 90 mg/kg) routes of administration and showed linear pharmacokinetics and high bioavailability (71%). 20 DHPMs were evaluated as antifungal agents against *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* phytopatogens and 9 of them showed promising inhibitory activity (>60%). 8 DHPMs were evaluated as acaricidal agents over eggs and larvae of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*. However, none of the compounds showed activity in this assay.

Keywords: Dihydropyrimidinones, triethylorthoformate, anticancer agents, antifungal activity, pharmacokinetics

Índice de Figuras

Figura 1. Variedade estrutural obtida a partir da reação de Biginelli	7
Figura 2. Intermediários isolados da reação de Biginelli	18
Figura 3. Pontos de ancoramento das DHPMs às resinas utilizadas na SOFS	20
Figura 4. Pontos de modificação das DHPMs.....	24
Figura 5. Material utilizado para a síntese em paralelo das DHPMs	53
Figura 6. Poliaminas naturais.....	79
Figura 7. Espectro de IV da resina Wang	83
Figura 8. Espectro de IV do carbonato ligado à resina Wang 260.....	84
Figura 9. Espectro de subtração entre o carbonato ligado à resina Wang 260 e a resina Wang.....	85
Figura 10. Espectro de IV (ATR) de 262	86
Figura 11. Espectro de IV (ATR) de 264	86
Figura 12. Espectro de IV (ATR) de 267	88
Figura 13. Espectro de IV (ATR) de 270	89
Figura 14. Espectro IV (ATR) da resina após a reação de clivagem.....	90
Figura 15. Espectro de IV (ATR) do produto 275.....	91
Figura 16. Espectro de massas (ES+, SCAN) do bruto reacional isolado na síntese de 271.....	91
Figura 17. Fases do ciclo celular, mostrando microtúbulos em verde e material genético em azul	127
Figura 18. Monastrol e o fenótipo apresentado pelo fuso mitótico após tratamento.	128
Figura 19. Análogos bicíclicos do Monastrol	129
Figura 20. Alguns inibidores da cinesina Eg5 reportados até o momento.....	130
Figura 21. Estrutura molecular do LaSOM 64	131
Figura 22. Esquema de relação estrutura-atividade das DHPMs em relação à inibição da cinesina Eg5.....	131
Figura 23. DHPMs testadas como carrapaticidas contra a espécie <i>Ripicephalus (Boophilus) Microplus</i>	136
Figura 24. Morangos e uvas infectados por <i>Botrytis cinérea</i>	138
Figura 25. Mamão e manga infectados por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	139
Figura 26. DHPMs avaliadas nos ensaios antifúngicos.....	140
Figura 27. DHPMs sintetizadas testadas contra linhagens celulares de glioma murino C6 e humano U118-MG.	146
Figura 28. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma de rato C6 em 24h.	148
Figura 29. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma humano U138-MG em 24h.....	148
Figura 30. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma de rato C6 em 48h.	149
Figura 31. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma humano U138-MG em 48h.....	149
Figura 32. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma de rato C6 em 72h.	150
Figura 33. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma humano U138-MG em 72h.....	150
Figura 34. Efeito do LaSOM 61 e análogos na proliferação de células de glioma murino C6 (A) e humano U118-MG (B) na concentração de 50 µg/mL.	152

Figura 35. Efeito do LaSOM 61 e análogos na viabilidade celular de células de glioma murino C6 (A) e humano U118-MG (B) na concentração de 50 µg/mL.....	154
Figura 36. Imagens representativas de culturas de células de glioma humano U118-MG tratadas com os compostos LaSOM 61, LaSOM 63, LaSOM 65, LaSOM 74, LaSOM 75 e LaSOM 77 na concentração de 50 µg/mL, assim como das células do grupo Controle e DMSO.	155
Figura 37. Cromossomo, com telômero em destaque.....	156
Figura 38. Arranjo G-quadruplex entre as bases guanidina e estrutura tridimensional adotada nas regiões de DNA quadruplex.....	157
Figura 39. DHPMs avaliadas quanto à ação estabilizante sobre seqüências de DNA quadruplex	158
Figura 40. Avaliação dos compostos sintetizados nas concentrações de 25 e 50 µM quanto à estabilização da seqüência de DNA quadruplex F21T.....	160
Figura 41. Avaliação dos compostos sintetizados nas concentrações de 25 e 50 µM quanto à estabilização da seqüência de DNA quadruplex CKit1.	161
Figura 42. Avaliação dos compostos sintetizados nas concentrações de 25 e 50 µM quanto à estabilização da seqüência de DNA quadruplex CKit2.	162
Figura 43. Avaliação dos compostos sintetizados nas concentrações de 25 e 50 µM quanto à estabilização da seqüência de DNA duplex.	163
Figura 44. DHPMs avaliados quanto à sua ação antitumoral no modelo de Sarcoma-180 em camundongos	165
Figura 45. Perfil plasmático do LaSOM 65 (21a) após administração oral de 53 mg/kg de seu “pró-fármaco” (3a)	168
Figura 46. Perfil de concentração plasmática médio do LaSOM 65 após administração intravenosa <i>bolus</i> da dose 1 mg/kg ratos Wistar machos.....	172
Figura 47. Perfil plasmático médio do LaSOM 65 após uma dose única ip de 30 mg/kg a ratos Wistar machos.....	173
Figura 48. Perfil plasmático médio do LaSOM 65 após uma dose única ip de 90 mg/kg a ratos Wistar machos.....	174
Figura 49. Comparação do perfil plasmático médio do LaSOM 65 após a administração intraperitoneal a ratos Wistar das doses de 30 e 90 mg/kg.....	174

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1. Síntese de 3,4-diidropirimidin-2-(1 <i>H</i>)-onas, análogos de enxofre e investigações sobre sua reatividade.....	3
1.1. INTRODUÇÃO	4
1.1.1. Reações Multicomponente.....	4
1.1.2. Reação de Biginelli:	7
1.1.3. Mecanismo da reação de Biginelli:	12
1.1.4. Síntese orgânica em fase sólida (SOFS) e a reação de Biginelli	19
1.1.5. Reatividade e funcionalização das 3,4-diidropirimidin-2(1 <i>H</i>)-onas (DHPMs).....	23
1.1.5.1. Reatividade na posição N1	24
1.1.5.2. Reatividade na posição C2	24
1.1.5.3. Reatividade na posição N3	26
1.1.5.4. Reatividade na posição C4	29
1.1.5.5. Reatividade na posição C5	32
1.1.5.6. Reatividade na posição C6	35
1.1.6. Síntese de DHPMs contendo a função guanidina	38
1.1.7. Química Limpa (<i>green chemistry</i>) e a reação de Biginelli:	40
1.2. OBJETIVOS	44
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
1.3.1. Otimização da síntese de diidropirimidin-2-tionas promovida por SnCl ₂ .2H ₂ O utilizando irradiação por microondas	45
1.3.2. Síntese de diidropirimidinonas e análogos de enxofre promovida por trietilortofornato (TEOF)	49
1.3.2.1. Reação de Biginelli promovida por TEOF utilizando irradiação por microondas	50
1.3.2.2. Reações de Biginelli promovidas por TEOF utilizando aquecimento convencional.....	53
1.3.2.3. Reações promovidas por TEOF juntamente com ácidos de Brønsted utilizando aquecimento convencional	54
1.3.3. Modificações estruturais nas DHPMs	65
1.3.3.1. Alquilação do enxofre das 2-tio-DHPMs	65
1.3.3.2. Reações de hidrólise da função éster das DHPMs	68
1.3.3.3. Guanilação das DHPMs.....	76

1.3.3.4.	Conjugação de moléculas bioativas com poliaminas	79
1.3.3.4.1.	Síntese em fase sólida de DHPMs:.....	80
1.4.	CONCLUSÕES.....	92
1.5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	93
1.5.1.	Protocolo geral para síntese de diidropirimidin-2-tionas promovida por SnCl ₂ .2H ₂ O utilizando irradiação por microondas.....	93
1.5.2.	Protocolo geral para a síntese de DHPMs promovida por TEOF utilizando irradiação por microondas:93	
1.5.2.1.	Síntese de Etil 6-metil-2-tioxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (167), utilizando aquecimento convencional, promovida pelos ácidos de Bronsted:	94
1.5.2.2.	Síntese de Etil 6-metil-2-tioxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (167), utilizando aquecimento convencional, promovida pelos ácidos de Bronsted juntamente com TEOF:.....	94
1.5.3.	Etil 6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (181):	95
1.5.4.	Etil 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (209):	95
1.5.5.	Etil 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (213):.....	96
1.5.6.	Etil 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (191):	96
1.5.7.	Etil 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (190):	97
1.5.8.	Etil 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (210):.....	97
1.5.9.	Etil 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (214):	98
1.5.10.	Etil 4-(4-cianofenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (182):	98
1.5.11.	Etil 4-(4-cianofenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (183):.....	99
1.5.11.1.	Etil 4-(4-(dimetilamino)fenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (184):	99
1.5.12.	Etil 4-(4-(dimetilamino)fenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (195):.....	100
1.5.13.	Etil 4-(2-fluorofenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (211):.....	100
1.5.14.	Etil 4-(2-fluorofenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (215):	101
1.5.15.	Etil 4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (189):.....	101
1.5.16.	Etil 4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (169):	101
1.5.17.	Etil 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (171):.....	102
1.5.18.	Etil 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (217):	102
1.5.19.	Etil 4-(4-fluorofenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (194):	103
1.5.20.	Etil 4-(4-fluorofenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (173):.....	103

1.5.21.	Etil 4-(3,4-dimetoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (196):	103
1.5.22.	Etil 4-(3,4-dimetoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (197):	104
1.5.23.	Etil 4-(4-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (199):	104
1.5.24.	Etil 4-(4-hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (198):	104
1.5.25.	Etil 4-(3-metoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (216):	105
1.5.26.	Etil 4-(3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (212):	105
1.5.27.	Síntese da 7,7-dimetil-4-fenil-2-tioxo-1,2,3,4,7,8-hexaidroquinazolin-5(6H)-ona (219) promovida pelo sistema ác. Cítrico/TEOF:	105
1.5.28.	Protocolo geral para síntese das S-alkil-diidropirimidinas:.....	106
1.5.29.	Etil 2-(etiltilio)-6-metil-4-fenil-1,4-diidropirimidina-5-carboxilato (222):.....	106
1.5.30.	Etil 2-(butiltio)-6-metil-4-fenil-1,4-diidropirimidina-5-carboxilato (223):.....	107
1.5.31.	Etil 1-benzil-2-(benziltio)-4-metil-6-fenil-1,6-diidropirimidina-5-carboxilato (221):	107
1.5.32.	Protocolo geral para hidrólise das DHPMs:.....	107
1.5.34.	Protocolo para síntese de Etil 1-acetil-4metil-2-oxo-6-fenil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (236):	108
1.5.35.	Protocolo para síntese de 6-metil-4-fenil-N-propil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxamida (241):	109
1.5.36.	Protocolo geral para síntese da 1-propilguanidina, 247:	109
1.5.37.	Protocolo geral para a síntese da Etil 4-metil-6-fenil-2-(propilamino)-1,6-diidropirimidina-5-carboxilato (250):	110
1.5.38.	Protocolo geral para a análise mecanística:.....	110
1.5.39.	Procedimento para as reações em fase sólida:.....	112
1.5.39.1.	Construção do 4-nitrofenil carbonato ligado à resina Wang (260):	112
1.5.39.2.	Formação das resinas diaminaadas (261-264):	112
1.5.39.3.	Acoplamento da DHPM 225 à resina:.....	113
1.5.39.4.	Protocolo para a clivagem ácida das resinas 265-270:.....	115
1.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS		125
2.1.	INTRODUÇÃO	126
2.1.1.	Outras atividades biológicas das DHPMs.....	134
2.2.	OBJETIVOS	135
2.3.	Avaliação da atividade carrapaticida contra <i>Ripicephalus (Boophilus) Microplus</i>	136

2.3.1.	Materiais e métodos.....	136
2.3.1.1.	Procedimento Experimental para determinação da atividade Larvicida	136
2.3.1.2.	Procedimento Experimental para determinação da atividade Ovicida:.....	137
2.3.2.	Resultados e Discussão	137
2.4.	Avaliação da atividade antifúngica contra os fitopatógenos <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	138
2.4.1.	Materiais e Métodos.....	140
2.4.2.	Resultados e discussão	141
2.5.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL	144
2.5.1.	Avaliação da citotoxicidade sobre linhagens celulares de Glioma.....	145
2.5.1.1.	Materiais e métodos.....	146
2.5.1.1.1.	Compostos avaliados	146
2.5.1.1.2.	Ensaio de contagem celular (ensaio de proliferação celular).....	147
2.5.1.1.3.	Ensaio de viabilidade celular (MTT)	147
2.5.1.1.4.	Análise Estatística.....	147
2.5.1.2.	Resultados e discussão	148
2.5.2.	Investigação do mecanismo de ação antitumoral sobre a Telomerase	156
2.5.2.1.	Materiais e métodos.....	157
2.5.2.1.1.	Compostos avaliados	158
2.5.2.2.	Resultados e Discussão	159
2.5.3.	Investigação do efeito antitumoral <i>in vivo</i>	164
2.5.3.1.	Materiais e métodos.....	164
2.5.3.1.1.	Animais	164
2.5.3.1.2.	Ensaio de atividade antitumoral.....	164
2.5.3.1.3.	Compostos avaliados	165
2.5.3.2.	Resultados e Discussão	165
2.6.	Avaliação Farmacocinética do LaSOM 65	167
2.6.1.	Materiais e Métodos.....	168
2.6.1.1.	Metodologia analítica para a quantificação do LaSOM 65.....	168
2.6.1.2.	Considerações éticas em relação aos animais experimentais.....	169
2.6.1.3.	Avaliação Farmacocinética do LaSOM 65	169

2.6.1.4.	Avaliação do perfil de concentração plasmática versus tempo do LaSOM 65.....	170
2.6.2.	Resultados e Discussão.....	172
2.6.2.1.	Avaliação Farmacocinética do LaSOM 65.....	172
2.7.	CONCLUSÕES	177
2.8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	180
3.	CONCLUSÕES GERAIS	184
4.	PERSPECTIVAS.....	188
ANEXOS		189
ANEXO I		190
ANEXO II		191
ANEXO III		194
ANEXO IV		209

EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros foram analisados pelos deslocamentos químicos expressos em parte por milhão (ppm), sendo utilizados como padrão interno o tetrametilsilano. Os solventes utilizados nas análises foram CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$. As constantes de acoplamento estão representadas pela letra *J* e expressas em Hz. A análise das amostras foi realizada pelos aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear Varian Inova® e Varian VNMR®, ambos operando a 300 Hz para as análises de hidrogênio e 75 Hz para as análises de carbono-13, pertencentes ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As notações utilizadas para a multiplicidade dos picos nos espectros de ^1H RMN foram: s (simpleto), d (duplete), t (tripleto), q (quarteto), e m (multiplete).

Espectrometria de Massas

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas com ionização por Eletrospray (ESI-MS), utilizando o Spectômetro de Massas Waters/Micromass (Manchester, UK) ZQ, pertencente à Faculdade de Farmácia – UFRGS.

As massas moleculares dos compostos foram estimadas da razão massa carga (*m/z*) dos íons moleculares protonados com a fórmula $(\text{M}+\text{H})^+$ no modo de ionização positivo.

Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros foram realizados no Espectrômetro de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) modelo Spectrum BXII marca Perkin Elmer, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As vibrações axiais e angulares foram expressas em ν/cm^{-1} . As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr (2-5%) ou através da utilização de ATR.

Forno de Microondas (MO)

As reações em forno de microondas foram realizadas no equipamento de MO convencional Sharp Car@usel II, pertencente ao Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM).

Determinação do ponto de fusão

As análises de ponto de fusão foram realizadas em um equipamento System Kofler type WME e não são corrigidas.

Análises cromatográficas

As análises por CCD foram realizadas em placas de sílica Merck 60 F₂₅₄.

*Os solventes utilizados neste trabalho foram previamente purificados conforme PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. Purification of Laboratory Chemicals, 3 Ed. New York: Pergamon Press, 1988, 391 p.

Os produtos sintetizados neste trabalho previamente reportados na literatura foram identificados por comparação de seus dados espectroscópicos e valores de ponto de fusão previamente reportados.

APRESENTAÇÃO

Reações multicomponente (MCR) são reações onde três ou mais blocos de construção (*building blocks*) reagem de forma ordenada gerando produtos que contém porções derivadas de todos os componentes. Uma vez que todos os reagentes podem ser modificados, estas reações permitem a construção de quimiotecas de compostos com rapidez e eficiência. A reação de Biginelli para a síntese de diidropirimidinonas (DHPMs), desenvolvida a mais de um século, foi um dos primeiros exemplos deste tipo de reação, e até hoje desperta interesse da comunidade científica.

O interesse nesta reação deve-se, em grande parte, ao grande potencial farmacológico de seus produtos. As DHPMs apresentam ação sobre diversos sistemas biológicos, sendo consideradas estruturas privilegiadas. Recentemente, a descoberta do Monastrol como uma nova molécula plataforma para a síntese de novos compostos antitumorais aumentou ainda mais o interesse sobre esta classe de compostos. O Monastrol apresenta potencial na terapia antitumoral por agir sobre um novo alvo biológico, a cinesina Eg5. Esta enzima é responsável pela estabilização do fuso mitótico na divisão celular e sua inibição causa interrupção no ciclo, levando à morte celular por apoptose. Compostos contendo a estrutura base das DHPMs também atuam em outros alvos biológicos relacionados com o câncer, como a modulação da Chaperona molecular Hsp70, receptores adrenérgicos e sobre a enzima diidrofolato redutase (DHFR), e a possibilidade destes compostos agirem através de dois ou mais mecanismos distintos e concomitantes no tratamento desta doença não pode ser descartada.

Nosso grupo de pesquisa vem estudando a síntese e avaliação farmacológica de DHPMs, tendo reportado a descoberta de um composto mais efetivo no controle da proliferação celular que o Monastrol e que o fármaco padrão doxorrubicina em diversas linhagens de células tumorais.

Este trabalho está apresentado na forma de dois capítulos contendo introdução, desenvolvimento e conclusões. No capítulo 1 são abordadas as características químicas da classe das DHPMs. São verificados aspectos relativos à sua síntese e também é realizada uma exploração da reatividade do sistema heterocíclico. No capítulo 2 são abordados aspectos farmacológicos desta classe de moléculas. Os compostos sintetizados no capítulo 1 são avaliados quanto à sua ação antitumoral (*in vitro* e *in vivo*), assim como quanto a potencial atividade antifúngica e carrapaticida. O composto mais ativo nos ensaios antitumorais foi submetido à avaliação inicial de parâmetros farmacocinéticos, completando assim grande parte da avaliação pré-clínica de um candidato a protótipo de fármaco para o tratamento do câncer.

CAPÍTULO 1. Síntese de 3,4-diidropirimidin-2-(1*H*)-onas, análogos de enxofre e investigações sobre sua reatividade

1.1. INTRODUÇÃO

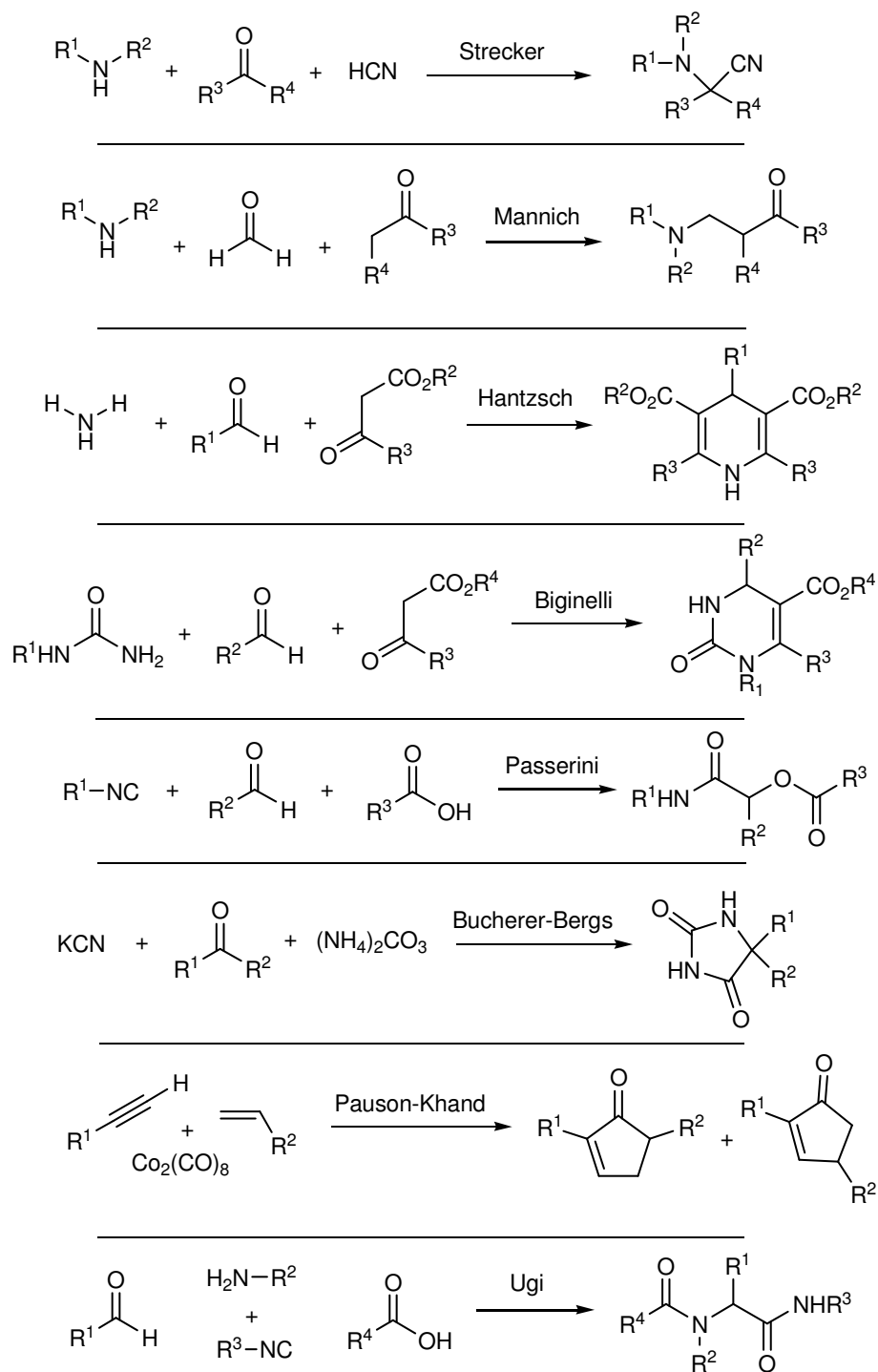
1.1.1. Reações Multicomponente

A utilização de reações que geram múltiplas ligações em apenas um passo sintético vem tornando-se uma ferramenta poderosa no desenho de rotas sintéticas econômicas. Hoje em dia, além de ser régio-, quimio- e estereoseletiva, uma reação química ideal também deve apresentar: (i) materiais de partida baratos e de fácil obtenção; (ii) facilidade operacional; (iii) ser passível de automação; (iv) ser efetiva em termos de recursos (custo, tempo, pessoal); (v) apresentar boa economia atômica; (vi) representar um processo benigno ao meio ambiente.¹

As reações multicomponente – *Multi-Component Reactions* (MCR) – reações que ocorrem entre três ou mais componentes em um mesmo frasco reacional, e dão origem a um novo produto que contém porções de todos os componentes, apresentam muitas características intrínsecas que preenchem estes requisitos de síntese ideal.² Estas reações podem ser efetuadas em solução ou em suporte sólido e a utilização de catalisadores ou aditivos pode facilitar o acoplamento de dois ou mais componentes. Na reação do tipo MCR, não é necessário que todos os componentes se condensem de uma maneira concertada, entretanto a cinética de todos os processos deve ser bem estabelecida evitando a formação de produtos colaterais cruzados, em um ambiente onde vários eventos independentes ocorrem ordenadamente de forma seqüencial.

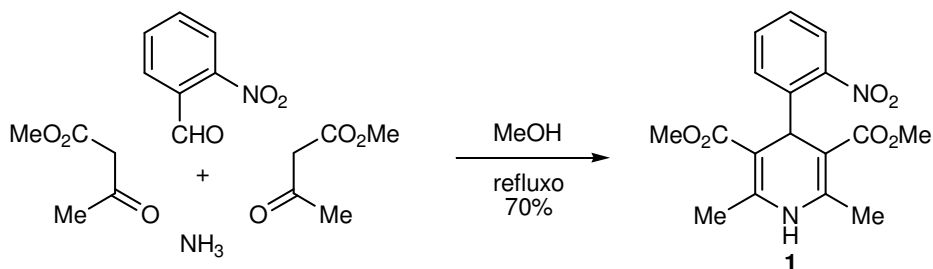
As vantagens principais da reação multicomponente estão relacionadas com a simplicidade técnica de execução, uma vez que todos os reagentes são misturados em um único recipiente e a diminuição do número de etapas pode trazer benefícios do ponto de vista econômico e ambiental. Outro aspecto importante é que o desenvolvimento de processos multicomponente tem produzido avanços significativos para a química combinatória, uma vez que todos reagentes podem ser modificados, permitindo a rápida construção de coleções de compostos (“*libraries*”, quimiotecas), acompanhando, assim, a alta demanda por moléculas que as técnicas modernas de *screening* biológico exigem.¹

Como exemplos de reações multicomponente (**Esquema 1**) temos as reações tricomponente de Strecker,³ Hantzsch,⁴ Biginelli,⁵ Mannich,⁶ Passerini,⁷ Bucherer-Bergs⁸ e Pauson-Khand,⁹ além da reação multicomponente de Ugi¹⁰ que envolve quatro reagentes.



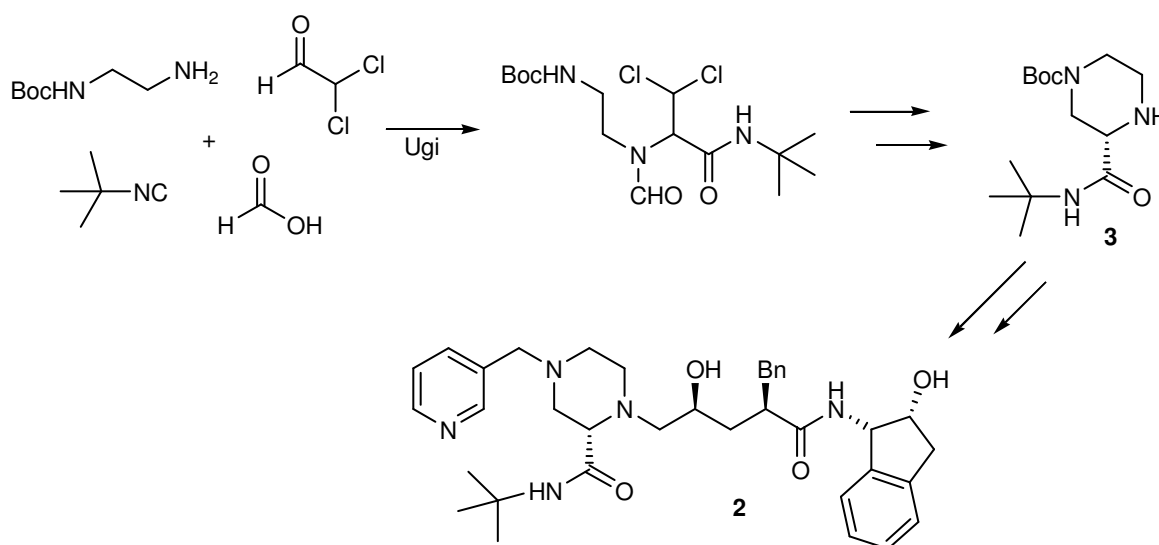
Esquema 1

É importante ressaltar que, mesmo antes do advento de técnicas de química combinatória, as reações multicomponentes já contribuíam para a química medicinal, desde o desenvolvimento e otimização do protótipo até a produção do fármaco. A síntese em uma etapa da Nifedipina (**1**), antagonista dos canais de cálcio utilizado na angina e hipertensão, através da reação de Hantzsch é um exemplo clássico¹¹ (**Esquema 2**).



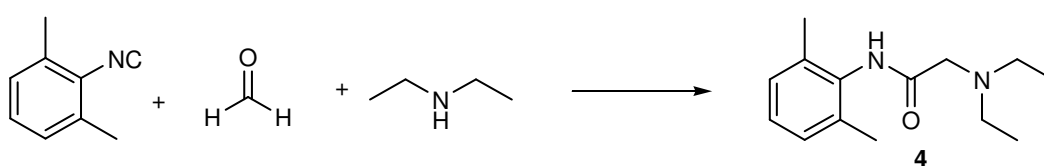
Esquema 2

Mais recentemente, o laboratório de pesquisa da Merck conseguiu planejar uma rota sintética com custo-benefício aceitável para o Indinavir (**2**), inibidor da protease do HIV, empregando a reação multicomponente de Ugi como passo chave na síntese do núcleo piperazina-2-carboxamida¹² intermediário **3** (Esquema 3).



Esquema 3

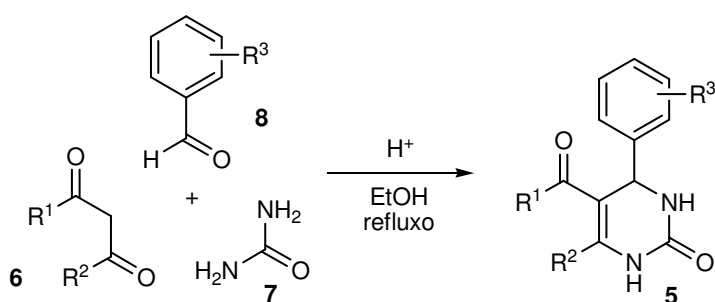
A Xilocaína (**4**), anestésico local amplamente utilizado na terapêutica, também pode ser sintetizada através da reação multicomponente de Ugi¹³ (Esquema 4). Neste caso em particular a água gerada *in situ* após formação da imina age como quarto componente da reação. Esta incrível simplificação da rota sintética fez com que diversas companhias farmacêuticas desenvolvessem seu anestésico local baseado na estrutura base α -aminocarboxamida e nada menos que 12 novos anestésicos locais foram colocados no mercado nos anos seguintes.^{1,14}



Esquema 4

1.1.2. Reação de Biginelli:

A reação de Biginelli foi desenvolvida a mais de um século (1893) pelo químico italiano Pietro Biginelli e trata-se de um dos primeiros relatos de reação do tipo MCR na história.⁵ A reação original consistia na obtenção de diidropirimidinonas (DHPMs - **5**) a partir de compostos β -dicarbonílicos **6**, uréia (**7**) e aldeídos aromáticos **8** utilizando HCl como catalisador da reação (**Esquema 5**). Apesar de se tratar de um procedimento simples e elegante para obtenção de heterociclos complexos e de alto valor agregado, as condições originais de Biginelli levavam a baixos rendimentos reacionais, mesmo sendo utilizados longos tempos de reação e condições fortemente ácidas.



Esquema 5

Embora os primeiros exemplos desta reação utilizassem β -cetoésteres, aldeídos aromáticos e uréia, o escopo da reação tem sido estendido pela variação de todos os três blocos de construção, permitindo acesso a uma grande variedade de derivados pirimidínicos multifuncionalizados (**Figura 1**). Aldeídos aromáticos com vários padrões de substituição, heteroaromáticos e alifáticos vem sendo utilizados para funcionalizar a posição 4 do heterociclo. A diversidade nas posições 5 e 6 provém, além da utilização de diversos β -cetoésteres alifáticos, da utilização de compostos cíclicos 1,3-dicetônicos, acetoacetamidas, e compostos nitro- e nitrilo-cetônicos. As posições 1 a 3 podem ser variadas através da utilização de uréia e tiouréia, sendo estas monossubstituídas ou não-substituídas, e também diversos tipos de guanidinas.¹

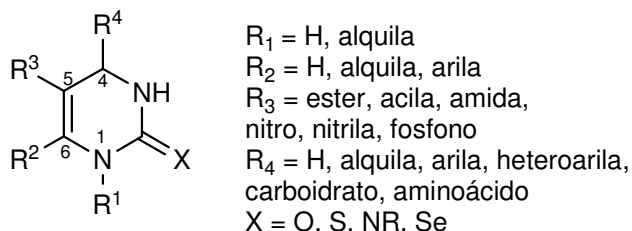


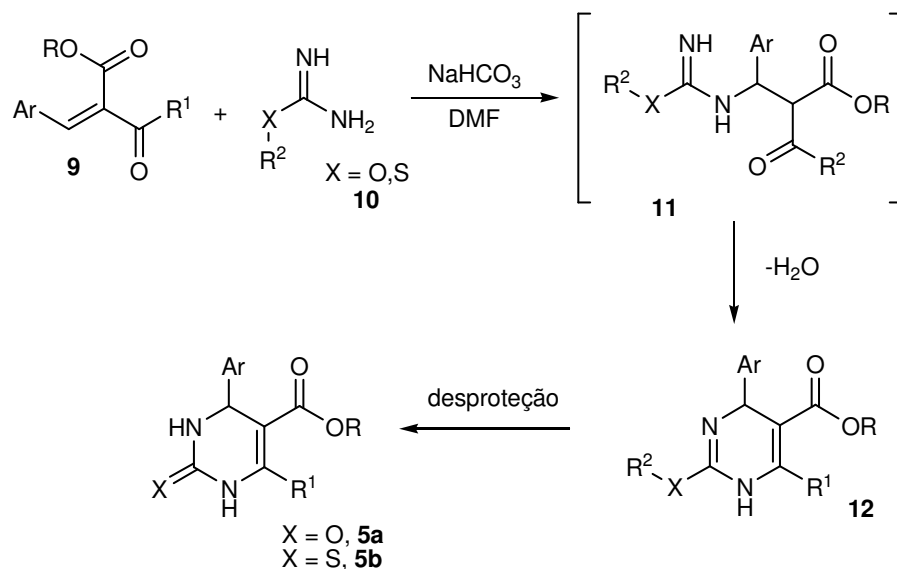
Figura 1. Variedade estrutural obtida a partir da reação de Biginelli

Recentemente, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de melhorar as condições da reação de Biginelli. Dentre estes métodos destaca-se a utilização de ácidos de

Lewis promovendo a reação. Como exemplos temos sais metálicos como TaBr₅,¹⁵ InBr₃,¹⁶ CuI,¹⁷ VCl₃,¹⁸ ZrCl₄,¹⁹ In(OTf)₃,²⁰ Yb(OTf)₃,²⁰ M(NTf₂)_x, sendo M = Ni, Cu e Yb.²¹ Há relatos na literatura de ácidos de Lewis compatíveis com o meio aquoso, como o CeCl₃.7H₂O,²² SnCl₂.2H₂O²³ assim como ácidos de Brønsted, H₂SO₄,²⁴ *p*-TSA,²⁵ PhB(OH)₂,²⁶ H₃BO₃,²⁷ HBF₄,²⁸ e heteropoliácidos, H₄PMo₁₁VO₄₀.²⁹ Também vêm sendo utilizados catalisadores neutros como LiBr,³⁰ PEG,³¹ e I₂,³² além da utilização de organocatálise para síntese assimétrica.³³ Alguns dos métodos mais efetivos empregam reagentes que apresentam características desidratantes e ácido de Lewis ao mesmo tempo, como o polifosfato de etila,³⁴ TMSCl,³⁵ TMSCl/NaI,³⁶ e o anidrido do ácido propanofosfônico.³⁷ Entretanto, alguns destes métodos apresentam desvantagens como rendimentos insatisfatórios, necessidade de recipientes selados, catalisadores de alto custo e rejeitos ambientalmente não desejáveis.

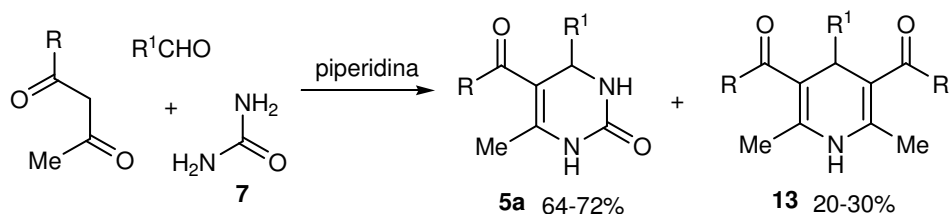
A síntese de DHPMs através da reação de Biginelli geralmente ocorre muito vagorosamente à temperatura ambiente,³⁸ sendo necessário o emprego de altas temperaturas. Além dos métodos tradicionais com aquecimento, o emprego de ultrassom^{39,40} e de irradiação por microondas juntamente com catalisadores tem demonstrado grande eficiência na redução dos tempos reacionais.⁴¹⁻⁴³

Existem métodos que geram melhores rendimentos quando são utilizados aldeídos aromáticos *orto*-substituídos ou alifáticos e tiouréia como blocos de construção das DHPMs, mas nenhum deles compara-se à praticidade e simplicidade técnica de execução da reação tricomponente de Biginelli. A abordagem mais conhecida é a chamada modificação de Atwal,⁴⁴⁻⁴⁶ que consiste na síntese de DHPMs **5a/5b** em duas etapas reacionais. O método envolve a reação de alquil 2-metileno-3-oxobutanoatos (ou as 2-arilmetileno-1,3-dicetonas correspondentes **9**), previamente sintetizadas via condensação de Knoevenagel, com iso(tio)uréias **10** em meio básico (**Esquema 6**). Acredita-se que o aduto **11** seja a espécie intermediária, que cicliza para **12** com posterior desproteção do heteroátomo gerando as DHPMs **5**. A etapa de desproteção é realizada com HCl quando X = O e TFA/EtSH quando X = S.



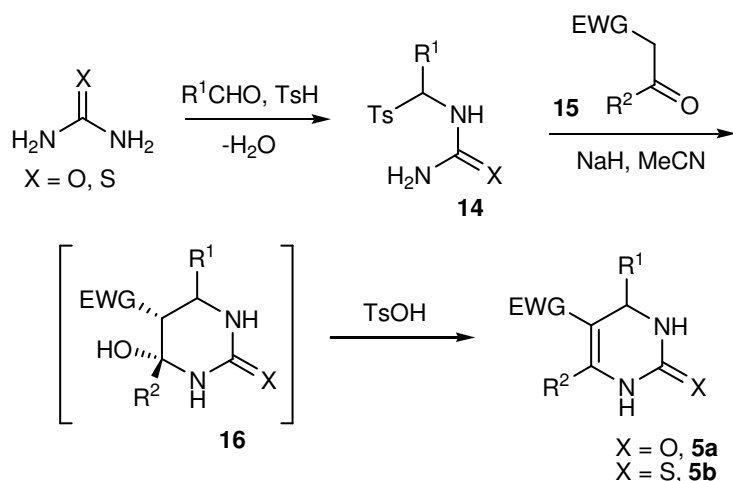
Esquema 6

Outra abordagem catalisada por base foi desenvolvida por Bakibaev⁴⁷ (**Esquema 7**). Os autores demonstraram que a piperidina pode promover a reação gerando as DHPMs **5a** correspondetes juntamente com 1,4-Diidropiridinas de Hantzsch **13** como subprodutos.



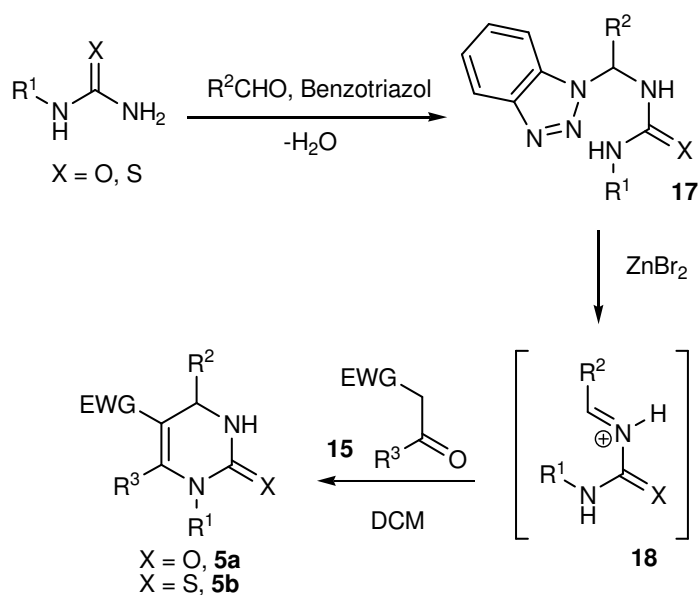
Esquema 7

Outra abordagem alternativa para síntese das DHPMs **5a/5b** foi reportada por Shutalev.⁴⁸ A síntese está baseada na condensação de (tio)uréias α -tosil substituídas **14** com enolatos preparados *in situ* de acetoacetatos e compostos 1,3-dicarbonílicos **15**. A hexaidropirimidina **16** é convertida diretamente nas DHPMs **5a/5b** através de tratamento com meio ácido.



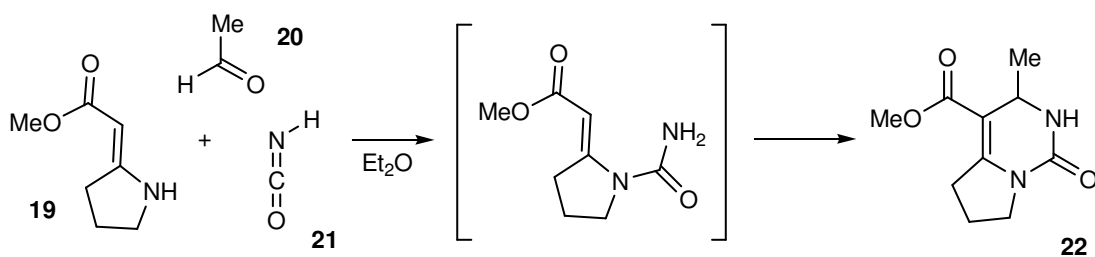
Esquema 8

Também foi publicada uma abordagem semelhante onde o benzotriazol é utilizado como auxiliar sintético.⁴⁹ Neste caso, o aldeído e a uréia reagem na presença do benzotriazol para formar o amina **17**, o qual se converte no intermediário N-acilímínio **18** com mais facilidade que o bisureido. Tratamento do amina **17** com ZnBr_2 na presença do composto dicarbonílico **15** leva à obtenção das DHPMs **5a/5b** em altos rendimentos.



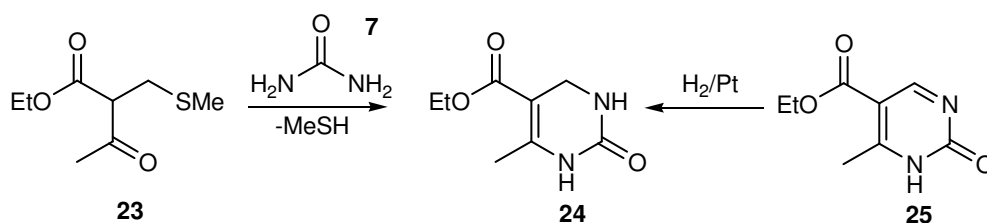
Esquema 9

Uma estratégia bastante diferente para a síntese de análogos de diidropirimidinas foi desenvolvida por Kishi⁵⁰ (**Esquema 10**). A condensação à temperatura ambiente de uma enamina **19**, acetaldeído (**20**) e ácido isocianídrico (**21**) gera o derivado bicíclico **22**. Investigações mais recentes realizadas por Elliott mostraram que isocianatos substituídos também podem ser empregados para síntese de derivados N3 substituídos.⁵¹



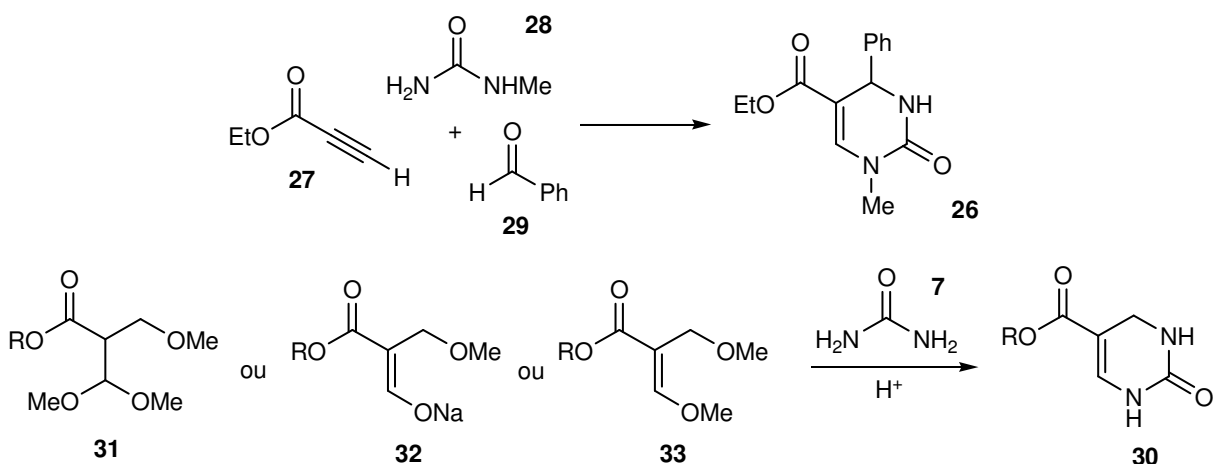
Esquema 10

Para a síntese de DHPMs não substituídas na posição C4,⁵² o acetoacetato substituído **23** pode reagir com uréia (**7**) com posterior eliminação de MeSH gerando a DHPM **24** (Esquema 11). Esta mesma DHPM pode ser sintetizada pela hidrogenação da pirimidina **25** com H₂/Pt.



Esquema 11

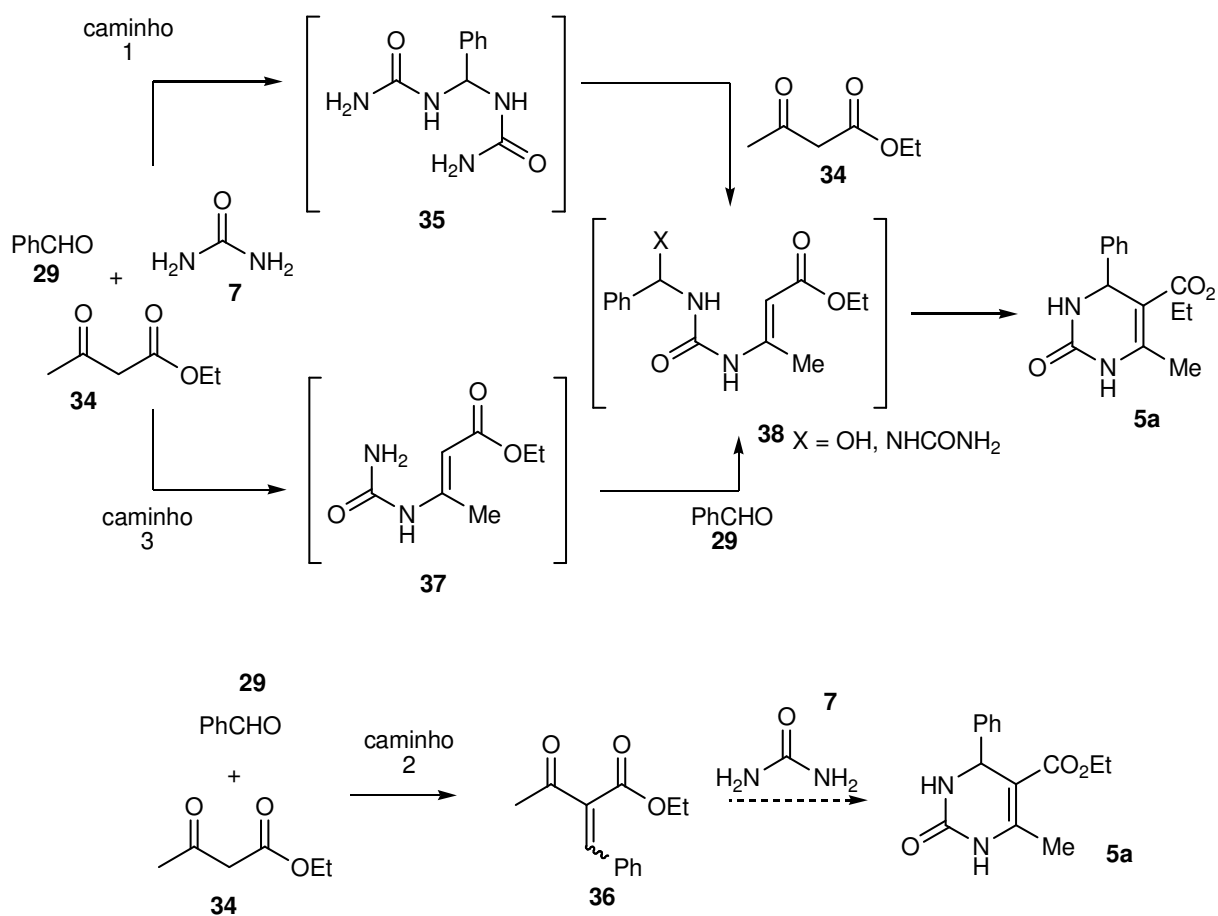
Para obter DHPMs não substituídas na posição C6 **26** pode-se reagir o propiolato de etila (**27**) com *N*-metiluréia (**28**) e benzaldeído (**29**).⁵² Também se pode obter DHPMs não substituídas na posição C4 e C6 **30** através da reação da uréia (**7**) com precursores como **31**, **32** e **33**⁵³ (Esquema 12).



Esquema 12

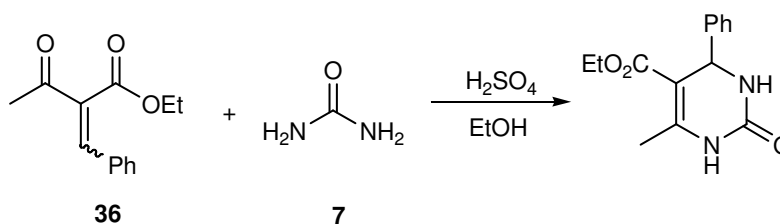
1.1.3. Mecanismo da reação de Biginelli:

O mecanismo de formação das diidropirimidinonas (DHPMs) através da reação multicomponente de Biginelli é um assunto contraditório que vem sendo debatido por vários pesquisadores nas últimas décadas. As primeiras investigações mecanísticas foram realizadas por Folkers e Johnson,⁵⁴ onde a dependência de meio ácido para a reação foi estabelecida experimentalmente. Considerando a reação catalisada por ácido de Brønsted entre acetoacetato de etila (**34**), benzaldeído (**29**) e uréia (**7**), a reação pode ocorrer através de 3 caminhos: **1)** Reação do benzaldeído (**29**) com a uréia (**7**) levando à formação do intermediário bisureído **35**, o qual reage com o acetoacetato de etila (**34**) formando a DHPM **5a**; **2)** Reação do benzaldeído (**29**) com acetoacetato de etila (**34**) levando à formação do produto de Knoevenagel **36**, o qual reage com uréia (**7**) formando a DHPM **5a**; e **3)** Reação da uréia (**7**) com o acetoacetato de etila (**34**) levando à formação do ureidocrotonato intermediário N-(1-etoxicarbonil-propen-2-il)uréia **37**, o qual reage com o benzaldeído (**29**) formando a DHPM **5a**. O intermediário-chave proposto pelos autores foi a uréia dissubstituída **38** derivada ou do benzal-bisureido **35** ou do ureidocrotonato **37** (**Esquema 13**). Esta conclusão foi baseada na observação de que tanto o benzal-bisureido **35** quanto o ureidocrotonato **37** pré-formados reagem com o terceiro componente levando às DHPMs **5a**. A reação inicial do acetoacetato **34** com o benzaldeído (**29**) foi descartada, pois a reação do produto de Knoevenagel **36** pré-formado com uréia (**7**) nas mesmas condições leva a rendimentos insignificantes das DHPMs (**Esquema 13**). Recentemente, Valverde *et al.*⁵⁵ publicaram que, em uma reação de Biginelli onde o acetoacetato **34** encontra-se ligado a um polímero insolúvel, ocorre precipitação do bisureido **35** no meio reacional, e a conversão deste em DHPM **5a** ligada ao suporte somente ocorre com longos tempos reacionais.



Esquema 13

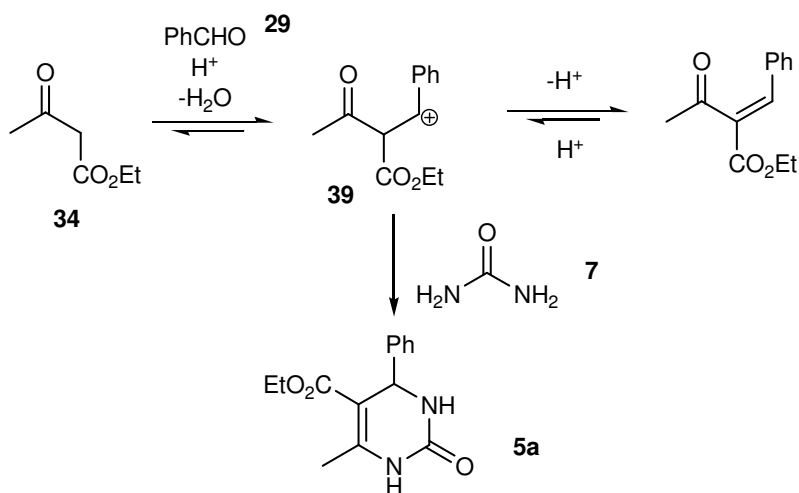
Há relatos na literatura⁵⁶ que demonstram que espécies carbonílicas insaturadas como o produto de Knoevenagel **36** pré-formadas ainda podem ser usadas na reação com uréias **7** em meio ácido obtendo-se rendimentos moderados (**Esquema 14**).



Esquema 14

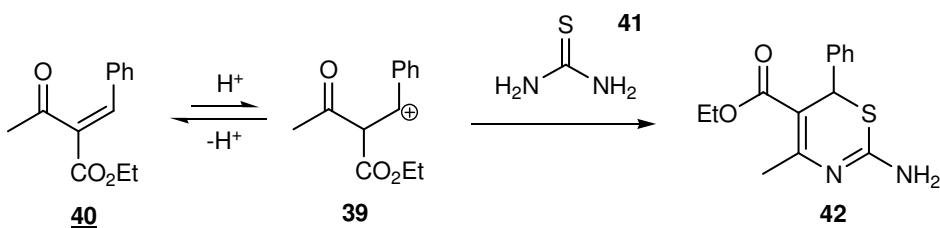
Sweet e Fissekis,⁵³ 40 anos depois de Folkers e Johnson, propuseram um novo mecanismo para a reação. Os autores sugeriram que, em meio ácido, ocorreria formação de um carbocátion intermediário **39**, produzido através de uma reação de condensação aldólica entre o benzaldeído (**29**) e o acetoacetato de etila (**34**), e que este seria a etapa determinante da velocidade e o primeiro evento que ocorre na reação de Biginelli.

Posteriormente este carbocátion **29** reagiria com a uréia (**7**) levando a formação da DHPM **5a** (Esquema 15).



Esquema 15

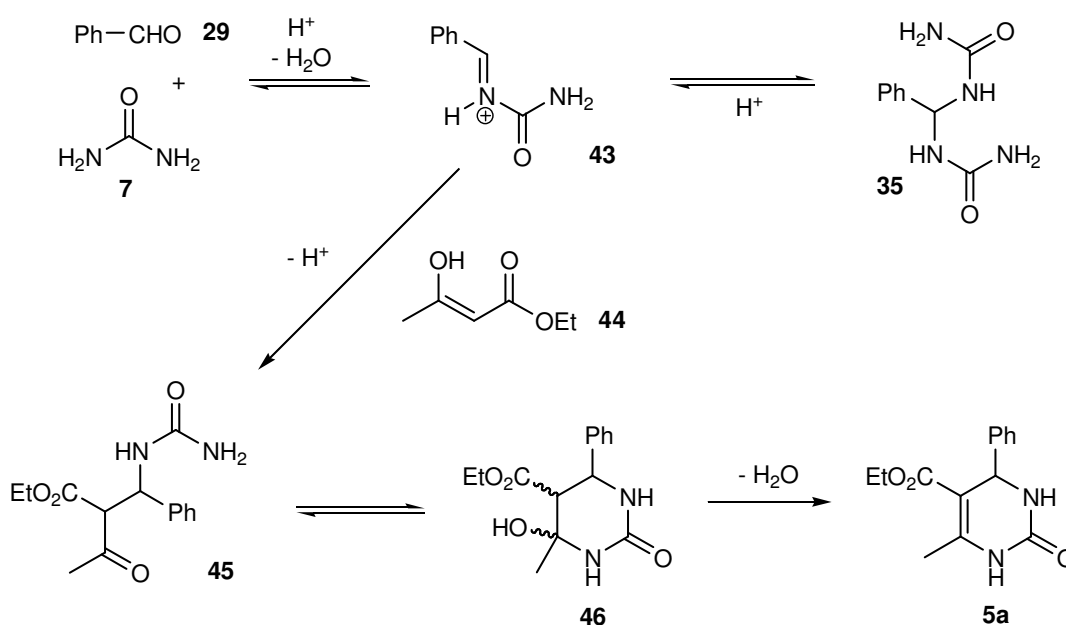
Duas décadas mais tarde, C. O. Kappe,³⁸ através de estudos espectroscópicos (experimentos de *trapping*) derrubou a teoria do carbocátion intermediário **39**. Kappe demonstrou que, nas condições ácidas empregadas na reação de Biginelli, a condensação aldólica entre os o benzaldeído (**29**) e o acetoacetato de etila (**34**) não corresponde ao caminho majoritário seguido pela reação, embora pequenas quantidades da enona **40** sejam às vezes observadas como subproduto da reação. Partindo do produto de Knoevenagel **36** obtido da reação do benzaldeído (**29**) com o acetoacetato de etila (**34**) através de catálise básica, Kappe também demonstrou que a reação de Biginelli empregando tiouréia (**41**) não leva às DHPMs, e sim aos seus isômeros, 2-amino-1,3-tiazinas **42** (Esquema 16).



Esquema 16

No mesmo artigo,³⁸ Kappe também reinvestigou os mecanismos propostos por Folkers e Johnson. Kappe não acredita que a reação proceda através do intermediário ureidocrotonato **37** (Esquema 13) uma vez que este é muito instável e sua formação é amplamente desfavorecida no meio reacional empregando as condições clássicas da reação de Biginelli. Monitorando a reação entre o benzaldeído (**29**) e o acetoacetato **34**, e entre a uréia (**7**) e o acetoacetato **34** em CD_3OH/HCl ele não foi capaz de observar a

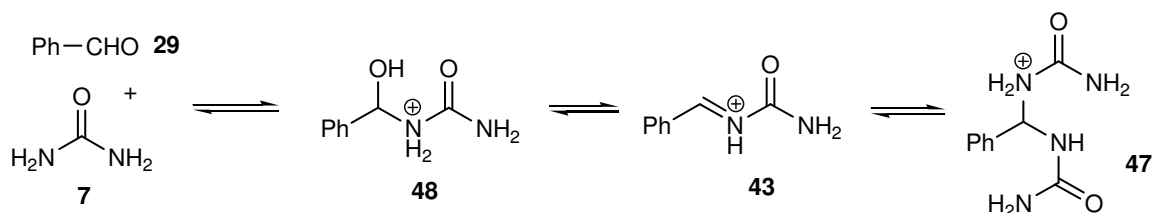
formação de produto à temperatura ambiente. Entretanto, Kappe foi capaz de observar a formação do bisureído **35** como único intermediário da reação. Foi proposto então outro mecanismo para a reação onde o primeiro passo ocorreria entre o aldeído **29** e a uréia (**7**), como etapa limitante da velocidade, levando ao intermediário *N*-acilimínio **43** (**Esquema 17**). Este intermediário é então atacado pelo acetoacetato de etila (**34**), possivelmente através de sua forma enólica **44**, levando ao ureído intermediário de cadeia aberta **45** o qual cicliza para formar a hexaidropirimidina **46**, que forma as DHPMs **5a** após eliminação de água catalisada por ácido. Kappe classificou o mecanismo da reação como sendo uma α -amidoalquilação, ou mais especificamente uma α -ureidoalquilação.



Esquema 17

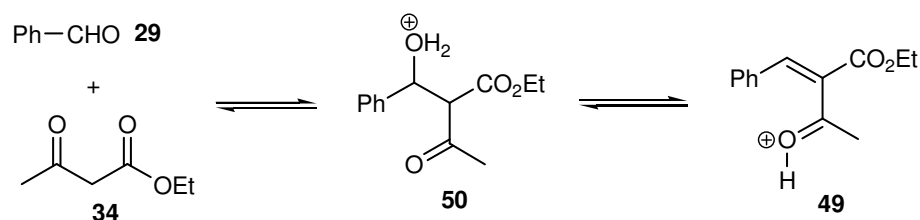
Apesar de Kappe não ter conseguido demonstrar a existência do íon ureído-imínio **43**, estudos pioneiros realizados por Russowsky e colaboradores^{57,58} demonstraram a existência deste intermediário na reação multicomponente de Biginelli através da utilização de espectrometria de massas com ionização por electrospray de infusão direta (*direct infusion electrospray ionization mass spectrometry* – ESI-MS). Estes estudos do mecanismo da reação através da utilização de ESI-MS recentemente foram publicados por Souza *et. al.*⁵⁹ Esta técnica apresenta grande vantagem sobre o RMN na análise do mecanismo da reação de Biginelli, pois com ela é possível detectar todas as espécies carregadas no meio reacional, inclusive espécies de meia-vida curta, pois estas são “pescadas” do meio reacional diretamente para a fase gasosa. Novamente as três possíveis combinações bimoleculares foram testadas:

i) Na reação entre o benzaldeído (**29**) e a uréia (**7**), na ausência do acetoacetato **34**, foi observada a formação do bisureído protonado **47** de m/z 209; o íon imínio **43** de m/z 149; seu precursor hidratado **48** de m/z 167; assim como o benzaldeído e o dímero de uréia protonados (**Esquema 18**).



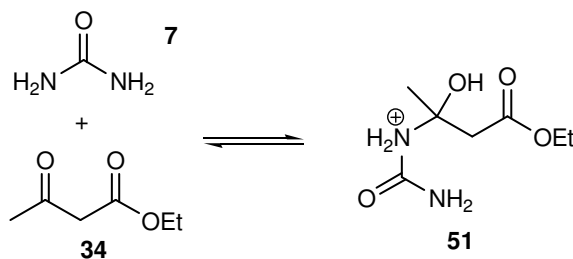
Esquema 18

ii) Na reação entre o benzaldeído (**29**) e o acetoacetato **34**, na ausência da uréia (**7**), somente foi possível observar a formação dos intermediários propostos após longos tempos reacionais. Foi observada a formação do aduto de Knoevenagel protonado **49** de m/z 219 e seu precursor aldólico protonado **50** de m/z 237 (**Esquema 19**).



Esquema 19

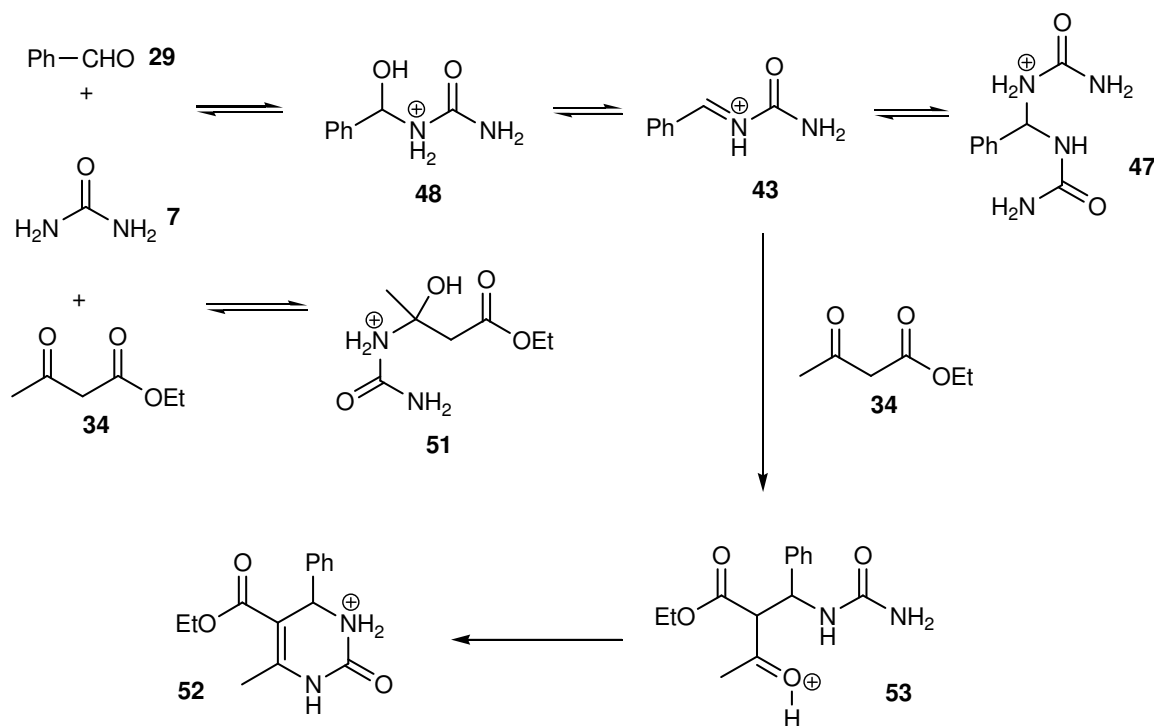
iii) Na reação entre a uréia (**7**) e o acetoacetato **34**, sem a presença do aldeído **29**, não foi possível detectar a formação do ureidocrotonato **37**, porém seu precursor protonado **51** foi detectado como um íon abundante (**Esquema 20**).



Esquema 20

iv) Também foi realizada a reação com os três componentes presentes desde o início no meio reacional, e nesta foram detectados o ureidoimínio **43**, seu precursor **48** e o bisureído protonados **47**; o intermediário precursor da formação do ureidocrotonato **51** protonado; o produto final da reação na sua forma protonada **52** com m/z 261; e o

intermediário **53** corresponde à adição do acetoacetato **34** ao íon imínio **43** em sua forma protonada (**Esquema 21**).



Esquema 21

Portanto, os autores conseguiram demonstrar que o mecanismo anteriormente proposto por Kappe via ureidoimínio (**43** – **Esquema 17**) realmente é o predominante nas condições de catálise com ácidos de Brønsted na reação de Biginelli, e também que os mecanismos anteriormente propostos envolvendo o intermediário ureidocrotonato (**37** – **Esquema 13**) e o intermediário carbocátion (**39** – **Esquema 15**) não parecem ocorrer nestas condições. Embora quando se reage isoladamente o acetoacetato **34** e o aldeído **29**, nas mesmas condições da reação de Biginelli, possa ser detectado o aduto de Knoevenagel **40**, este não é um intermediário da reação multicomponente de Biginelli devido à sua baixa velocidade de formação.

O isolamento dos intermediários **54** e **55** (**Figura 2**) através da utilização de acetoacetatos com alta demanda estérica⁶⁰ ou eletrodeficientes³⁴ respectivamente, fornece mais evidências que sustentam este mecanismo. Um grande número de hexaidropirimidinas estruturalmente semelhantes a **55** vem sendo obtidas através da utilização de β -cetoésteres ou compostos 1,3-dicarbonílicos contendo o grupamento CF_3 no lugar da metila terminal.^{61,19}

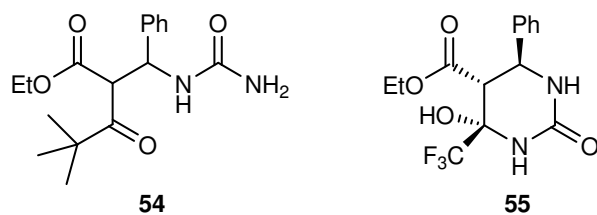
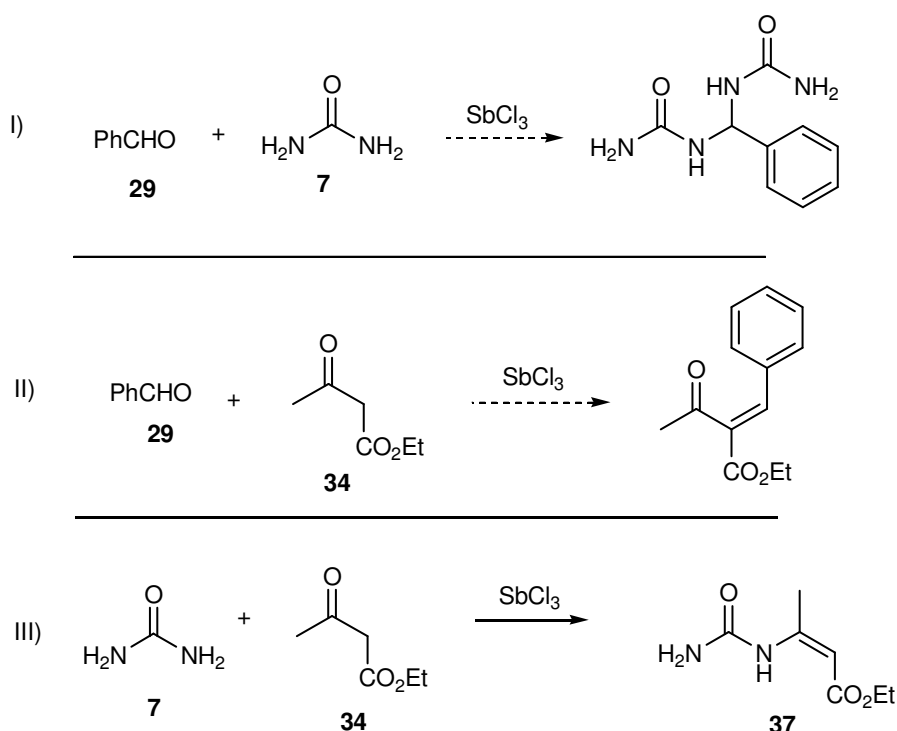


Figura 2. Intermediários isolados da reação de Biginelli

Capanec *et al.*,⁶² trabalhando com SbCl_3 como catalisador, propuseram um novo mecanismo para a reação envolvendo justamente o ureidocrotonato **37**. Foram realizadas as reações bimoleculares entre os componentes na presença do ácido de Lewis, meio anidro e MeCN como solvente (**Esquema 22**). As reações entre o benzaldeído (**29**) e a uréia (**7**), e entre o benzaldeído (**29**) e o acetoacetato de etila (**34**) não levaram ao produto esperado. Porém, a reação entre a uréia (**7**) e o acetoacetato de etila (**34**) levou à formação do ureidocrotonato intermediário N-(1-etoxicarbonil-propen-2-il)uréia (**37**), o qual posteriormente reagiu com benzaldeído (**29**) levando à DHPM **5a** correspondente. Os autores atribuem a diferença mecanística à catálise promovida pelo ácido de Lewis ao invés do ácido de Brønsted.



Esquema 22

1.1.4. Síntese orgânica em fase sólida (SOFS) e a reação de Biginelli

Em 1964, uma nova técnica de síntese chamada Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS),⁶³ foi reportada por Bruce Merrifield. Esta metodologia consiste, resumidamente, no acoplamento do material de partida em um polímero (*resina*) inerte e insolúvel no meio reacional. Todas as reações planejadas para a rota sintética são realizadas com este material de partida preso covalentemente à resina. O último passo consiste na reação de clivagem do produto ligado à resina, liberando-o então, solúvel no meio reacional e com um alto grau de pureza.⁶⁴ O desenvolvimento desta técnica valeu ao seu criador o prêmio Nobel de Química em 1984.⁶⁵

Nosso grupo de pesquisa vem empregando com pioneirismo a técnica de Síntese Orgânica em Fase Sólida em nosso país.⁶⁶⁻⁶⁸ Entre as vantagens que esta técnica apresenta sobre a síntese orgânica clássica (*síntese em solução*), a principal é a facilidade de purificação dos compostos intermediários. Este processo consiste simplesmente em filtrações da resina com solventes de várias polaridades, uma vez que o aduto formado pelo produto de interesse (ou intermediário da rota sintética) e o polímero é insolúvel em qualquer solvente. Devido a esta característica pode-se usar excesso de reagentes sem preocupação com as etapas de isolamento posteriores. A SOFS também apresenta capacidade de automatização do processo e vem sendo aplicada principalmente na área de Química Medicinal, possibilitando o emprego da Química Combinatória. Esta nova ferramenta de planejamento racional permite a obtenção de um maior número de moléculas no menor tempo possível, acelerando, assim, o processo de descoberta de novos candidatos a fármaco.⁶⁹ Outra vantagem que pode ser apontada é a seletividade das reações, uma vez que a resina também acaba funcionando como um grupo protetor da funcionalidade à qual está acoplada.

Entretanto, ainda existem desvantagens na utilização da SOFS. Há a necessidade de continuamente estar desenvolvendo novas metodologias para síntese dos compostos-alvo, pois as condições necessárias geralmente diferem daquelas utilizadas na síntese em solução, fazendo com que o processo de adaptação de rotas sintéticas para a SOFS não seja um processo trivial.^{70,71} Como exemplo temos a reação clássica de hidrogenação catalítica, que não pode ser aplicada à síntese com polímeros inertes, pois as condições normalmente empregadas requerem a utilização de catálise heterogênea. Para obter-se condições semelhantes de redução na SOFS tem-se empregado diimidaz.⁷²

A análise dos produtos e intermediários ligados ao suporte sólido também é um desafio. Pela impossibilidade de fazer-se uso da cromatografia em camada delgada há

dificuldades no acompanhamento das reações, fazendo com que a maioria dos pesquisadores clive a amostra da resina no final de cada etapa da rota sintética para análise do produto obtido, procedimento conhecido como “*cleave-and-analyse*”.

Um método simples, otimizado recentemente em nosso laboratório,^{67,68} permite o uso da espectroscopia no infravermelho (IV) para o monitoramento das reações *on-bead*, isto é, diretamente em resina, sem a necessidade de clivagem do produto da mesma. Dessa forma, as reações em fase sólida são acompanhadas *in situ* e os tempos reacionais são otimizados em cada etapa da rota sintética. É importante ressaltar que o acompanhamento das reações com IV mostra que estas ocorrem geralmente em intervalos de tempo inferiores aos citados na literatura. Como exemplo, as reações de acoplamento de ácidos carboxílicos à Resina Merrifield monitoradas em nosso laboratório ocorreram em menos de 3 horas, em contraponto a dados da literatura que preconizam tempos superiores a 16 horas.⁷³ Outras técnicas comumente empregadas na análise *on-bead* são as reações colorimétricas, espectrometria de massas, e técnicas especiais de RMN como o spin em ângulo mágico (*Magic angle spinning*) e RMN em fase-gel com materiais isotópicamente enriquecidos.⁷⁴

Embora a técnica de Síntese orgânica em fase sólida tenha sido desenvolvida inicialmente para a síntese de macromoléculas poliméricas como peptídeos e oligonucleotídeos, esta vem encontrando atualmente aplicação na síntese de uma grande variedade de moléculas.⁷⁵ A utilização da SOFS juntamente com reações multicomponente (MCRs) tem se demonstrado uma técnica muito eficaz para a síntese combinatória de quimiotecas de moléculas de baixo peso molecular.² Algumas estratégias empregando SOFS para a síntese de DHPMs são reportadas na literatura, sendo que os pontos de acoplamento às resinas utilizadas são os mais variados (**Figura 3**).⁷⁶

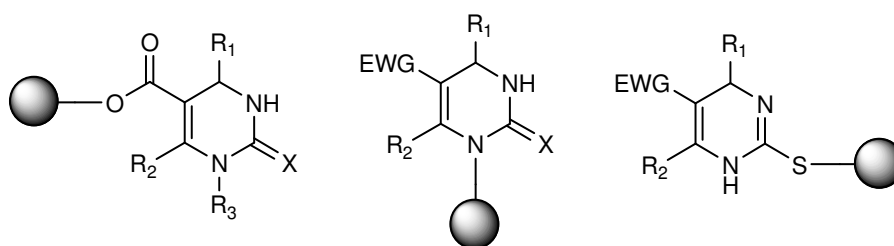
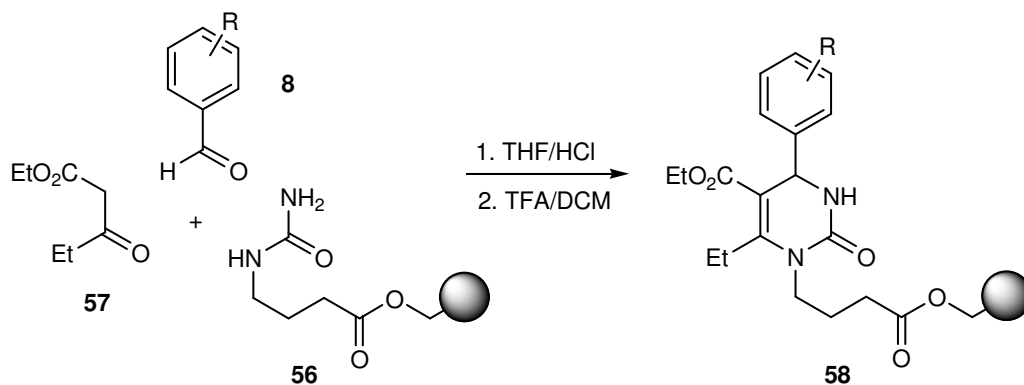


Figura 3. Pontos de ancoramento das DHPMs às resinas utilizadas na SOFS

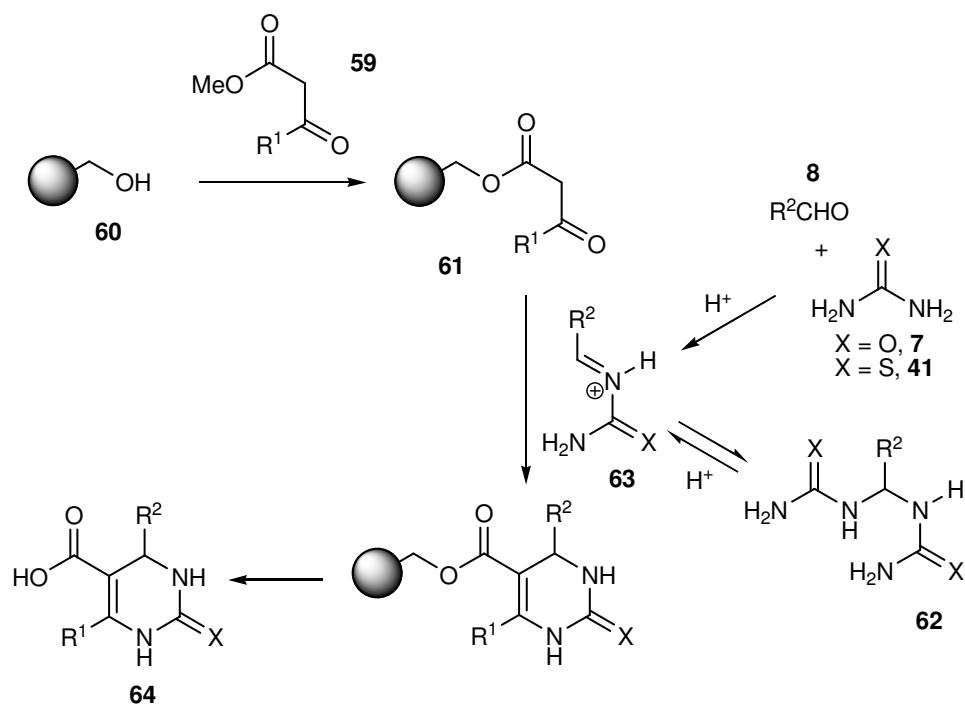
Entre os protocolos que utilizam a reação multicomponente de Biginelli para a síntese de DHPMs em suporte polimérico, merece destaque a primeira adaptação desta reação para fase sólida⁷⁷ (**Esquema 23**). Foram utilizados uma uréia derivada do ácido γ -aminobutírico acoplada à resina Wang **56** e excesso de β -cetoester **57** e aldeídos

aromáticos **8**. A clivagem das DHPMs imobilizadas **58** ocorreu com alto rendimento e pureza. Esta mesma rota sintética também foi adaptada com sucesso para a síntese em fase fluorosa.^{78,79}



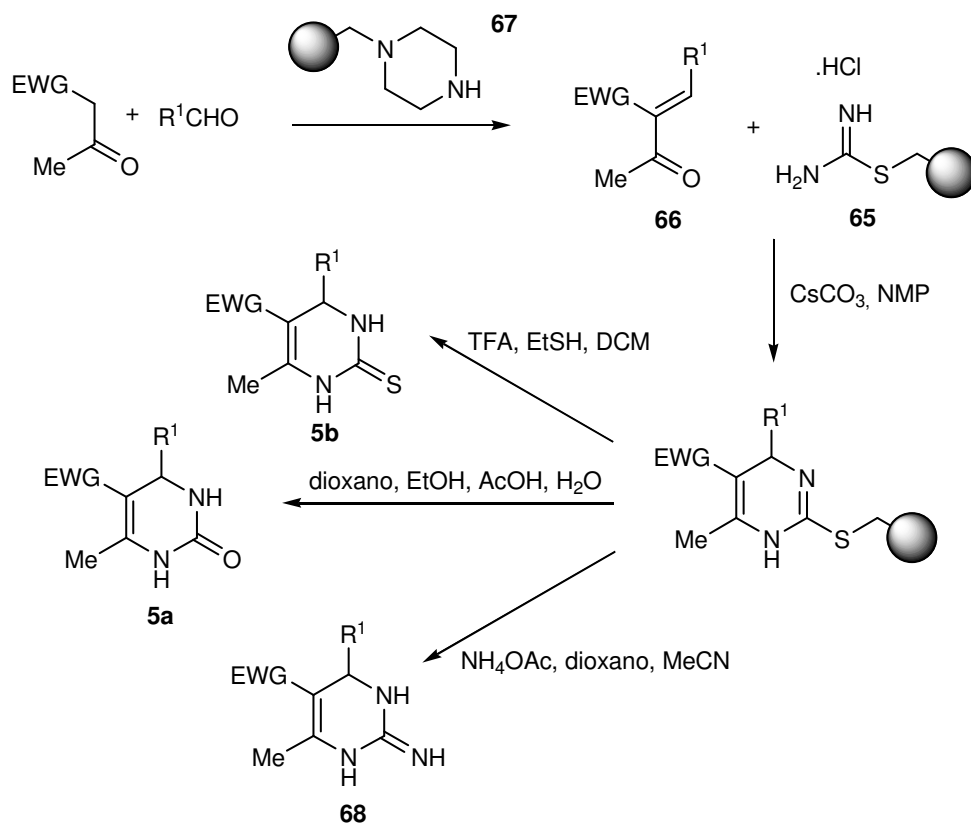
Esquema 23

Já Kappe *et al.*^{55,79} optaram por um protocolo onde o β -cetoester **59** encontrava-se acoplado à resina Wang (**60**) (**Esquema 24**). O β -cetoester imobilizado **61** foi reagido com aldeídos **8** e uréia (**7**) ou tiouréia (**41**) levando a ótimos rendimentos após clivagem. Neste protocolo experimental, os autores notaram que logo no início da reação ocorria precipitação do bisureido **62** resultante da reação do íon N-acilimínio **63** intermediário com o excesso de uréia do meio reacional. Através de catálise ácida e longos tempos reacionais, a reação inversa ocorria de forma que o íon N-acilimínio **63** pudesse reagir com o β -cetoester imobilizado **61**, levando às DHPMs contendo um grupamento ácido carboxílico na posição 5 **64** após clivagem ácida. As reações utilizando tiouréia (**41**) necessitaram de maior tempo reacional e da utilização de um “scavenger” (tiofenol) na etapa de clivagem.



Esquema 24

Uma abordagem mais complexa foi elaborada por Kappe com o intuito de aumentar a diversidade molecular através de uma rota sintética em fase sólida na síntese de DHPMs (**Esquema 25**)⁸⁰. O planejamento foi feito utilizando a modificação de Atwal, desta maneira permitindo o acoplamento na resina *via* tiouréia (**41**). Esta tiouréia acoplada à resina cloro-Wang (**65**) foi reagida com diversas enonas **66**, que por sua vez foram preparadas através de uma condensação de Knoevenagel catalisada por uma resina portando a piperazina **67**.⁸² A grande vantagem desta rota está na etapa de clivagem, onde três tipos de DHPMs (X = O **5a**, S **5b**, NH **68**) podem ser obtidas dependendo das condições reacionais, o que multiplica o número de produtos que podem ser gerados por três.



Esquema 25

1.1.5. Reatividade e funcionalização das 3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas (DHPMs)

Devido à facilidade de obtenção das DHPMs através da reação de Biginelli, estes produtos tornam-se interessantes moléculas-plataforma para modificações químicas com o intuito de obter maior diversidade molecular, sendo frequentemente chamadas de “estruturas privilegiadas” (*privileged structures*). Além da grande variedade de grupos funcionais acessíveis através da reação de ciclização em si (**Figura 1**), heterociclos muito interessantes podem ser obtidos pela modificação de qualquer dos seis pontos de diversidade das DHPMs (**Figura 4**).

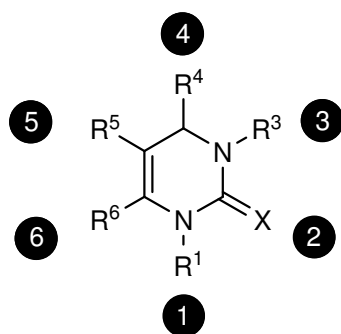
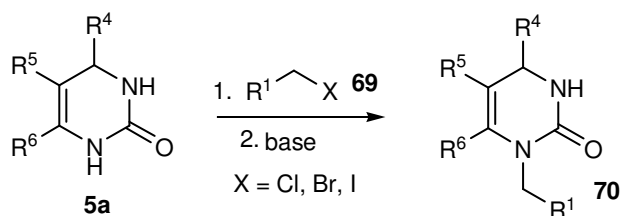


Figura 4. Pontos de modificação das DHPMs

1.1.5.1. Reatividade na posição N1

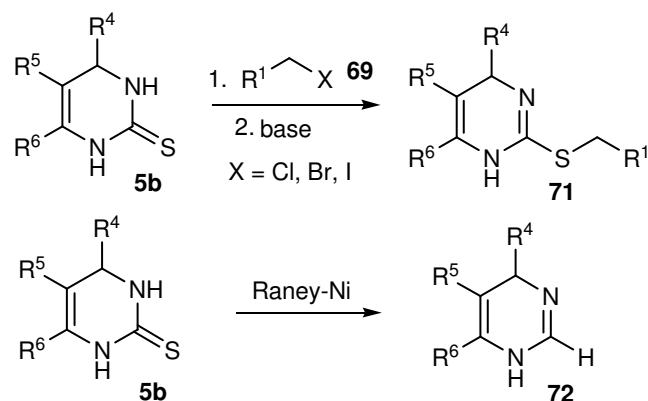
O N1H das DHPMs é o ponto mais ácido da molécula, isso devido à conjugação existente entre este nitrogênio e o grupamento C=O na posição 5 (enaminoéster). Devido a isso, a posição N1 é a primeira a ser deprotonada quando as DHPMs **5a** são tratadas com base. Desta maneira pode-se alquilar regioseletivamente o núcleo DHPM **5a** tratando-o com haletos de alquila **69** na presença de bases obtendo DHPMs N1-substituídas **70** (**Esquema 26**)⁸².



Esquema 26

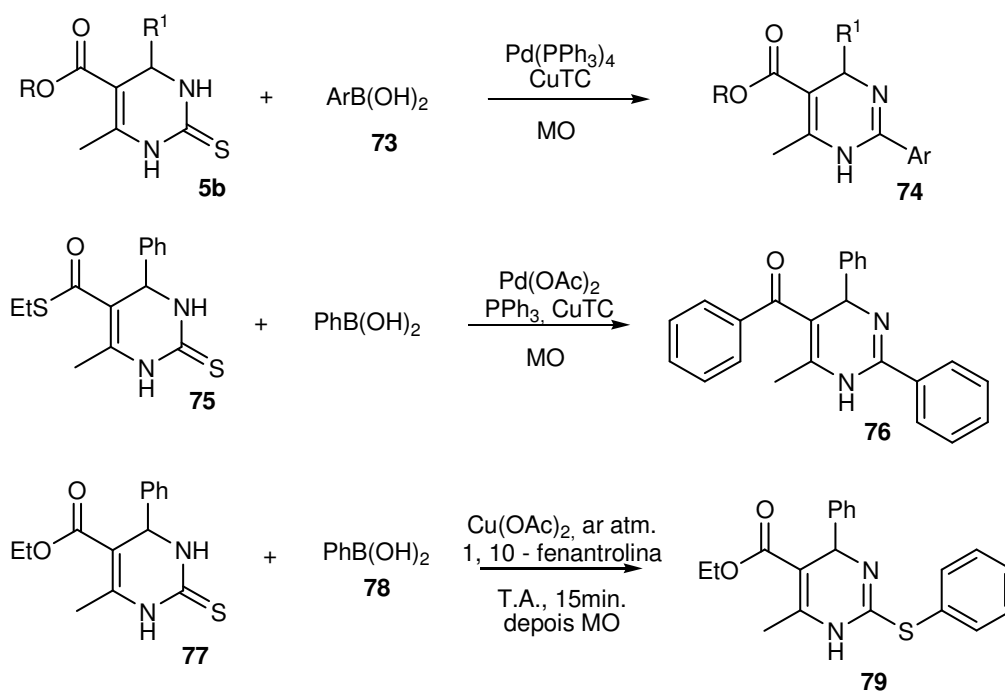
1.1.5.2. Reatividade na posição C2

No caso de diidropirimidinonas ($X = O$, **5a**) a reatividade é muito pequena e praticamente não há relatos de modificações nesta posição. Já no caso de diidropirimidin-2- tionas ($X = S$, **5b**) pode-se realizar a S-alkilação com haletos de alquila **69** na presença de base, como K_2CO_3 ou piridina, gerando 2-alkiltio-1,4-diidropirimidinas **71** (**Esquema 27**).⁸³⁻
⁸⁵ Tratamento de diidropirimidin-2- tionas **5b** com Raney-Ni possibilita a obtenção de 1,4- diidropirimidinas não substituídas na posição 2 **72**⁸⁶ (**Esquema 27**).



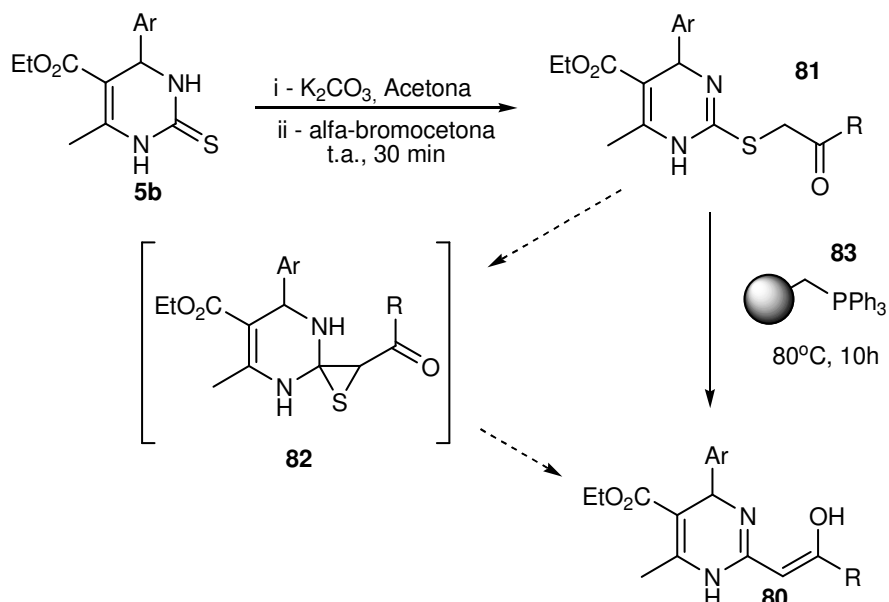
Esquema 27

Prokopcová *et al.*⁸⁷ demonstraram a aplicação de reações de acoplamento cruzado (*cross-coupling*) entre DHPMs e ácidos arilborônicos. A reação entre as DHPMs **5b** e os ácidos arilborônicos **73** com catálise de Pd(PPh₃)₄ e Cu(I)-tiofeno-2-carboxilato (CuTC) sob irradiação por microondas (MO) gera as 2-(hetero)aril-1,4-diidropirimidinas **74** em bons rendimentos (**Esquema 28**). Também é relatada na literatura⁸⁸ a conversão da DHPM contendo o grupamento tioéster em C5 **75** ao derivado bis-arilado **76** baseado na estratégia de Liebeskind-Srogl⁹⁰ para síntese de cetonas (**Esquema 28**). Alguns autores^{87,90} também demonstraram que trocando o sistema catalítico, as reações de *cross-coupling* podem ser modificadas para formar ligações C-S ao invés de C-C. Assim, quando a DHPM **77** é tratada com o ácido arilborônico (**78**) na presença de um sal de Cu(II) juntamente com a 1, 10-fenantrolina e em contato com o oxigênio atmosférico, a fenilsulfanil-1,4-diidropirimidina (**79**) é obtida em bons rendimentos (**Esquema 28**).



Esquema 28

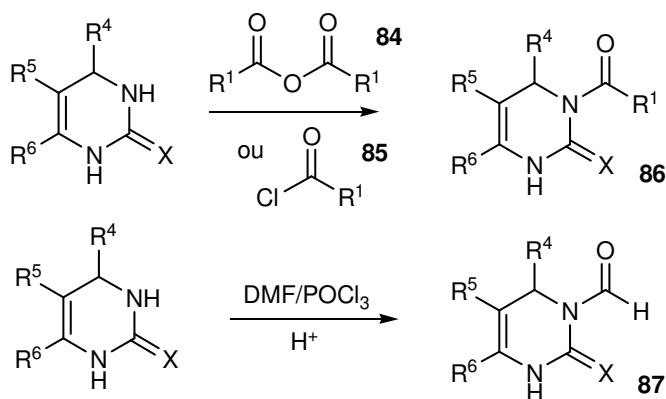
Singh *et al.*⁹¹ realizaram a síntese de 2-(2-hidroxi-2-arylvinil)-diidropirimidinas **80** via acoplamento de Eschemoser (**Esquema 29**). A DHPM contendo enxofre na posição 2 **5b** foi primeiramente alquilada com α -bromocetonas gerando os intermediários *S*-alquilados **81**, com posterior extrusão de enxofre *via* intermediário **82** promovida por uma trifetilfosfina suportada em polímero **83**, gerando os produtos de Eschemoser **80**.



Esquema 29

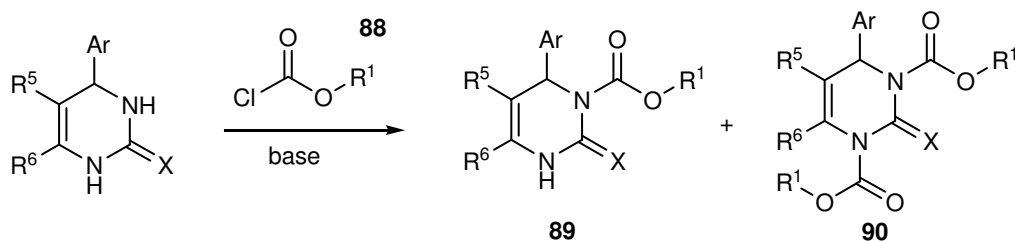
1.1.5.3. Reatividade na posição N3

Este nitrogênio do núcleo DHPM reage preferencialmente com espécies como anidridos **84** e cloretos de ácido **85**, levando à obtenção quimiosseletiva de DHPMs aciladas **86**.^{86,92} A reação de formilação utilizando DMF/ POCl_3 também leva à formação de DHPMs N3-formiladas **87** de maneira quimiosseletiva (**Esquema 30**).



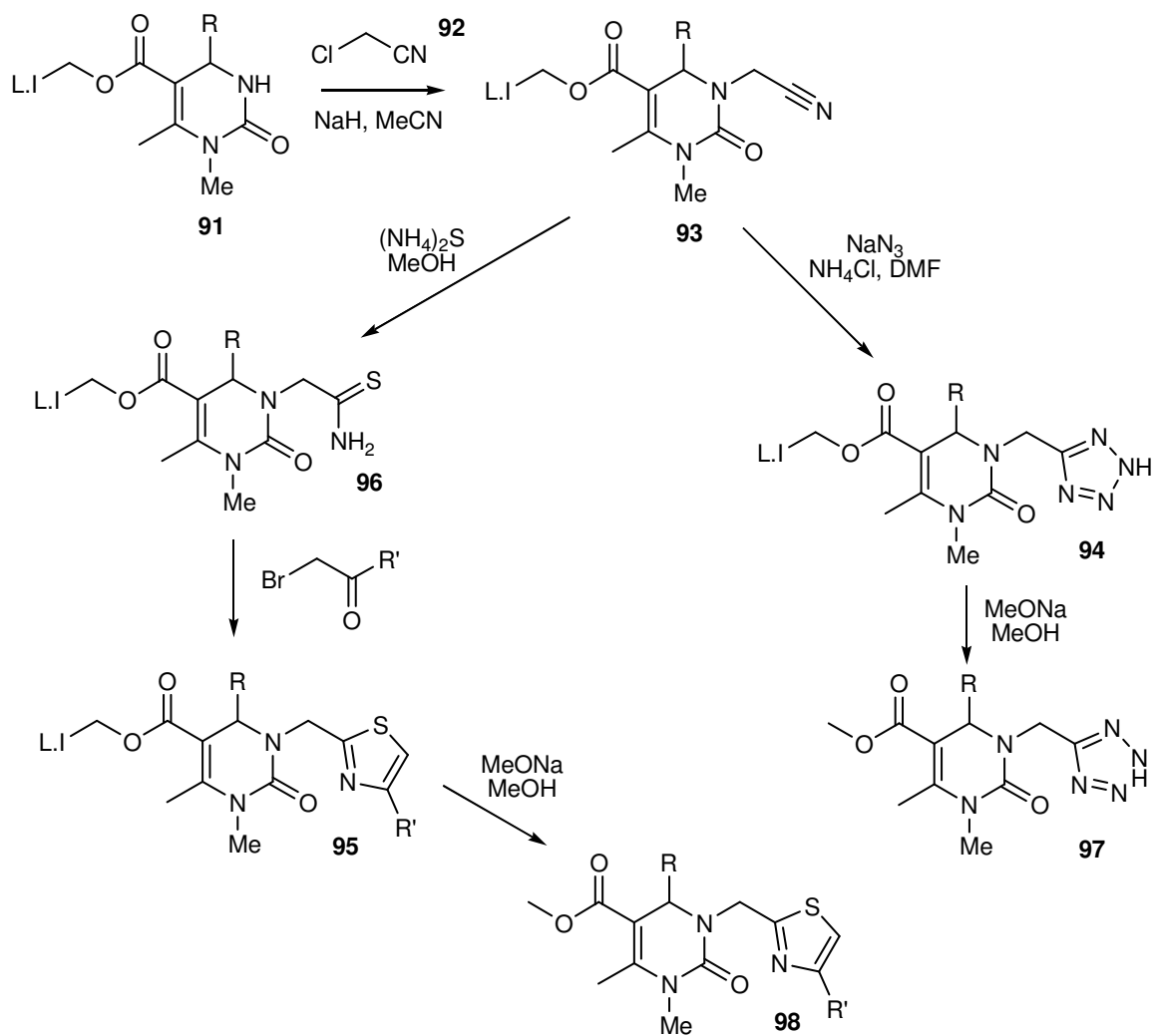
Esquema 30

Entretanto, reações de alcoxicarbonilação com cloroformatos **88** são mais problemáticas e, apesar da preferência pela reação no N3, podem levar a misturas de carbamatos (**89** e **90**) nas posições N1 e N3 (**Esquema 31**). Anéis aromáticos em C4 com substituição *-orto* costumam direcionar a alcoxicarbonilação para o N1 e, neste caso, a síntese quimiosseletiva de carbamatos na posição N3, através desta reação, requer proteção prévia do nitrogênio N1.⁴⁶



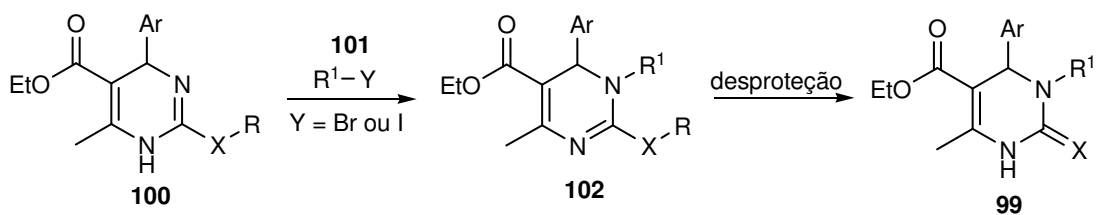
Esquema 31

Para realizar alquilação na posição N3 é necessário além da proteção em N1 a utilização de uma base mais forte (NaH), devido à menor acidez do NH na posição 3.⁹³ Legeay *et al.* sintetizaram uma série de DHPMs inéditas empregando esta estratégia⁹⁵ (**Esquema 32**). As DHPMs N1-protegidas **91** ligadas a um líquido iônico foram reagidas com cloroacetonitrila (**92**) para obtenção dos derivados **93**. Este foi submetido à reação de cicloadição gerando o tetrazol **94**, e também foi convertido nos tiazóis **95** através dos intermediários tioamida **96** (Síntese de tiazóis de Hantzsch). Os produtos (**97** e **98**) foram obtidos após clivagem da ligação éster com o líquido iônico.



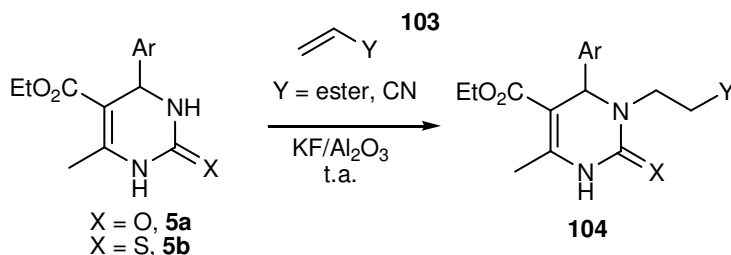
Esquema 32

DHPMs monoalquiladas na posição N3 **99** podem ser obtidas através dos intermediários da modificação de Atwal (**Esquema 33**). As diidropirimidinas **100**, obtidas através da reação de iso(tio)uréias com adutos de Knoevenagel, são alquiladas com haletos de alquila **101** nessa posição gerando os intermediários **102**.^{95,96} Após a alquilação, os produtos podem ser desprotegidos da maneira usual gerando as DHPMs N3 alquiladas **99**. Embora na maioria dos casos esta alquilação ocorra de forma quimiosseletiva na posição N3, às vezes ocorre formação de misturas N3 e N1 alquiladas, dependendo tanto da natureza do agente alquilante quanto do substrato.⁴⁶



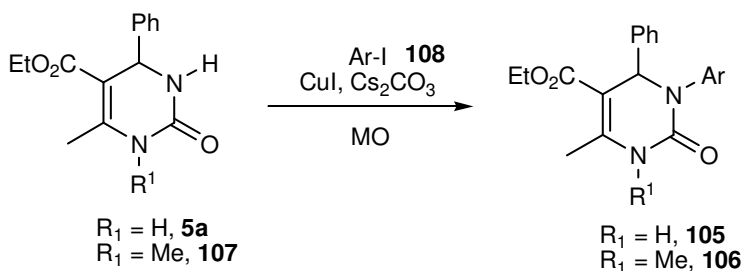
Esquema 33

Wang *et al.*⁹⁷ reportaram a síntese quimiosseletiva de DHPMs N3-substituídas através de uma reação de adição aza-Michael (**Esquema 34**). As DHPMs **5a/5b** reagiram com diversos aceptores de Michael **103** na presença de KF/Al₂O₃ gerando as DHPMs **104** em bons rendimentos. Os autores atribuem a quimiosseletividade observada à maior densidade eletrônica sobre o N3 em relação ao N1.



Esquema 34

Wannberg *et al.*⁹⁹ demonstraram ser possível obter DHPMs N3-ariladas **105** e **106** através da reação de Goldberg,¹⁰⁰ variação da reação de Ullmann,¹⁰¹ envolvendo aminas ao invés de alcoóis (**Esquema 35**). As DHPMs (**5a** e **107**) quando tratadas com iodetos de arila (**108**) na presença de CuI geram quimiosseletivamente as DHPMs N3-ariladas **105** e **106**. As DHPMs contendo o grupamento metila na posição N1 **107** levaram a maiores rendimentos do que aquelas com N1-H **5a**, porém não foram observados subprodutos N1-arilados.

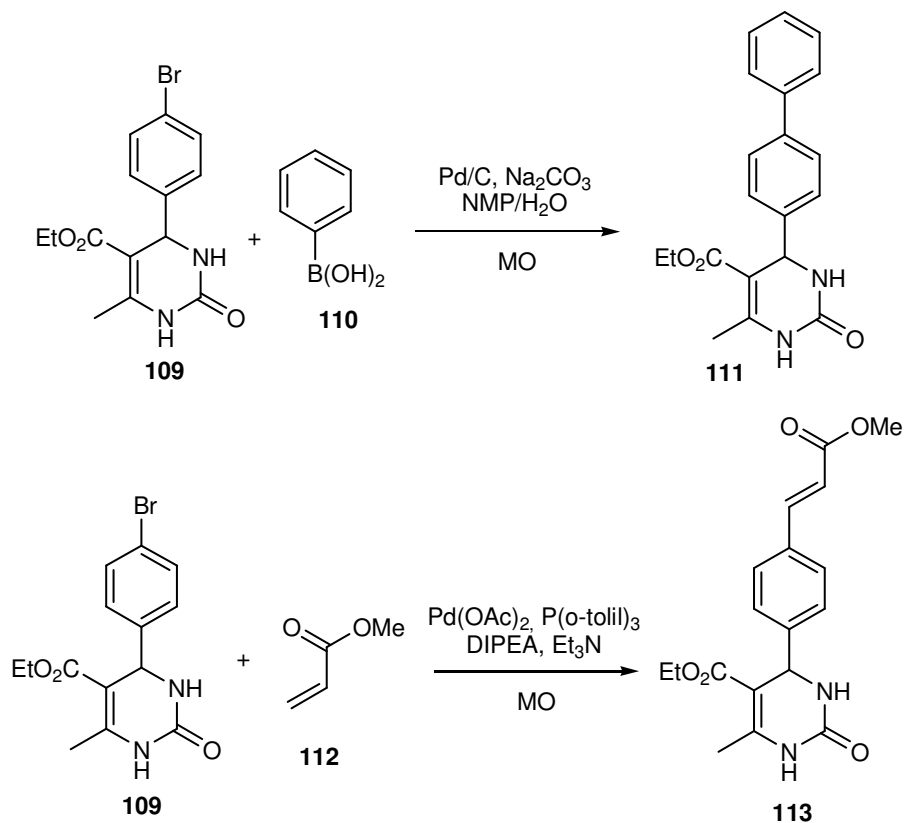


Esquema 35

1.1.5.4. Reatividade na posição C4

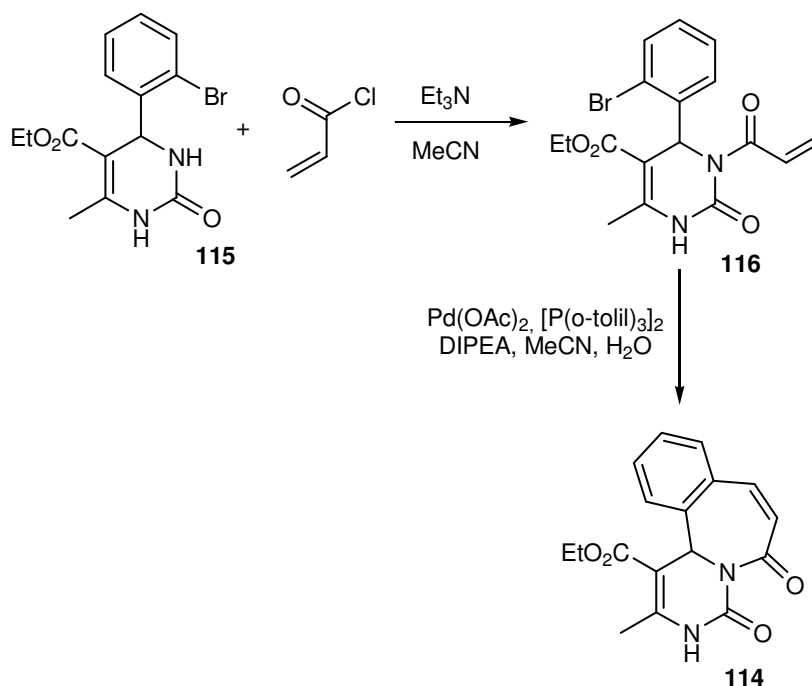
Apesar da maior parte da diversidade química nesta posição do núcleo DHPM ser obtida diretamente através da reação de Biginelli, algumas modificações sobre o heterociclo formado são reportadas na literatura. Wannberg *et al.*⁹⁹ investigaram reações de acoplamento sobre DHPMs contendo brometos de arila como substituintes na posição C4 (**Esquema 36**). Sobre a DHPM **109**, foi realizada a reação de Suzuki com o ácido borônico

(**110**) possibilitando a obtenção do derivado **111** em rendimentos quase quantitativos. Esta mesma DHPM **109** foi submetida à reação de Heck intermolecular com acrilato de metila (**112**) gerando o derivado **113** em 65% de rendimento.



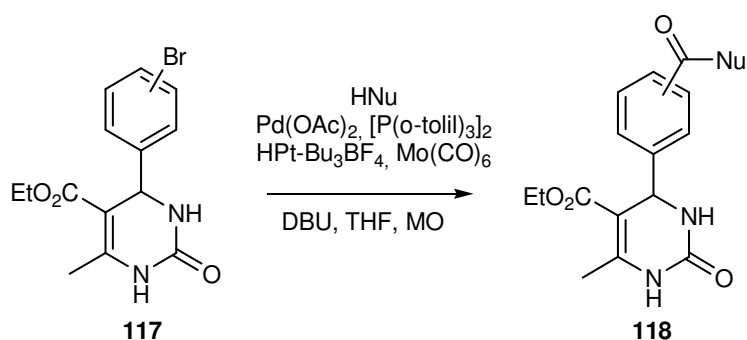
Esquema 36

Uma versão intramolecular da reação de Heck⁹⁹ foi utilizada para obtenção do derivado tricíclico **114** (Esquema 37). A estratégia consiste na acilação quimiosseletiva da DHPM **115** seguida por ciclização do intermediário **116**.



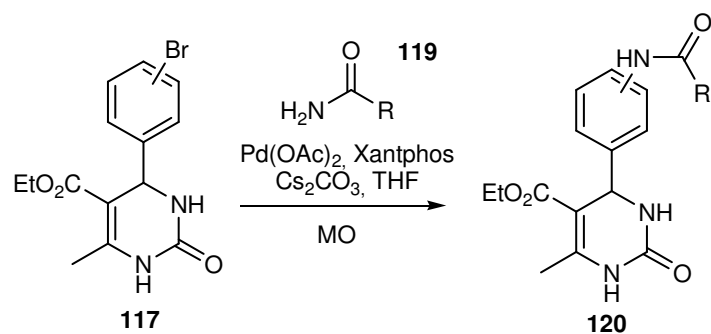
Esquema 37

Reações de carbonilação utilizando $\text{Mo}(\text{CO})_6$ como fonte de monóxido de carbono foram estudadas por Wannberg *et al.*⁹⁹ utilizando 4-bromoaril-DHPMs **117** (**Esquema 38**). Empregando alcoóis, amins e hidrazinas como nucleófilos, os autores demonstraram ser possível obter os derivados substituídos **118** com ésteres, amidas e hidrazonas nas posições *-meta* e *-para* em bons rendimentos.



Esquema 38

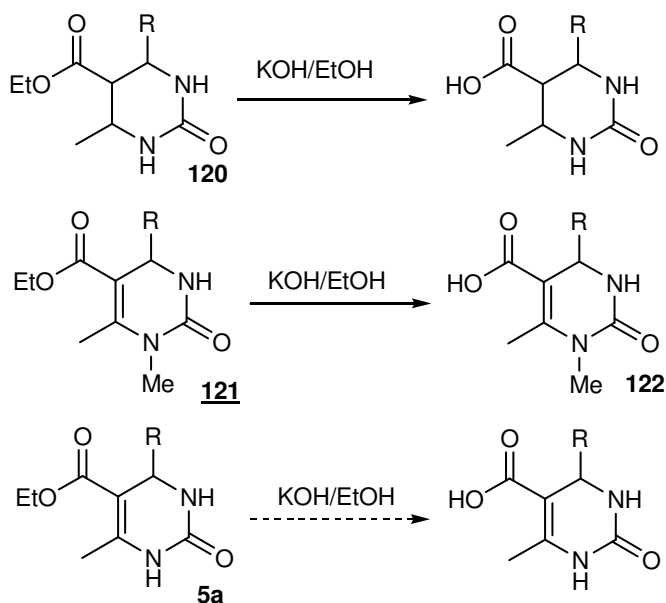
Wannberg *et al.*⁹⁹ também estudaram reações de N-arilação com amidas **119** sobre 4-bromoaril-DHPMs **117** catalisadas por paládio (**Esquema 39**). As respectivas anilinas aciladas **120** foram obtidas em bons rendimentos e baixos tempos reacionais empregando irradiação por microondas (MO).



Esquema 39

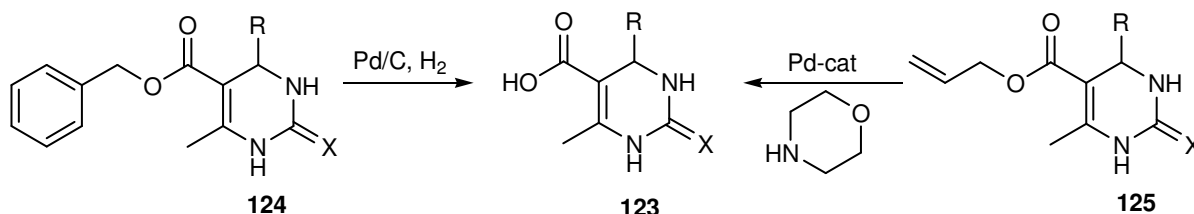
1.1.5.5. Reatividade na posição C5

O grupamento éster nesta posição do núcleo DHPM é pouco reativo frente condições de hidrólise e nucleófilos. Esta baixa reatividade pode ser atribuída à forte conjugação com a enamina nas posições N1-C6-C5, evidenciado pelo fato da hexaidropirimidina **120** não apresentar problemas na reação de hidrólise.¹⁰² É reportado na literatura que DHPMs contendo o grupamento metila em N1 **121** são hidrolisadas ao ácido carboxílico correspondente **122** em KOH alcoólico 5%, enquanto DHPMs não substituídas na posição N1 **5a** são inertes à hidrólise básica ou ácida⁵³ (**Esquema 40**).



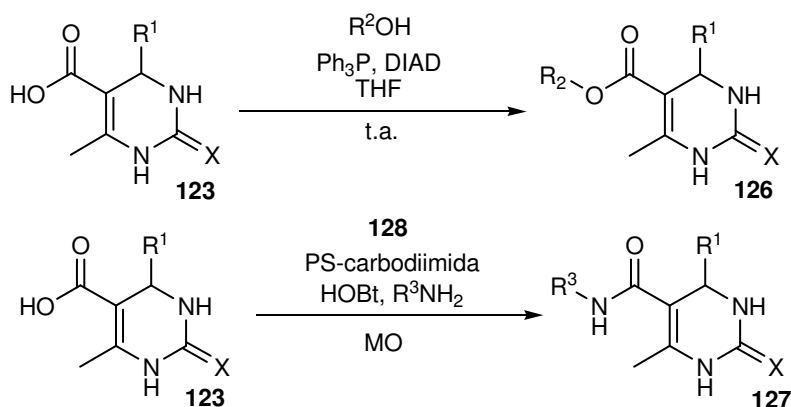
Esquema 40

Uma das formas encontradas para obter DHPMs não substituídas na posição N1 contendo grupamento ácido carboxílico na posição C5 **123** consiste na hidrogenólise de ésteres benzílicos **124** ou na desproteção de ésteres alílicos⁵³ **125** (**Esquema 41**).



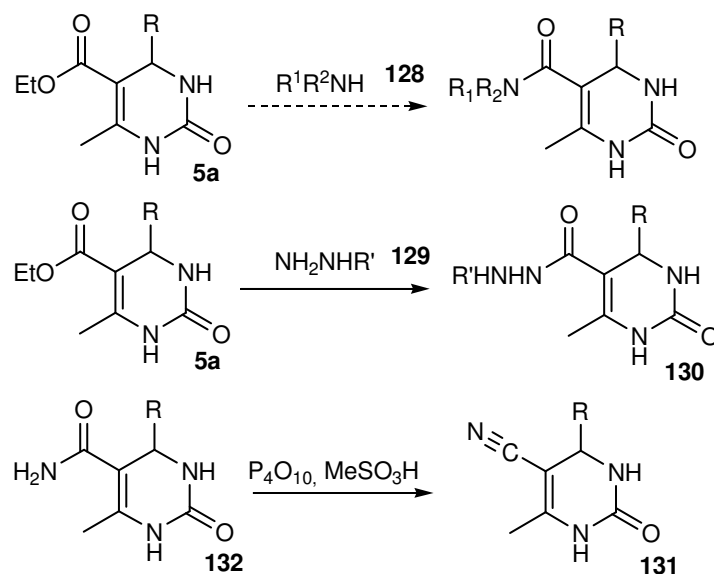
Esquema 41

Desai *et al.*¹⁰³ utilizaram uma grande variedade de ácidos **123** obtidos através desta maneira para a síntese de ésteres e amidas (**Esquema 42**). Os ésteres **126** foram sintetizados através do protocolo de Mitsunobu com utilização de PPh₃ e DIAD (diisopropil azodicarboxilato) em rendimentos de baixos a excelentes. As amidas **127** foram sintetizadas através da utilização de uma carbodiimida suportada em um polímero de poliestireno **128** e HOBt, utilizando irradiação por microondas (MO). Também se encontra na literatura protocolos para a síntese de amidas a partir dos respectivos ácidos **123** utilizando DCC.¹⁰⁴



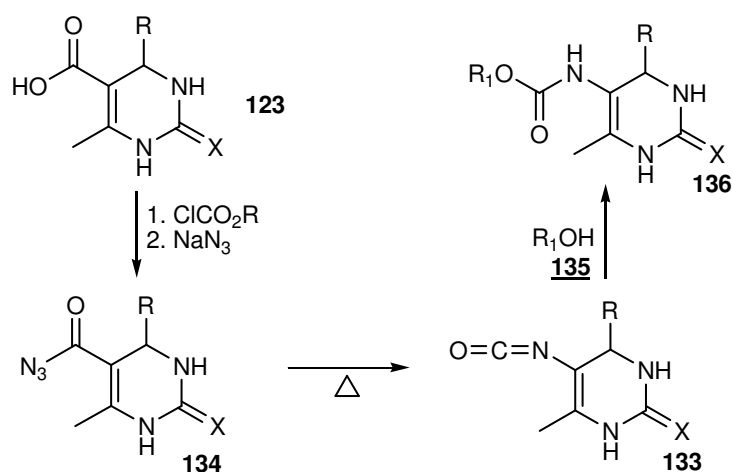
Esquema 42

Além da baixa reatividade frente à hidrólise, o grupamento éster **5a** também é pouco reativo frente à nucleófilos. Tentativas de reagir DHPMs com aminas **128** não obtiveram sucesso, entretanto, quando se utiliza hidrazinas **129** como nucleófilos a reação ocorre, levando à obtenção das hidrazonas **130**.⁵³ DHPMs substituídas com uma nitrila na posição 5 **131** podem ser obtidas a partir da desidratação de DHPMs contendo amida na posição 5 **132** através da sua reação com P₄O₁₀ em ácido metanossulfônico⁵³ (**Esquema 43**).



Esquema 43

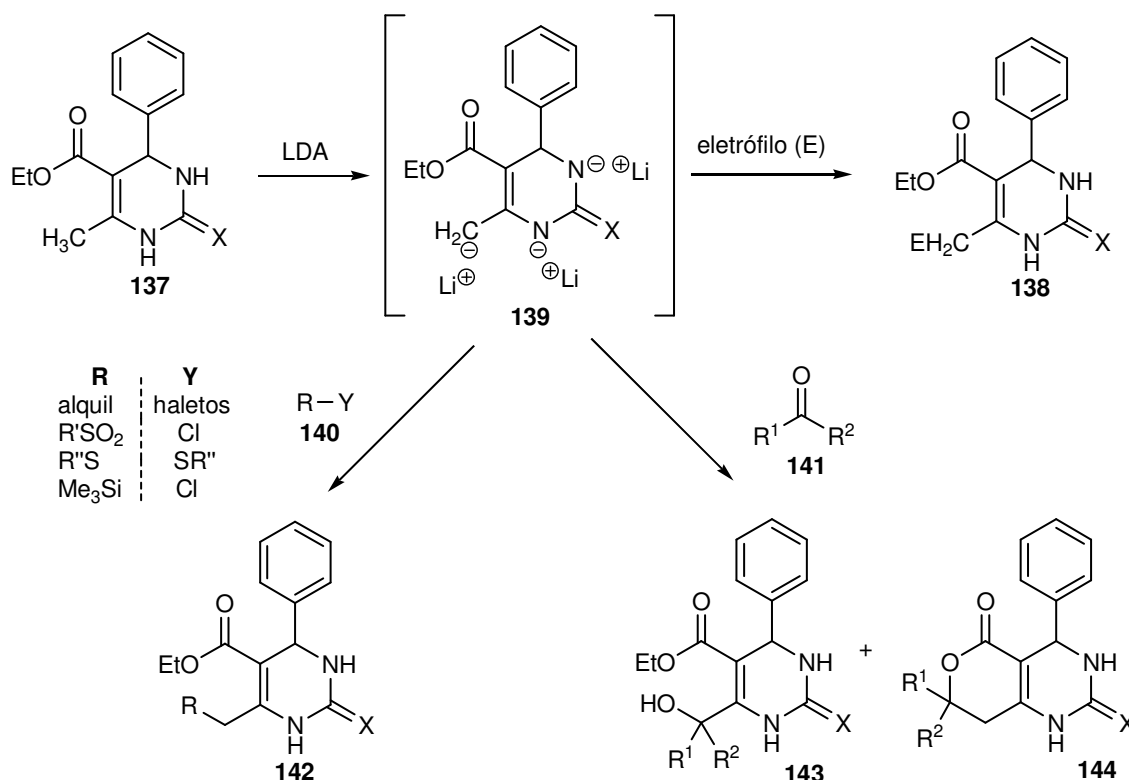
Kappe *et al.*⁹⁴ demonstraram que, a partir da DHPM contendo o grupamento ácido carboxílico na posição 5 **123**, pode-se obter os isocianatos **133** (Esquema 44). Primeiramente faz-se a conversão do ácido **123** em azida carboxílica **134** e esta por sua vez, pode sofrer um rearranjo de Curtius levando às DHPMs contendo o grupamento isocianato **133**. Estas DHPMs **133** podem então reagir com alcoóis **135** gerando os carbamatos **136**.



Esquema 44

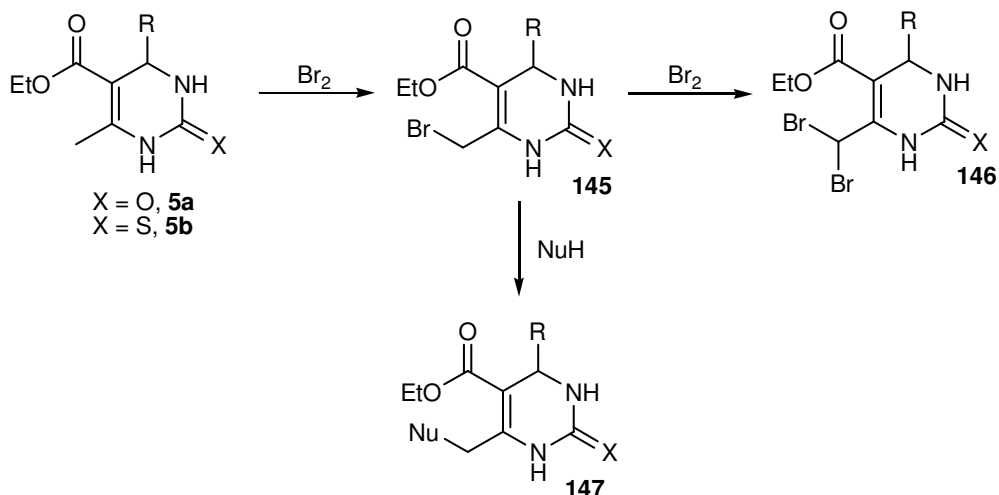
1.1.5.6. Reatividade na posição C6

Singh *et al.*¹⁰⁵ demonstraram que a metalação da DHPM **137** com 3,1 equiv. de LDA e posterior reação com eletrófilos leva a produção exclusiva da DHPM substituída em C-6 **138** (**Esquema 45**). Os autores reagiram o ânion **139** com uma série de eletrófilos **140** e compostos carbonílicos **141** gerando os derivados **142**, **143** e **144** (como subprodutos da reação com compostos carbonílicos) em rendimentos aceitáveis.



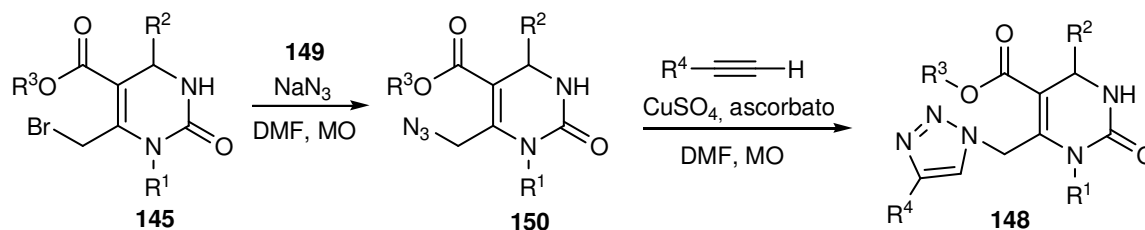
Esquema 45

Com DHPMs substituídas com grupamento metila na posição 6 **5**, ou seja, DHPMs derivadas de acetoacetatos, pode-se realizar bromação radicalar nesta posição (**Esquema 46**). Esta bromação ocorre passo a passo, podendo-se isolar tanto 6-bromometil-DHPMs **145** quanto 6-dibromometil-DHPMs **146**. Os compostos bromados podem reagir *via* substituição nucleofílica com uma grande variedade de nucleófilos contendo O, N ou S gerando os derivados **147**.⁸⁷



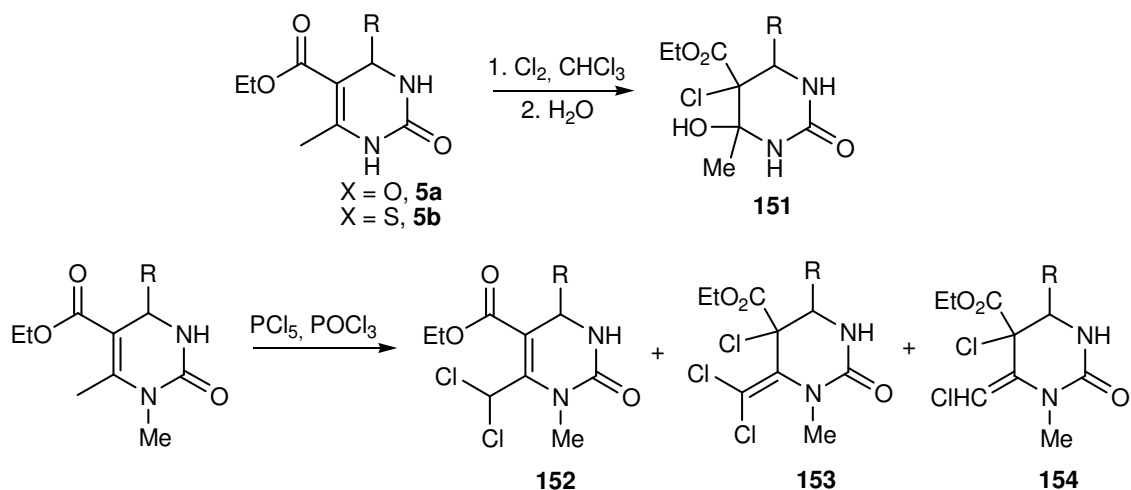
Esquema 46

Khanetskyy *et al.*¹⁰⁶ aplicaram esta estratégia para a síntese de uma quimioteca de DHPMs contendo o núcleo 1,2,3-triazol como substituinte em C6 **148** (**Esquema 47**). As respectivas 6-bromometil-DHPMs **145** foram tratadas com azida sódica (**149**) para obtenção dos derivados **150**, e a partir destes foram obtidas as respectivas triazolil-diidropirimidonas **148** através da cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, processo conhecido como *click chemistry*.¹⁰⁷



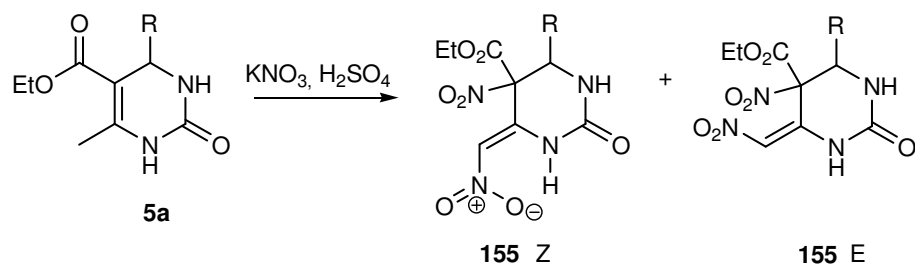
Esquema 47

Uma reação diferente ocorre quando as DHPMs **5** são tratadas com cloro elementar em clorofórmio (**Esquema 48**). Neste caso, ao invés da reação de ocorrer na metila substituinte em C6 ocorre na dupla ligação entre C5-C6, levando as hexaidropirimidinas **151** após tratamento com água. Quando a reação de cloração é realizada com PCl_5 em $POCl_3$ ocorre a formação do derivado diclorado **152**, e das hexaidropirimidinas **153** e **154**.⁵³



Esquema 48

Outra reação que ocorre nesta posição é a nitração utilizando nitrato de potássio em ácido sulfúrico.¹⁰⁸ Nestas condições, DHPMs **5a** são convertidas no produto dinitrado **155**, o qual existe como uma mistura de isômeros E e Z em solução, com alguma preferência pelo isômero Z devido à ponte de hidrogênio intramolecular (**Esquema 49**).



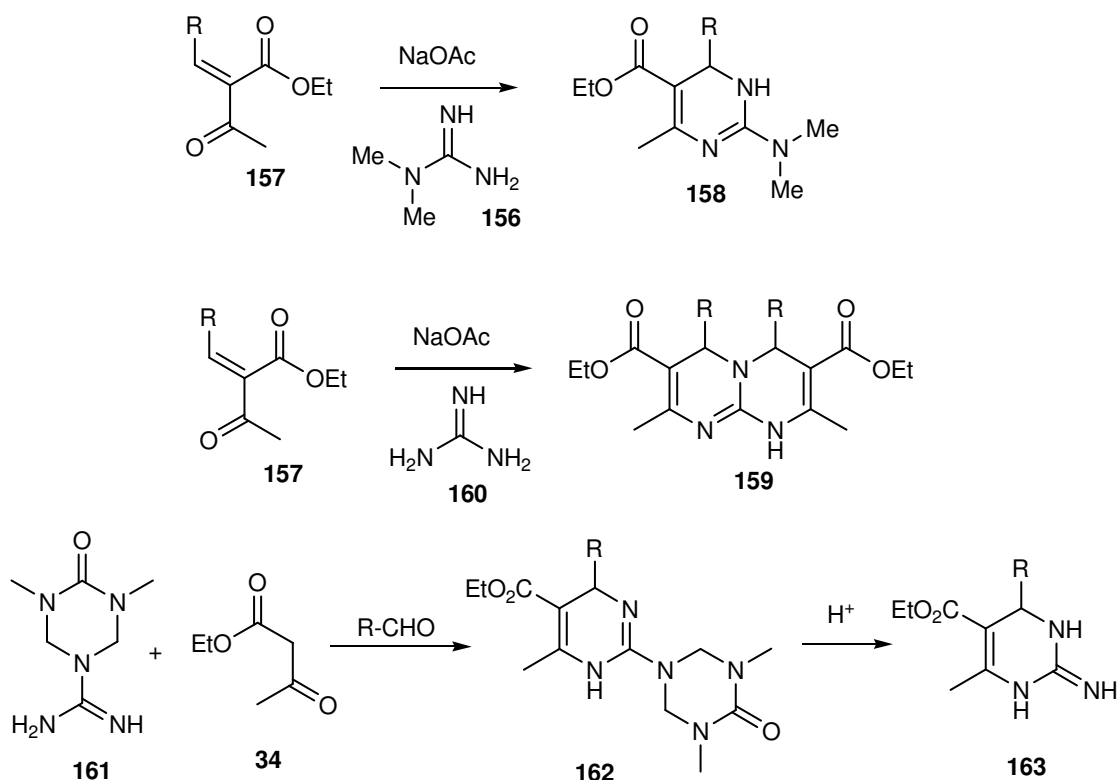
Esquema 49

1.1.6. Síntese de DHPMs contendo a função guanidina

A função guanidina é encontrada em uma grande variedade de produtos naturais e desempenha um papel importante em diversos sistemas biológicos.¹⁰⁹ Este grupo também é encontrado em muitos fármacos, cobrindo uma vasta gama de atividades farmacológicas. O grupamento guanidina, por apresentar características básicas, apresenta alta afinidade por carboxilatos, fosfatos e metais, o que é um aspecto importante nas interações ligante/receptor, sendo assim um importante farmacóforo na química medicinal.¹¹⁰

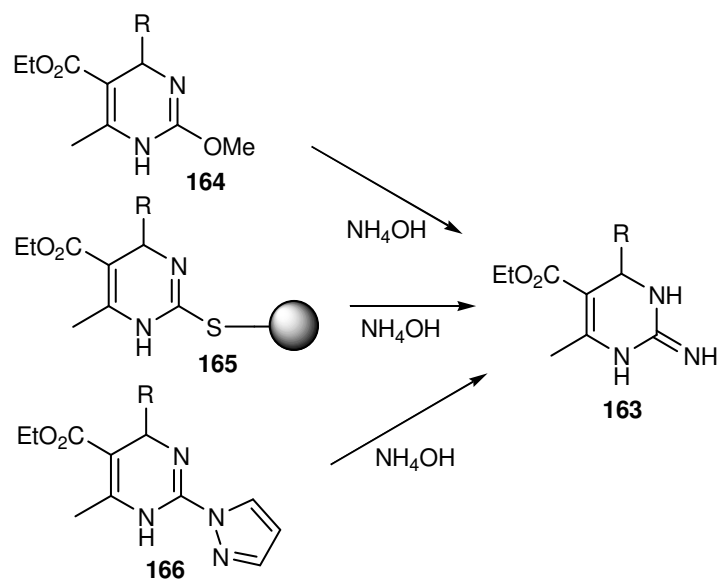
Existem muitas maneiras para sintetizar guanidinas, tanto utilizando síntese em solução, quanto utilizando síntese orgânica em fase sólida.¹¹¹ A maneira mais empregada para a síntese deste grupo funcional consiste na síntese a partir de tiouréias. Para isso a tiouréia é reagida com uma amina na presença de agentes extrusores de enxofre. Os reagentes mais utilizados para extrusão do enxofre são: N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC),¹¹² cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC),¹¹³ cloreto de mercúrio II (HgCl₂),¹¹⁴ óxido de mercúrio II (HgO),¹¹⁵ iodeto de 2-cloro-1-metilpiridínio (Reagente de Mukaiyama),¹¹⁶ 2,4-dinitrofluorbenzeno (Reagente de Sanger),¹¹⁷ dicloreto de trifetilfosfano,¹¹⁸ CuSO₄/SiO₂,¹¹⁹ reagentes de Bi III¹²⁰ e CuCl/K₂CO₃.¹²¹

Os primeiros exemplos da síntese de DHPMs contendo o grupamento amino na posição 2 encontrados na literatura envolvem a modificação de Atwal,^{85, 122} onde uma guanidina N,N-dissubstituída **156** reage em meio básico com um aduto de Knoevenagel **157** levando à formação da guanidina **158 (Esquema 50)**. O grande problema desta abordagem, além dos baixos rendimentos, é a formação do subproduto bicíclico **159** quando se utiliza a guanidina sem substituintes **160**. Kappe e outros autores^{123,124} demonstraram que a formação deste subproduto **159** é minimizada quando a metila do grupamento cetônico do β-cetoéster utilizado é substituída por uma fenila. Nilsson *et al.*¹²⁵ resolveram o problema de formação dos subprodutos bicíclicos **159** através da utilização de guanidinas protegidas **161** na reação multicomponente de Biginelli. Os produtos **162** assim obtidos podem ser desprotegidos em uma etapa pós-condensação gerando as guanidinas **163 (Esquema 50)**.



Esquema 50

Outra abordagem sintética para a síntese destes derivados **163** consiste na reação de aminólise com amônia de DHPMs contendo o grupamento isouréia ou isotiouréia como precursores de guanidinas (**Esquema 51**). Atwal⁴⁷ demonstrou que é possível realizar a aminólise de compostos de Biginelli contendo metilisouréias **164**, embora muitos autores relatem dificuldades neste processo, sendo muitas vezes necessário adicionar um grupamento carbamato ao N3 para obter bons rendimentos.⁴⁵ Kappe preparou 2-imino-3,4-diidropirimidinas **163** através da aminólise de DHPMs ligadas à resina Merrifield através de um grupamento isotiouréia **165**.⁸¹ A utilização de diferentes grupos abandonadores como o pirazol **166** também foi reportado na literatura.¹²⁵



Esquema 51

1.1.7. Química Limpa (*green chemistry*) e a reação de Biginelli:

Nos últimos anos, questões ambientais têm recebido muita atenção internacional. O desenvolvimento auto-sustentável, definido como o progresso industrial que atende às necessidades do presente sem comprometer a capacidade das futuras gerações de satisfazerem às suas próprias necessidades, tem sido buscado através de políticas de redução das emissões de resíduos ao ambiente e/ou o controle da degradação de reservas ambientais.¹²⁶

Uma vez que as atividades químicas são relacionadas, direta ou indiretamente, como uma das principais vilãs a ser combatida nesta nova mentalidade ambientalmente correta, uma nova tendência na maneira como a questão dos resíduos químicos deve ser tratada começou a se delinear no início dos anos 90. Esta nova tendência passou a focar-se em alternativas de minimização da produção dos resíduos, em vez de focar-se exclusivamente no tratamento do resíduo no final da linha de produção. Esta nova maneira de lidar com a questão da redução do impacto da atividade química no ambiente vêm sendo chamada de *Green Chemistry*, química verde ou química limpa.

A filosofia da química limpa está baseada atualmente em 12 princípios:¹²⁷

1 - Prevenção da geração de resíduos é melhor que tratá-los ao final da linha de produção;

- 2** - Economia atômica, isto é, planejar metodologias sintéticas que maximizem a incorporação de toda a massa dos reagentes no produto;
- 3** - Sempre que possível, as metodologias sintéticas devem usar e gerar substâncias com a menor toxicidade possível, tanto à vida humana quanto ao meio ambiente;
- 4** - Os produtos químicos devem ser planejados de modo a terem maior eficiência no cumprimento de seus objetivos, apresentando menor toxidez;
- 5** - O uso de substâncias auxiliares (solventes, secantes, catalisadores, dentre outras) deve, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas devem ser inócuas;
- 6** - As exigências energéticas do processo devem ser analisadas de acordo com os seus impactos ambientais e econômicos e devem ser minimizadas. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambiente;
- 7** - Sempre que técnica- e economicamente possível, a utilização de matérias-primas oriundas de fontes renováveis devem ser escolhidas em detrimento de fontes não-renováveis;
- 8** - A derivatização desnecessária (uso de grupos protetores, modificações temporárias por processos físicos e químicos) deve ser evitada ou, pelo menos, minimizada. Esta postura leva a uma diminuição no número de etapas e minimiza a utilização de reagentes adicionais que podem gerar resíduos;
- 9** - Deve-se visar a utilização de reagentes em proporções catalíticas ao invés de estequiométricas;
- 10** - Os produtos químicos devem ser planejados de modo tal que, após cumprirem sua função, eles não persistam no ambiente e que seus produtos de degradação sejam inócuos;
- 11** - Métodos analíticos devem ser desenvolvidos de modo que permitam um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, evitando assim a formação de substâncias nocivas;
- 12** - As substâncias, bem como a maneira pela qual a substância é utilizada no processo, devem ser cuidadosamente analisadas de forma a minimizar o potencial para acidentes químicos.

A reação de Biginelli apresenta um grande potencial para aplicação de metodologias compatíveis com a química verde devido às suas características intrínsecas: alta economia

atômica,¹²⁸ com praticamente toda massa dos reagentes sendo convertida em produto e perda de apenas dois moles de água por mol de produto formado; síntese em uma etapa, não havendo necessidade de etapas de proteção/desproteção; possibilidade de protocolos conduzidos à temperatura ambiente e; fácil isolamento das DHPMs formadas necessitando apenas de tratamento com água, sem a necessidade de técnicas laboriosas de purificação.

A utilização de solventes é uma prática adotada amplamente em síntese orgânica. Realizando a dissolução dos solutos os solventes quebram a rede cristalina dos reagentes sólidos, dissolvem reagentes líquidos ou gasosos, e exercem uma influência considerável na velocidade de reação, posição do equilíbrio químico e na própria composição dos produtos. Ainda, os reagentes podem interagir de maneira mais efetiva se estes se encontram em uma solução homogênea, a qual facilita a agitação do meio reacional fazendo com que as moléculas dos reagentes colidam de forma mais rápida e contínua. Além disso, aquecimento e resfriamento uniformes da mistura reacional podem ser feitos de maneira mais fácil quando em solução.¹²⁹ Apesar de apresentarem todas estas vantagens do ponto de vista químico, a utilização de solventes voláteis, principalmente em larga escala, é extremamente danosa para o meio ambiente e para a saúde da população global.

A utilização de solventes também representa um custo elevado quando se trata de produção industrial. Nos dias de hoje, várias companhias têm adotado a estratégia de redução do uso de solventes em sua cadeia produtiva. Dois exemplos ilustram esta tendência. O primeiro é a redefinição do processo de manufatura do antidepressivo Sertralina.¹³⁰ A indústria farmacêutica Pfizer diminuiu o número de etapas do processo de manufatura original de uma sequência sintética em três etapas para uma única etapa, sem isolamento dos intermediários. Desta maneira a quantidade de materiais de partida foi cortada de 20-60% e a necessidade de utilização, destilação e recuperação de quatro solventes tóxicos (diclorometano, tetraidrofurano, tolueno e hexano) foi abolida, sendo substituídos por etanol. Da mesma maneira, uma grande diminuição no uso de solventes ocorreu no processo de manufatura do Sildenafil, onde a utilização de solventes foi reduzida de 1700 para 7 L/kg.¹³¹

A eliminação de solventes orgânicos voláteis em síntese orgânica é um dos objetivos mais importantes da química verde. Entretanto, a eliminação do uso de solventes de todos os processos de manufatura química é um objetivo um tanto difícil de ser alcançado, se não impossível. Processos alternativos que utilizam solventes menos danosos do ponto de vista médico e ambiental vêm sendo cada vez mais empregados, dentre eles destaca-se a crescente utilização de água, líquidos iônicos e fluorosos, a utilização de fluidos supercríticos e as reações sem solvente.¹³²

Tradicionalmente a reação de Biginelli é realizada em solventes como o etanol ou metanol, porém mais recentemente solventes apróticos como tetraidrofurano,^{61,133} dioxano⁵⁶ ou acetonitrila^{134,135} também vêm sendo empregados com sucesso. Em alguns casos é necessário utilizar ácido acético como solvente,^{136,55} principalmente nos casos onde ocorre a precipitação do intermediário bisureído no meio reacional. Também existem exemplos na literatura de reações de Biginelli em água¹³⁷ e com a utilização de líquidos iônicos.¹³⁸

Reações sem solvente tornam a síntese mais simples, economizam energia, e previnem desperdício, perigos e toxicidade. Reações sem solvente em meio heterogêneo,¹³⁹⁻¹⁴⁶ com reagentes imobilizados em suportes sólidos porosos, apesar de apresentarem grandes rendimentos, maior seletividade e facilidade na manipulação experimental, não preenchem exatamente a definição de “sem solvente”. O uso de solventes somente é eliminado no primeiro estágio da reação, enquanto uma grande quantidade de solventes ainda se faz necessária para a adsorção dos reagentes e eluição dos produtos. Uma reação pura (*neat reaction*) é uma alternativa às reações sem solvente que elimina a utilização de suporte sólido e também de solventes nas reações.

Uma grande quantidade de artigos científicos utilizando técnicas de reação pura aplicadas à síntese de diidropirimidinonas e seus análogos de enxofre foram publicadas nos últimos anos. Entre elas estão a utilização de ácido cloroacético,¹⁴⁷ ácido fórmico,¹⁴⁸ NH₄Cl,¹⁴⁹ H₃PW₁₂O₄₀,¹⁵⁰ Y(NO₃)₃.6H₂O,¹⁵¹ CuBF₄,¹⁵² BiNO₃,¹⁵³ TaBr₅,¹⁵ HBF₄,¹⁵⁴ ZrCl₄ e ZrOCl₂,¹⁵⁵ [Fe(CF₃CO₂)₃] e [Fe(CF₃SO₃)₃],¹⁵⁶ Sr(OTf)₂,¹⁵⁷ CeCl₃.7H₂O,¹³⁷ Yb(OTf)₃²¹ e CuI.¹⁵⁸ A maioria destas técnicas apresenta rendimentos superiores às que fazem utilização de solvente, além de apresentarem menores tempos reacionais, e maior pureza dos produtos isolados.

1.2. OBJETIVOS

Os objetivos buscados neste capítulo são sintetizar uma coleção de diidropirimidinonas e análogos de enxofre e explorar a reatividade dessas DHPMs com o intuito de gerar diversidade química para avaliação biológica e determinação de relação estrutura-atividade. Pretende-se utilizar um vasto arsenal de metodologias para este fim. As estratégias planejadas incluem o emprego da síntese em solução, além de técnicas modernas como utilização de energia de microondas e de síntese combinatória, particularmente a Síntese Orgânica em Fase Sólida e reações em paralelo.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Otimização da síntese de diidropirimidin-2-tionas promovida por $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ utilizando irradiação por microondas

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa²⁴ demonstram que o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é um ácido de Lewis eficiente na promoção da reação multicomponente de Biginelli, fornecendo bons rendimentos com uma grande variedade de aldeídos aromáticos, com a utilização de uréia ou tiouréia. A vantagem da utilização deste ácido é que não há necessidade de meio reacional anidro, diferentemente de muitos métodos encontrados na literatura envolvendo ácidos de Lewis.

A utilização de energia de microondas (MO) em síntese orgânica é conhecida por fornecer bons rendimentos com redução significativa dos tempos reacionais.⁷⁰ Desta maneira foi planejada a adaptação da utilização de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na reação de Biginelli, utilizando irradiação por microondas como fonte de energia. O objetivo deste estudo é reduzir os tempos reacionais obtidos anteriormente mantendo os bons rendimentos apresentados.

A utilização de fornos de microondas convencionais na síntese orgânica pode gerar problemas de segurança, como incêndios e explosões, devido à possibilidade de superaquecimento. A utilização de protocolos que não envolvem a utilização de solventes é uma estratégia empregada para aumentar a segurança e a velocidade da reação.¹⁵⁸

Em vista destes fatores, adaptamos o protocolo previamente desenvolvido²⁴ da seguinte maneira:

- a proporção do catalisador $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi mantida conforme otimização prévia (20mol%);
- os solventes acetonitrila e etanol foram excluídos. As reações foram realizadas sem a utilização de solvente algum (*solvent-free*);
- a proporção entre aldeído aromático, acetoacetato de etila (**34**) e tiouréia (**41**) (1:1:1,2 equiv., respectivamente) foi re-investigada em relação à tiouréia. Como se trata do reagente mais polar presente no meio reacional, este é o maior responsável pela absorção da radiação de microondas e conseqüentemente da temperatura atingida na reação. Soma-se o fato de ser o reagente que gera menos problemas na etapa de purificação, uma vez que é bastante solúvel em água enquanto os produtos são insolúveis neste solvente,

possibilitando uma fácil eliminação do excesso de tiouréia.

Utilizando a reação entre o benzaldeído (**29**), acetoacetato de etila (**34**) e tiouréia (**41**) como modelo reacional, a potência de irradiação e tempo foram otimizados (**Esquema 52**). As reações foram conduzidas em forno de microondas convencional, realizando ciclos de 1 minuto em diferentes potências do equipamento. Após otimização da potência e número de ciclos, foi investigada a proporção de tiouréia (**41**). As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada. Os resultados são apresentados na **Tabela 1**.

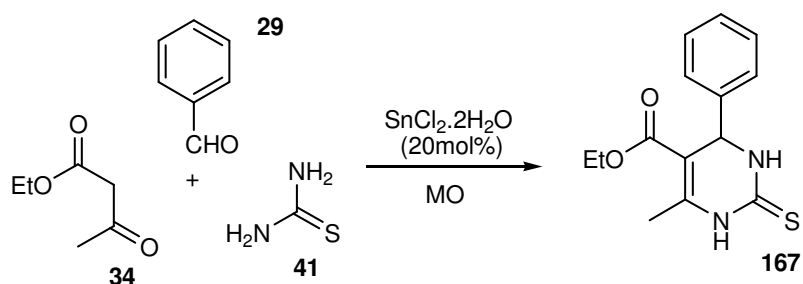


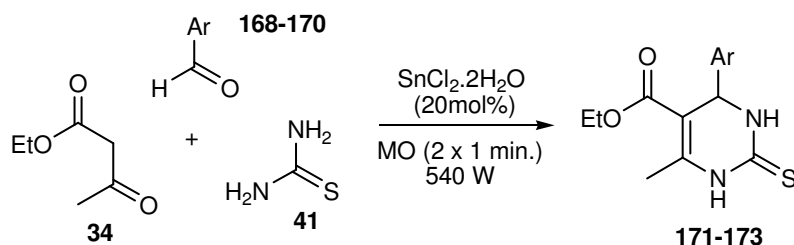
Tabela 1. Otimização da potência, nº de ciclos e proporção de tiouréia nas reações catalisadas por SnCl₂·2H₂O

Entrada	Nº de ciclos (1 min)	Potência (W)	Tiouréia (41) (equiv.)	Rendimento 167 (%)
1	10	90	1,2	-
2	10	180	1,2	15
3	10	270	1,2	23
4	7	360	1,2	36
5	5	450	1,2	64
6	3	540	1,2	78
7	2	540	2,0	90
8	1	630	1,2	51
9	2	630	1,2	31*
10	1	630	2,0	-*
11	1	720	1,2	-*
12	1	810	1,2	-*
13	1	900	1,2	-*

*houve perda de material por projeção

Conforme se pode analisar na Tabela 1, a utilização da potência de 10-40% (90-360 W) não apresentou rendimentos satisfatórios mesmo em um grande número de ciclos (entradas 1-4). A utilização de potências muito altas do equipamento (entradas 10-13), não possibilitou isolamento do produto **167** devido ao superaquecimento promovido, o que ocasionou degradação e/ou projeção dos reagentes do frasco reacional. As potências que apresentaram melhor resultado foram de 50-70% (450-630 W) com tempos reacionais variando de 1 a 3 minutos (entradas 5, 6 e 8). Na potência de 70% (630 W) os rendimentos não puderam ser melhorados, pois a utilização de maior tempo ou maior proporção da tiouréia levou à perda de material por projeção (entradas 9-10). Através da utilização de 60% (540 W) de potência do forno, as condições foram otimizadas. A melhor condição encontrada foi através da utilização de 2 ciclos de 1 minuto e tiouréia na proporção de 2 equivalentes, onde o produto **167** foi obtido em 90% de rendimento (entrada 7).

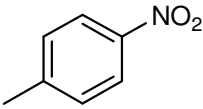
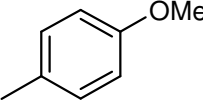
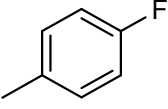
Após otimizar o protocolo de síntese, investigou-se o uso de diferentes aldeídos aromáticos, com grupamentos doadores ou retiradores de carga do anel (**Esquema 53**). As reações foram conduzidas em 2 minutos (2 ciclos de 1 minuto), na potência de 60% (540 W), com aldeído aromático **168-170**, acetoacetato de etila (**34**), tiouréia (**41**) e $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na proporção de 1:1:2:0,2 equiv., respectivamente. Os resultados são apresentados na **Tabela 2**.



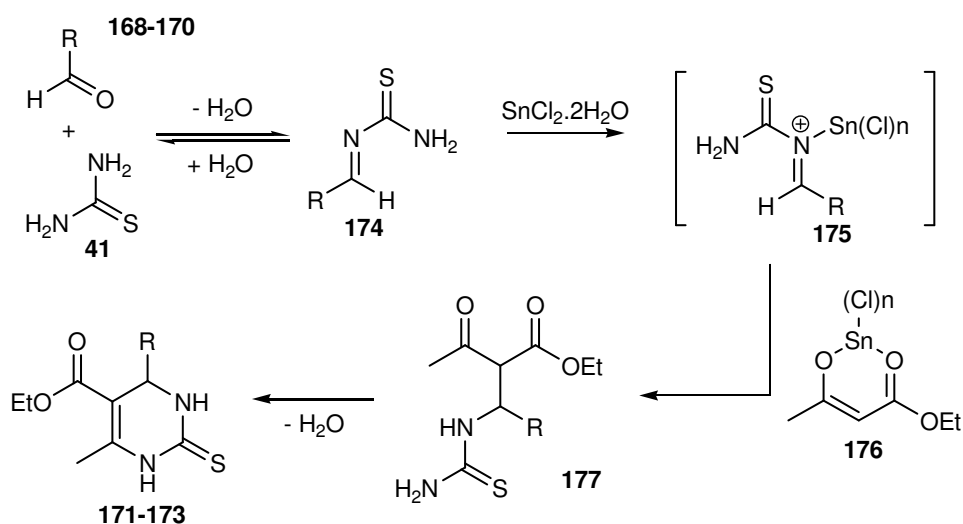
Esquema 53

Conforme pode ser observado na Tabela 2, este protocolo forneceu bons rendimentos, utilizando aldeídos aromáticos com grupos substituintes doadores (entrada 1) e retiradores (entrada 2) de densidade eletrônica. A única exceção foi o produto derivado do 4-Flúor-benzaldeído (**170**), onde foi obtido um rendimento moderado (entrada 3).

Tabela 2: síntese das DHPMs utilizando o protocolo otimizado com SnCl₂.2H₂O.

Entrada	Ar	Aldeído	Rendimento(%)	Produto
1		168	99	171
2		169	100	172
3		170	47	173

De acordo com a proposta de Russowsky *et al.*²⁴, acredita-se que o SnCl₂.2H₂O exerça seu papel de ácido de Lewis na reação de Biginelli através do caminho reacional sugerido por Kappe,³⁹ onde a primeira etapa reacional consiste na condensação entre o aldeído **168-170** e a tiouréia (**41**) gerando a *N*-acilimina **174** (**Esquema 54**). Coordenação do par eletrônico do nitrogênio com o SnCl₂.2H₂O pode levar à formação *in situ* do cátion *N*-acilimínio **175**. Tautomerização do actoacetato de etila para sua forma enólica **176** auxiliada pelo ácido de Lewis, com posterior ataque desta espécie ao íon imínio **175** leva a produção do intermediário **177**. Ciclização intramolecular com perda de uma molécula de água leva à obtenção das DHPMs **171-173** correspondentes.



Esquema 54

Este protocolo demonstra o grande aumento que ocorre na velocidade de reação com a utilização de protocolos em condições *solvent-free* envolvendo a utilização de energia

de microondas. Foi possível manter os bons rendimentos previamente apresentados, diminuindo o tempo reacional, que com aquecimento convencional era de 6h²⁴ para apenas 2 minutos utilizando o novo protocolo desenvolvido, onde o tempo reacional é cerca de 200 vezes inferior ao obtido pelo método anterior.

1.3.2. Síntese de diidropirimidinonas e análogos de enxofre promovida por trietilortoformato (TEOF)

Dando continuidade às investigações de nosso grupo de pesquisa sobre as potencialidades biológicas das DHPMs e seus análogos de enxofre, foi planejado o desenvolvimento de um novo método de síntese que permita preparar estes compostos de maneira rápida, simples e em bons rendimentos. Aspectos relacionados com um baixo custo e metodologia ambientalmente compatível também foram levados em consideração, adequando-se aos princípios atuais da química verde. Apesar de ácidos de Lewis, como SnCl₂.2H₂O, promoverem a reação de Biginelli de uma maneira eficiente, existe ainda o problema de possível contaminação das amostras destinadas a ensaios biológicos conterem traços de metais tóxicos. Outra desvantagem do uso de catalisadores metálicos como o SnCl₂ refere-se às questões ambientais devido a sua alta toxicidade e periculosidade.

Conforme discutido na introdução deste capítulo, alguns dos métodos mais efetivos descritos na literatura para a síntese de DHPMs empregam reagentes que apresentam características tanto desidratantes quanto de ácido de Lewis concomitantemente,³⁵⁻³⁸ porém cabe ressaltar que não há exemplos na literatura da utilização de agentes puramente desidratantes na promoção da reação de Biginelli.

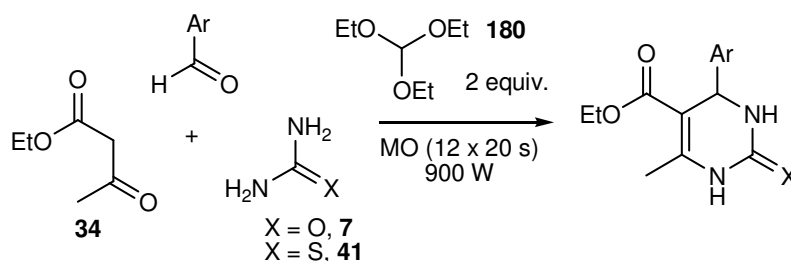
A utilização de um agente desidratante na reação de Biginelli baseia-se no fato desta gerar dois moles de água como produto para cada mol de DHPM formado. Portanto, um agente desidratante poderia agir de duas maneiras distintas: i) ou poderia agir como auxiliar nas etapas de eliminação de água do processo realmente ligando-se ao intermediário que sofre desidratação, facilitando estas etapas, ii) ou apenas promoveria um deslocamento do equilíbrio químico em direção à formação dos produtos pelo consumo das moléculas de água, agindo assim de maneira análoga a uma peneira molecular.

Ortoésteres são uma classe química muito interessante devido a sua estrutura e reatividade peculiares, sendo o trietilortoformato (TEOF - CH(OEt)₃) membro desta classe de compostos.¹⁵⁸ Este composto foi utilizado por Chen *et al.*¹⁵⁹ na determinação quantitativa de

água. Os autores determinaram o conteúdo de água em amostras analíticas através da análise por cromatografia gasosa dos produtos da reação do TEOF com a água, sendo estes produtos compostos por 1 equivalente de formato de etila e 2 equivalentes de etanol. Segundo os autores, a técnica é muito sensível pois, sob catálise ácida, esta reação ocorre rapidamente e a conversão é completa. Como agente desidratante, o TEOF é usado na formação de acetais¹⁶⁰ e também como solvente desidratante para formação de iminas, mesmo na ausência de catálise ácida, tendo aplicação tanto em protocolos de síntese em solução quanto em protocolos utilizando síntese orgânica em fase sólida.¹⁶¹ Outros usos do TEOF reportados na literatura são sua utilização na ciclização de diaminas, onde funciona como doador de uma unidade metilênica em meio ácido,¹⁶² e como grupo protetor de hidroxilas aromáticas vicinais.¹⁶³ Também existem relatos da sua utilização como agente alquilante de nitrogênio aromático, onde atua como doador de grupo etila.¹⁶⁴

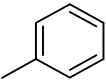
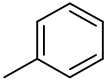
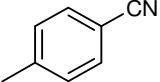
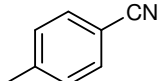
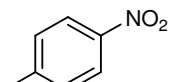
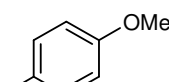
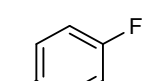
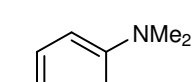
1.3.2.1. Reação de Biginelli promovida por TEOF utilizando irradiação por microondas

Neste trabalho, foi planejado investigar a ação desidratante do trietilortofornato (TEOF) na promoção da síntese das DHPMs através da reação de Biginelli. Para as reações foram utilizados acetoacetato de etila (**34**), aldeído e uréia ou tiouréia (**7**, **41**) nas proporções de 1:1:2 equivalentes, respectivamente, e TEOF (**180**) na proporção de 2 equivalentes (**Esquema 55**). As reações foram conduzidas em um forno de microondas convencional utilizando 12 ciclos de 20s (4 minutos) na potência máxima do equipamento (900 W), uma vez que neste protocolo não foi observada projeção dos reagentes do frasco reacional. Os resultados são apresentados na Tabela 3.



Esquema 55

Tabela 3: Aplicação do TEOF na síntese de DHPMs.

Entrada	Ar	Aldeído	X	Rendimento (%)	Produto
1		29	S	81*	167
2		29	O	83	181
3		178	S	76	182
4		178	O	57	183
5		168	S	97*	171
6		169	S	93	172
7		170	S	69	173
8		179	S	65	184

*não ocorreu reação, nas mesmas condições, sem a presença de TEOF

Os resultados da Tabela 3 mostram que o TEOF é eficaz na promoção da reação de Biginelli sob irradiação de microondas. As DHPMs formaram-se com rendimentos de moderados a bons, 56% - 97%. O protocolo se mostrou eficaz para síntese tanto de DHPMs 2-oxo-substituídas (entradas 2 e 4) quanto DHPMs 2-tio-substituídas (entradas 1,3,5-8). Também se mostrou eficaz com a utilização de aldeídos aromáticos *para*-substituídos com grupamentos doadores e retiradores de densidade eletrônica do anel aromático. A obtenção de maior rendimento com o aldeído **169** substituído com o grupamento metoxila (entrada 6) em relação ao aldeído **178** contendo a nitrila (entrada 3) indica que a natureza do substituinte do anel aromático parece não exercer influência significativa sobre os rendimentos. Apesar de relatos na literatura comprovando que a reação de Biginelli ocorre sem a presença de catalisadores,⁵⁷ a reação utilizando benzaldeído (**29**) ou 4-NO₂-benzaldeído (**168**) exatamente nas mesmas condições, porém sem a adição do TEOF (**180**), não levou à produção das DHPMs correspondentes, o que indica o papel importante do TEOF como promotor da reação.

Para estender esta técnica, foi realizada a síntese em paralelo de uma quimioteca de 12 DHPMs e análogos de enxofre (**Esquema 56**). Os resultados são mostrados na Tabela 4. O processo de purificação foi realizado em paralelo através da utilização de um sistema de filtração adaptado conforme apresentado na **Figura 5**.

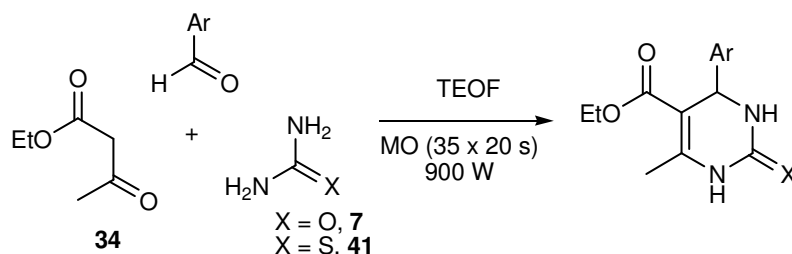


Tabela 4. Síntese em paralelo de 12 DHPMs

Entrada	Ar	Aldeído	X	Rendimento(%)	Produto
1		169	O	49	188
			S	52	172
2		185	O	67	189
			S	60	190
4		170	O	65	191
			S	54	173
5		179	O	59	192
			S	44	184
6		186	O	73	193
			S	63	194
7		187	O	61	195
			S	39	196

Conforme pode ser visto na Tabela 4, os produtos foram obtidos com sucesso em rendimentos de moderados a bons, 39% - 73%. Em geral os rendimentos obtidos utilizando uréia (**7**) foram superiores aos obtidos com a tiouréia (**41**), com exceção dos derivados do 4-metóxi-benzaldeído (**169**) onde **172** apresentou rendimento superior ao obtido para **188**

(entrada 1). O tempo reacional teve que ser estendido nesse protocolo em paralelo em comparação ao protocolo onde a síntese dos compostos foi realizada de maneira individual. Foi empregado cerca de 12 min. de irradiação neste protocolo, tempo reacional praticamente 3x superior ao protocolo individual. Isto pode ser explicado por uma provável menor absorção da irradiação de microondas em cada tubo quando comparado ao protocolo individual.

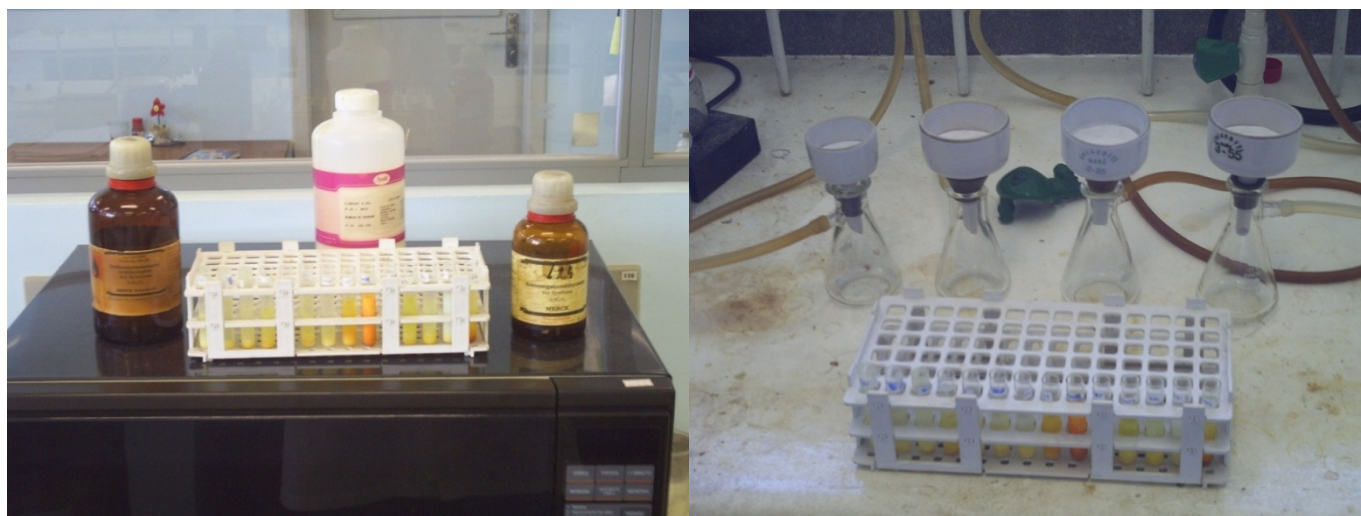


Figura 5. Material utilizado para a síntese em paralelo das DHPMs

Este protocolo representa uma inovação na reação de Biginelli, uma vez que não há nenhum exemplo na literatura da utilização de um agente puramente desidratante na promoção desta reação. Outra vantagem obtida é que ele não envolve a utilização de metais na reação, evitando a presença de traços destes nos produtos gerados, o que é extremamente importante quando se planeja investigar as propriedades farmacológicas dos compostos sintetizados.

1.3.2.2. Reações de Biginelli promovidas por TEOF utilizando aquecimento convencional

Para verificar a influência da irradiação por microondas nos resultados obtidos, as mesmas condições reacionais do protocolo com TEOF (**180**) foram testadas modificando a fonte de energia da reação. As reações foram conduzidas com benzaldeído (**29**),

acetoacetato de etila (**34**), tiouréia (**41**) e TEOF (**180**) na proporção de 1:1:2:2 equivalentes, conforme o protocolo anterior, porém utilizando banho de óleo convencional para o aquecimento (**Tabela 5**).

Tabela 5. Condições de temperatura e tempo empregadas nas tentativas de síntese do composto **167**.

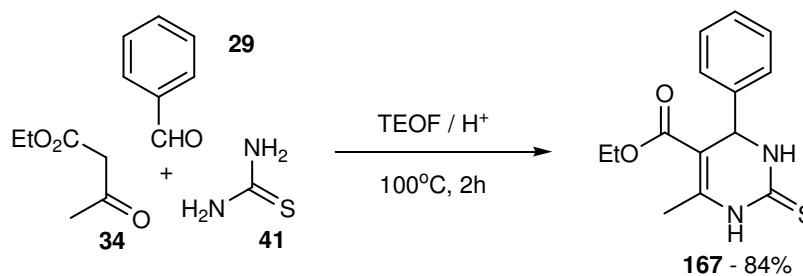
Entrada	Temperatura (°C)	tempo	Rend 167 (%)
1	t.a.	5 dias	-
2	50	24h	-
3	100	24h	-

Conforme pode ser visto na Tabela 5, verificou-se que nas condições empregadas a reação não ocorre à temperatura ambiente mesmo com longos tempos reacionais (entrada 1). Investigou-se a influência da temperatura na reação variando esta entre 50 e 100°C (entradas 2 e 3), porém, surpreendentemente, mesmo com longos tempos reacionais (24h), não observou-se a formação da DHPM **167**.

Os resultados obtidos até então mostram que a reação de Biginelli promovida por TEOF pode ser bem sucedida em menos de três minutos quando se utiliza irradiação por microondas como fonte de energia para a reação, e não ocorre quando se utiliza aquecimento convencional, mesmo em altas temperaturas e longos tempos reacionais.

1.3.2.3. Reações promovidas por TEOF juntamente com ácidos de Brønsted utilizando aquecimento convencional

Decidiu-se investigar a reação de Biginelli sob aquecimento convencional utilizando TEOF como promotor da reação e verificar a influência de ácidos de Brønsted no sistema. A reação foi conduzida nas condições da investigação anterior (item 2.2), com benzaldeído (**29**), acetoacetato de etila (**34**), tiouréia (**41**) e TEOF na proporção de 1:1:2:2 equivalentes, respectivamente. Neste experimento também foi adicionado ácido clorídrico na proporção de 10mol% e a reação foi conduzida a 100°C. Após 2h de reação, a DHPM **167** foi isolada com rendimento de 84%, sem necessidade de purificação (**Esquema 57**).

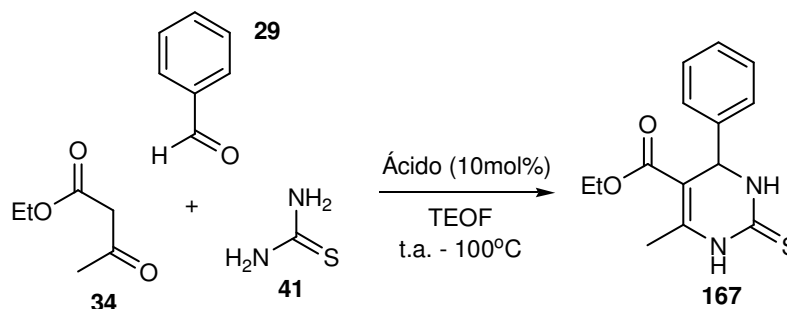


Esquema 57

Objetivando investigar o papel desempenhado pelo TEOF e pelo ácido de Brønsted individualmente, e se um efeito sinérgico poderia estar operando, decidiu-se realizar a reação de formação de **167** empregando ácidos com diferentes forças, variando entre espécies que apresentam pKa entre -1,0 e 3,13. Os resultados destas reações poderiam então ser comparados com as reações utilizando estes mesmos ácidos juntamente com o TEOF.

A escolha dos ácidos se deu em função do seu valor de pKa, disponibilidade, custo, e toxicidade. Dois ácidos orgânicos foram selecionados, o ácido cítrico e o ácido oxálico. Dentre os ácidos investigados, o ácido cítrico é o mais fraco (pKa₁ = 3,13), o ácido oxálico apresenta uma acidez intermediária (pKa₁ = 1,20) e o HCl_{aq.} é o ácido mais forte (pKa = -1,0).

Durante a etapa de finalização desta dissertação, dois trabalhos foram publicados utilizando ambos os ácidos orgânicos citados na reação de Biginelli.^{165,166} Entretanto, cabe ressaltar que a intenção não foi demonstrar a eficiência dos ácidos na reação, e sim investigar a influência do TEOF na reação quando utilizado em conjunto com eles. Para isso foi utilizada a reação entre benzaldeído (**29**), acetoacetato de etila (**34**) e tiouréia (**41**) (1:1:2 equiv.) na presença dos diferentes ácidos de Brønsted (10mol%) como modelo reacional (**Esquema 58**).



Esquema 58

Os resultados estão apresentados na Tabela 6 (entradas 1- 5) e observa-se que o ácido cítrico não foi capaz de promover a reação à temperatura ambiente, mesmo utilizando longos tempos reacionais (entrada 1). Aumentando a temperatura para 50°C a reação ocorreu em baixo rendimento (entrada 2). Elevando a temperatura para 100°C observou-se um aumento na reatividade quando comparado às condições de temperatura anteriores (entrada 3). Mantendo as mesmas condições de temperatura e tempo, a utilização do ácido oxálico resultou em melhores rendimentos (entrada 4), e a utilização de HCl também forneceu rendimentos satisfatórios (entrada 5). Os resultados experimentais obtidos demonstram que os rendimentos da reação são maiores com a utilização de ácidos mais fortes e menores com a utilização de ácidos mais fracos.

Tabela 6. Estudo comparativo entre ácidos com diferentes valores de pka, na ausência ou na presença diferentes quantidades de TEOF

Entrada	Ácido	TEOF (Equiv.)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimento* 167 (%)
1	Cítrico	-	48	t.a.	-
2	Cítrico	-	12	50	16
3	Cítrico	-	2	100	34
4	Oxálico	-	2	100	69
5	HCl	-	2	100	74
6	Cítrico	2	48	t.a.	-
7	Cítrico	1	2	100	81
8	Cítrico	2	2	100	92
9	Oxálico	2	2	100	93
10	HCl	2	2	100	84

*rendimentos isolados (pureza > 95%)

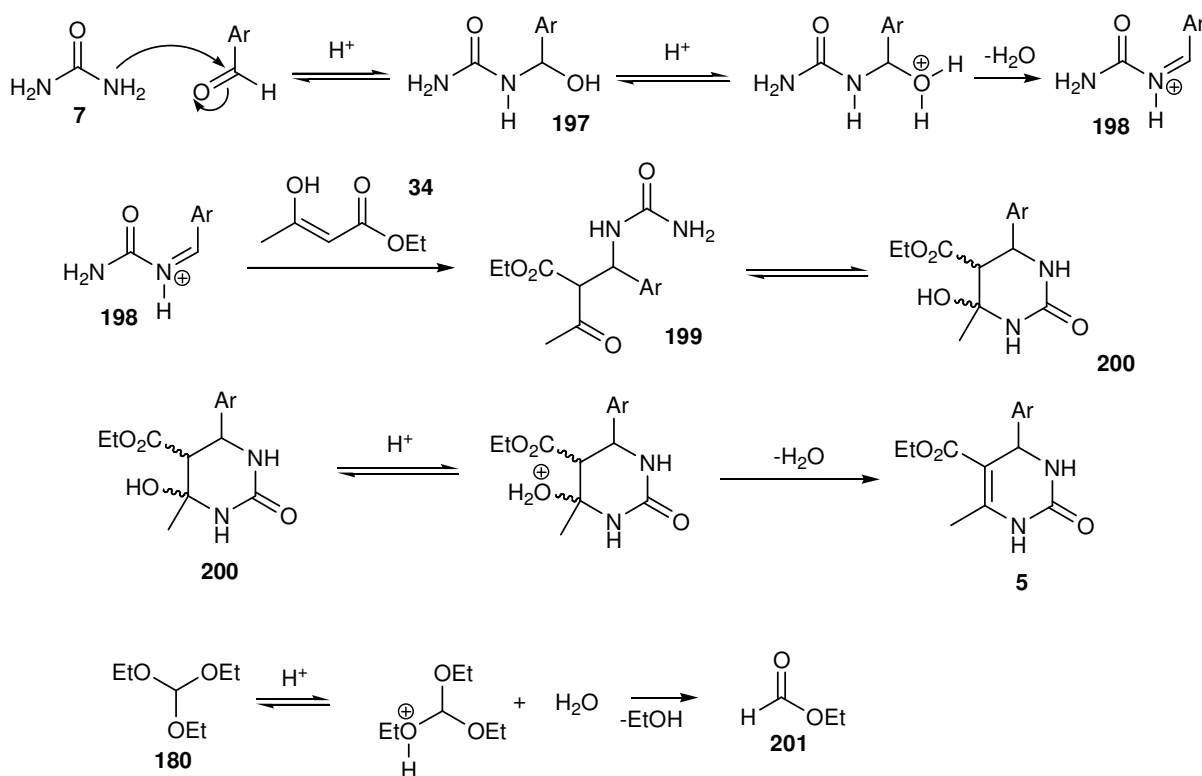
Avaliando os ácidos de Brønsted na presença do TEOF, os resultados foram bastante diferentes (Tabela 6, entradas 6-10). Observa-se que a reação não ocorre à temperatura ambiente quando utiliza-se o ácido cítrico, mesmo na presença de 2 equiv. de TEOF (entrada 6), indicando a necessidade de temperaturas elevadas para a síntese da DHPM **167** nestas condições. A incorporação do TEOF ao meio reacional causou aumento nos rendimentos observados com todos os ácidos estudados (entradas 8-10). Na reação utilizando ácido cítrico, os rendimentos observados passaram de 34% sem a presença de TEOF (entrada 3) a 92% com a presença deste no meio reacional (entrada 8). Com a utilização de ácido oxálico os rendimentos passaram de 69% sem TEOF para 93% com a

utilização concomitante do TEOF (entradas 4 e 9, respectivamente). Com a utilização do HCl, o aumento no rendimento observado foi mais discreto, passando de 74% sem TEOF para 84% com a utilização do ortoéster (entradas 5 e 10, respectivamente).

A influência da estequiometria também foi verificada na reação utilizando o sistema ácido cítrico/TEOF, e a presença de somente 1 equivalente do ortoéster promoveu a reação em menor rendimento comparado à condição com 2 equivalentes (entradas 7 e 6, respectivamente).

Com base nestes resultados, fica claro que o TEOF exerce efeito na reação com aquecimento convencional quando utilizado juntamente com ácidos de Brønsted. O efeito promotor observado é muito mais pronunciado na presença de ácidos mais fracos, tornando-se gradativamente menor à medida que se aumenta a força do ácido. Para explicar tal fato, acredita-se que a reação segue por dois caminhos concomitantes:

i) um caminho reacional promovido somente pelo uso de ácido forte, que promove a desidratação nas etapas onde a água é eliminada (**esquema 59**):

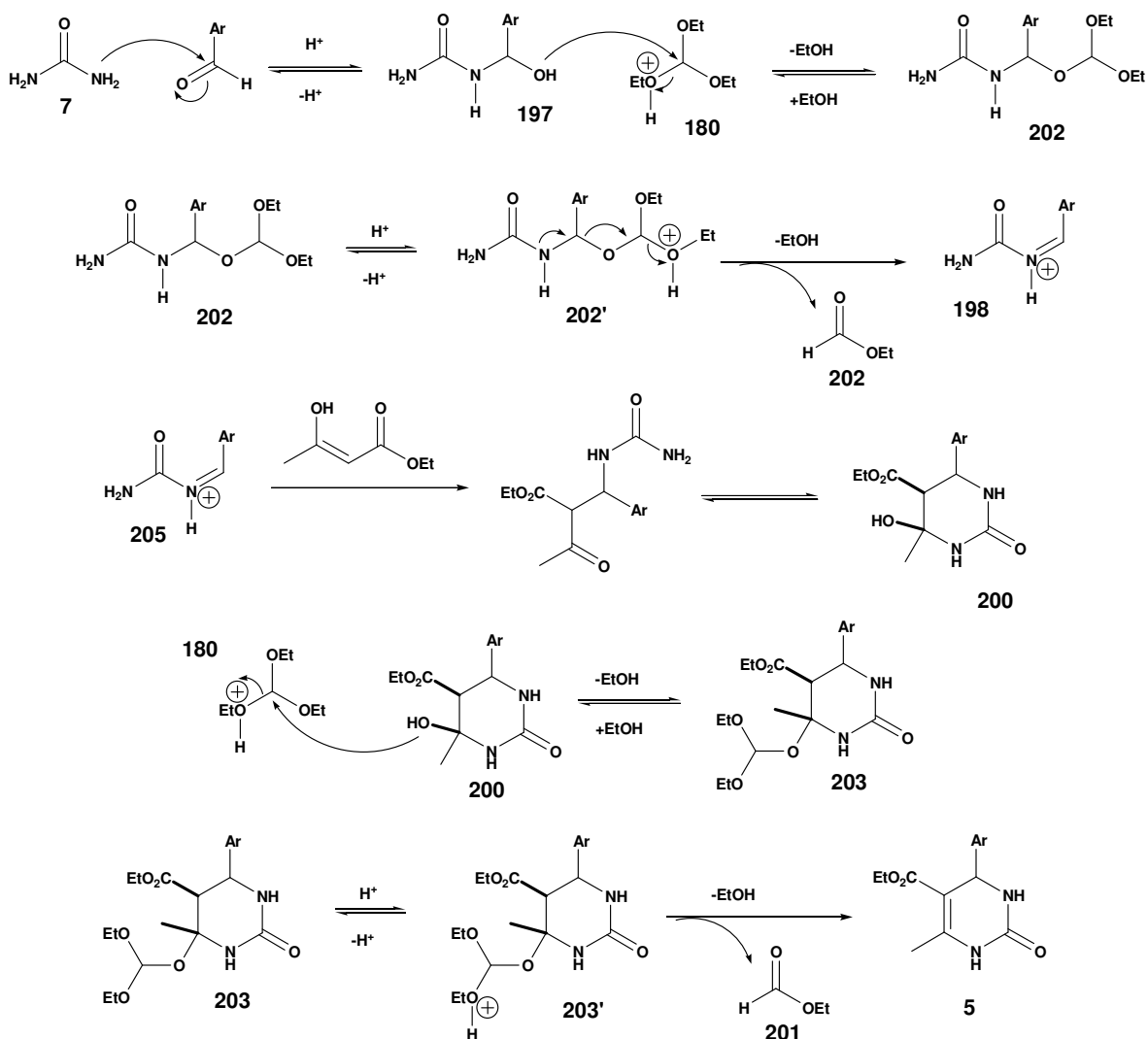


Esquema 59

Através deste caminho reacional sugere-se que o meio fortemente ácido seja capaz de protonar o intermediário aminoacetil **197** promovendo a eliminação de água e formação do íon ureidoimínio **198**. Este íon reage então com o acetoacetato de etila (**34**), provavelmente através de sua forma enólica, gerando o intermediário de cadeia aberta **199**

que cicliza para a formação do intermediário **200**. Novamente o meio fortemente ácido é capaz de protonar este intermediário promovendo sua desidratação e levando à formação das DHPMs **5**. Embora o TEOF (**180**) não exerça efeito significativo na reação, ele também é protonado e reage com a água eliminada da reação, o que leva à sua degradação em formato de etila (**201**) e etanol.

ii) outro caminho reacional envolve a participação do TEOF (**180**) no mecanismo. O ortoéster em sua forma protonada reage com a hidroxila dos intermediários, promovendo sua eliminação na forma de etanol e formato de etila (**201**) (**Esquema 60**).



Esquema 60

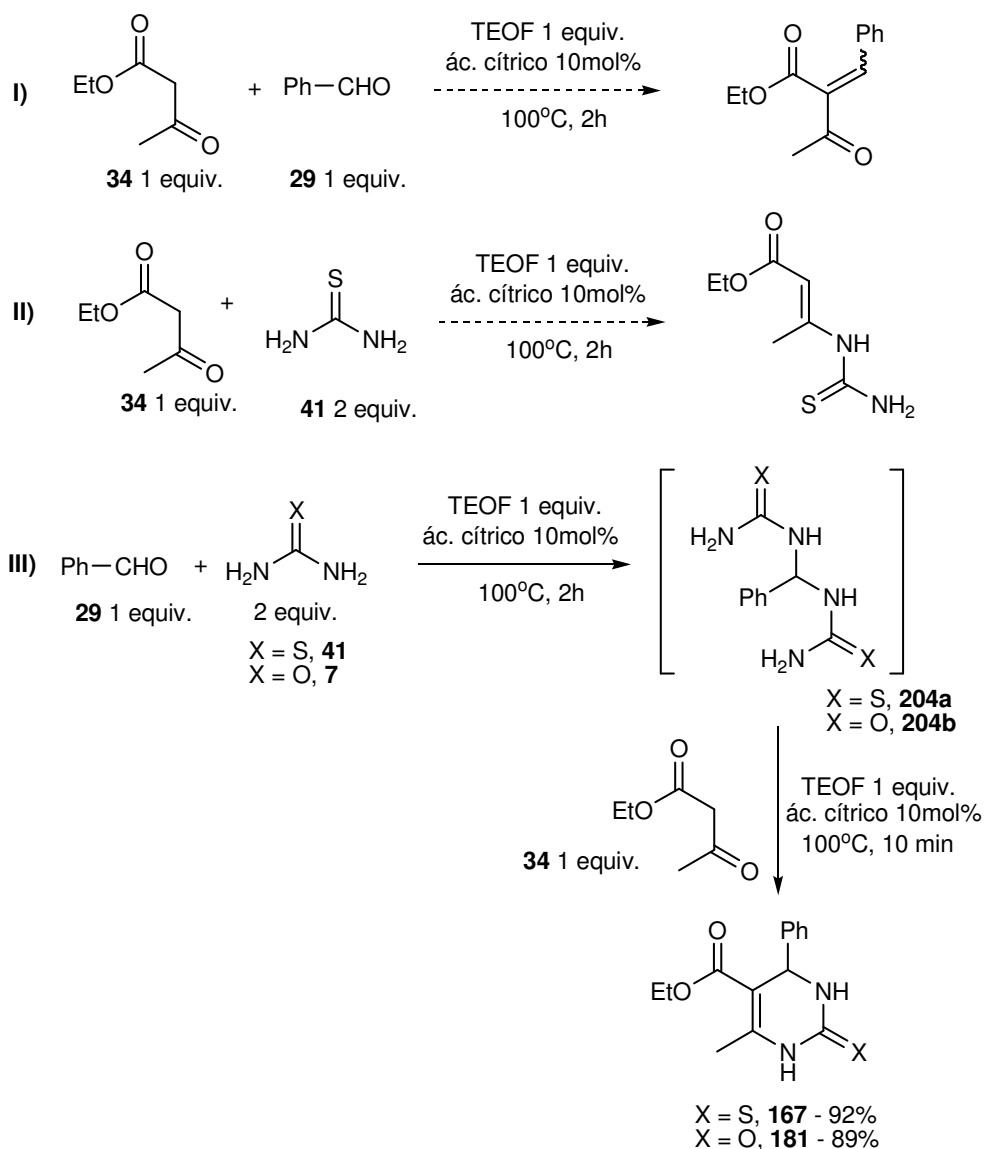
Através deste segundo caminho reacional, o ácido mais fraco não conseguiria promover a eliminação de água do intermediário aminoacetal **197** com a mesma eficiência que o ácido mais forte. Assim, outro equilíbrio é favorecido antes da eliminação de água, e o TEOF na sua forma protonada reage com o intermediário **197** para formar **202**. A formação deste intermediário **202** torna a hidroxila um bom grupo de saída $-OC(OEt)_2$, porque

termodinamicamente libera etanol e formato de etila (**201**) neutros, formando o íon ureidoimínio **198**. Este mesmo mecanismo de eliminação deve estar atuando na segunda etapa de eliminação de água a partir do intermediário **203**. Segundo os resultados experimentais (Tabela 6, entradas 7 e 8) obtém-se um melhor rendimento quando o ortoester é utilizado na proporção de 2 equivalentes quando comparado a utilização de apenas 1 equivalente.

Esta proposta está de acordo com estudos de Kappe,³⁹ que demonstra que a etapa determinante da velocidade da reação de Biginelli promovida por ácidos de Brønsted é a formação do ureidoimínio **43** (**Esquema 17**). Também está de acordo com os estudos mecanísticos de formação de iminas¹⁶⁷ que demonstram que em meio fortemente ácido a etapa limitante da velocidade da reação é a formação do intermediário aminoacetal, enquanto em meio menos ácido a etapa determinante passa a ser a eliminação de água para formação do imínio. Sabe-se da literatura que a degradação de ortoesteres ocorre de maneira muito rápida somente pela presença de ácidos, com ácidos fracos sendo tão eficientes quanto ácidos fortes na sua degradação em presença de água.¹⁶⁸ Desta maneira, mesmo com a utilização de ácidos fracos, a espécie desidratante reativa do TEOF é formada rapidamente no meio reacional, e pode promover sua ação na desidratação do intermediário aminoacetal **197**.

Nas reações realizadas nos itens **1.3.2.1** e **1.3.2.2**, promovidas por microondas ou aquecimento em banho de óleo sem a utilização de ácidos, o TEOF não protonado apresenta menor reatividade. Provavelmente, o efeito da energia de microondas no meio reacional possibilita que a reação do TEOF com o intermediário **197** ocorra, enquanto o aquecimento constante gerado no banho de óleo não é capaz de fornecer energia suficiente para esta transformação.

Para confirmar se o caminho reacional seguido nas condições investigadas está de acordo com a proposta elaborada por Kappe, foram realizadas as três possíveis combinações bimoleculares nas mesmas condições empregadas na reação multicomponente, porém empregando o TEOF na proporção de apenas 1 equiv. (**Esquema 61**).

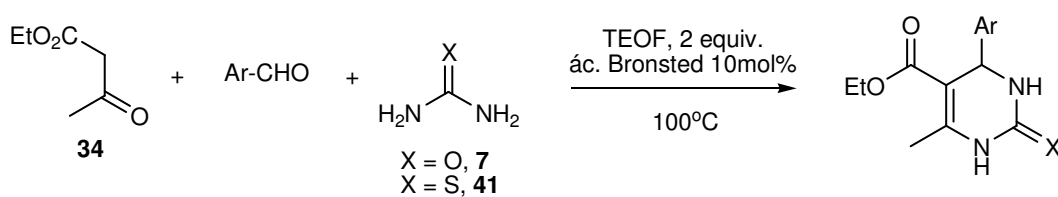


Esquema 61

Nas reações entre o acetoacetato de etila (**34**) e o benzaldeído (**29**) (I, **Esquema 61**), e entre o acetoacetato de etila (**34**) e a tiouréia (**41**) (II, **Esquema 61**), não foi observado consumo dos reagentes através da análise cromatográfica. Na reação entre benzaldeído (**29**) e tiouréia ou uréia (**41** e **7**, respectivamente) (III, **Esquema 61**) houve consumo total do aldeído **29** segundo análise cromatográfica. Ensaios de purificação por cromatografia em coluna não foram bem sucedidos, então foi realizada a análise do bruto reacional cristalizado de DCM. As análises indicaram um possível intermediário bisureido **204** (ver Parte experimental). Reação deste intermediário isolado com acetoacetato de etila (**34**), na presença de 1 equiv. de TEOF e ácido cítrico na proporção de 10mol% possibilitou a obtenção da DHPM **167** em 10min., juntamente com tiouréia (**41**), conforme pode ser verificado na análise cromatográfica. Portanto, acredita-se que a reação ocorra através do caminho reacional proposto por Kappe (**Esquema 17**), onde existe um intermediário *N*-

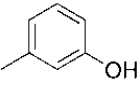
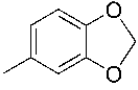
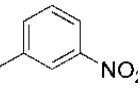
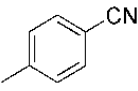
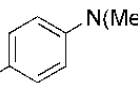
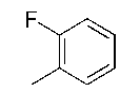
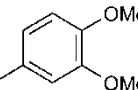
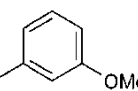
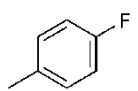
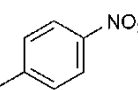
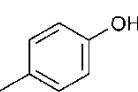
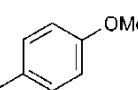
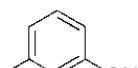
ureidoimínio reativo o qual leva à formação do produto final, este intermediário provavelmente encontra-se em equilíbrio com sua forma estabilizada na forma de bisureído **207**.


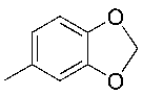
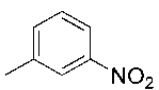
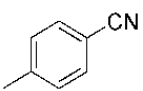
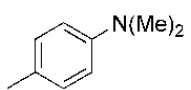
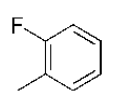
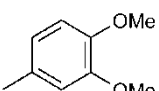
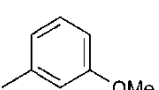
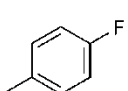
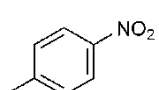
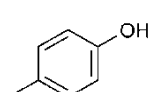
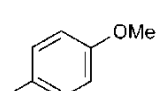
Com o intuito de demonstrar a aplicabilidade da metodologia sintética, estas condições foram aplicadas na reação de Biginelli entre diversos aldeídos aromáticos, acetoacetato de etila (**34**) e uréia (**7**) ou tiouréia (**41**) (**Esquema 62**). Os resultados são apresentados na Tabela 7.



Esquema 62

Tabela 7. Aplicação das condições previamente otimizadas na síntese de 24 DHPMs

Entrada	Ar	Aldeído	X	Ácido	Tempo (h)	Produto	Rendimento (%)
1		205	S	Cítrico	1.0	209	88
				Oxálico	2.0		69
2		185	S	Cítrico	2.0	191	84
				Oxálico	1.0		73
3		206	S	Cítrico	1.0	210	97
				Oxálico	2.0		82
4		178	S	Cítrico	2.0	182	80
				Oxálico	2.0		78
5		179	S	Cítrico	1.5	184	82
				Oxálico	2.0		68
6		207	S	Cítrico	2.0	211	77
				Oxálico	2.0		75
7		187	S	Cítrico	1,5	197	92
				Oxálico	2,0		77
9		208	S	Cítrico	2.0	212	84
				Oxálico	2.0		72
10		170	S	Cítrico	1,5	173	82
				Oxálico	1,0		76
11		168	S	Cítrico	2.0	171	74
				Oxálico	1,0		64
12		188	S	Cítrico	2.0	199	71
				Oxálico	2.0		67
13		169	S	Cítrico	1,0	172	85
				Oxálico	1,0		76
		205		Cítrico	2.0		87

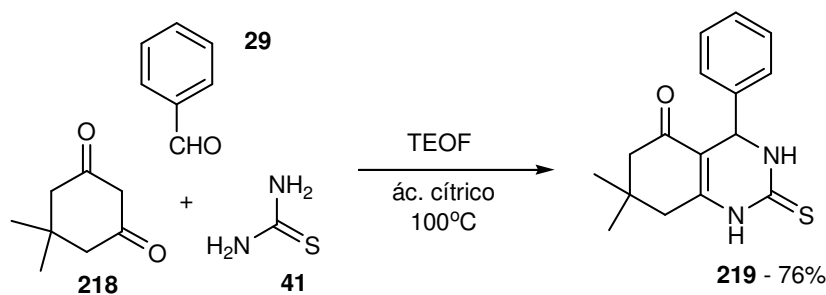
14			O	Oxálico	2.0	213	77
				Cítrico	1.0		93
15		29	O	Oxálico	1.0	181	67
				Cítrico	1.0		81
16		185	O	Oxálico	2.0	190	84
				Cítrico	1.5		92
17		206	O	Oxálico	1.5	214	89
				Cítrico	1.0		86
18		178	O	Oxálico	1.0	183	68
				Cítrico	1.5		75
19		179	O	Oxálico	1.0	195	66
				Cítrico	2.0		74
20		207	O	Oxálico	2.0	215	78
				Cítrico	1,5		83
21		187	O	Oxálico	-	196	-
				Cítrico	2.0		93
22		208	O	Oxálico	-	216	-
				Cítrico	1,5		89
23		170	O	Oxálico	1,0	194	74
				Cítrico	2.0		76
24		168	O	Oxálico	1,0	217	69
				Cítrico	2.0		63
25		188	O	Oxálico	-	198	-
				Cítrico	2.0		91
26		169	O	Oxálico	2.0	189	54

*Rendimentos isolados (pureza > 95%)

De acordo com a Tabela 7, aldeídos aromáticos contendo grupamentos doadores de densidade eletrônica (entradas 1-2, 5, 7, 9, 12-14, 16, 19, 21, 22, 25-26) ou grupamentos

retiradores de densidade eletrônica (entradas 3-4, 11, 17-18, 24), com padrão de substituição *orto*, *meta* ou *para*, facilmente reagem com uréia ou tiouréia e acetoacetato de etila gerando as DHPMs correspondentes. Os tempos reacionais variaram entre 1 e 2h, e os rendimentos variaram entre bons e excelentes, 54% - 97%. Os rendimentos observados são mais altos com o sistema promotor ácido cítrico/TEOF do que com o sistema ácido oxálico/TEOF, o que é exemplificado pelos rendimentos obtidos na síntese do Monastrol (**209**) (entrada 1) que são de 88% com o sistema ácido cítrico/TEOF e 69% com o sistema ácido oxálico/TEOF. Aparentemente os rendimentos não são dependentes da reatividade do aldeído utilizado.

O protocolo desenvolvido é aplicável a um grande número de aldeídos aromáticos, possibilitando a síntese de DHPMs apresentando variedade na posição 4 com bons rendimentos. A posição 2 também pode ser variada através da utilização de uréia ou tiouréia, gerando DHPMs 2-oxo-substituídas e 2-tio-substituídas, respectivamente. Uma reação isolada foi realizada a fim de verificar se o protocolo também suportaria alterações quanto ao componente dicarbonílico. Foi realizada a reação entre o benzaldeído (**29**), tiouréia (**41**), dimedona (**218**) e TEOF na proporção de 1:2:1:2 com ácido cítrico na proporção de 10mol% (**Esquema 63**). Após 1h de reação a octaidroquinazolinona **219** foi isolada com 76% de rendimento, o que demonstra que o protocolo suporta a variação de todos os componentes envolvidos na reação.



Esquema 63

Demonstrou-se a grande aplicabilidade do protocolo de síntese desenvolvido, possibilitando a obtenção de DHPMs com grande variedade estrutural em bons rendimentos, com tempos reacionais curtos e procedimento simples. A metodologia sintética possui ainda a vantagem de ser uma técnica livre de componentes metálicos, sendo assim aplicável a síntese rápida de compostos com o objetivo de avaliação biológica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além destas vantagens, o método apresenta baixo custo e não é uma metodologia potencialmente danosa ao meio ambiente, uma vez que os únicos subprodutos da reação são EtOH e formiato de etila (**201 - Esquema 59 e 60**), o qual pode ser facilmente convertido em ácido fórmico e etanol.

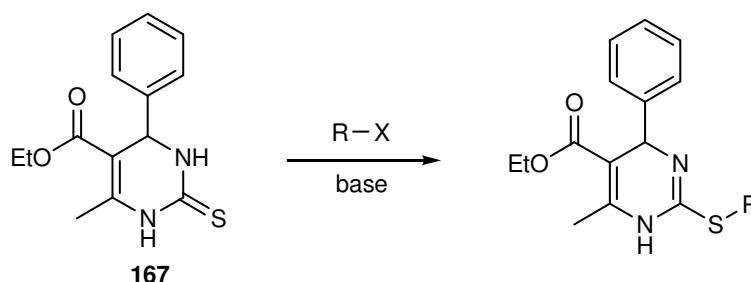
1.3.3. Modificações estruturais nas DHPMs

Conforme discutido na introdução deste capítulo, as DHPMs obtidas através da reação de Biginelli podem servir de substrato para uma vasta gama de reações. Estas modificações permitem a introdução de novos pontos de diversidade estrutural a este sistema heterocíclico. Uma vez que esta classe de moléculas apresenta uma vasta gama de atividades biológicas, a investigação da relação estrutura-atividade se faz necessária para otimização das propriedades farmacológicas. Além da inclusão de novos grupos funcionais, as modificações podem produzir uma mudança sutil na conectividade dos átomos que compõe o anel DHPM podendo levar a modificações conformacionais benéficas ou não para a atividade biológica.

1.3.3.1. Alquilação do enxofre das 2-tio-DHPMs

Conforme discutido na introdução deste capítulo, as diidropirimidin-2-tionas (ex. **167**) podem ser alquiladas quimiosseletivamente no átomo de enxofre produzindo as *S*-alquil-DHPMs.

Para investigar estas reações foram otimizados os parâmetros referentes à temperatura, tempo reacional, base utilizada, estequiometria dos reagentes e influência do solvente. A investigação destes parâmetros foi realizada na reação da DHPM **167** com diferentes haletos de alquila (**Esquema 64**). Os resultados são apresentados na Tabela 8.



Esquema 64

Tabela 8. Otimização do solvente, tempo, e temperatura na síntese de S-alquil-DHPMs

Ent.	R-X (equiv.)	Base ^a (equiv.)	Solvente	Temp. (°C)	Tempo (h)	Produto	Rend. (%)
1	BnBr (1,2)	Na ₂ CO ₃ (1,5)	THF	t.a.	24		-
2	BnBr (1,2)	KI (2,0)	THF	t.a.	72	220	39
3	BnBr (1,2)	KI (2,0)	MeCN	refluxo	16	220	58
4	BnBr (2,0)	KI (2,0)	Acetona	refluxo	2	221	99*
5	BnBr (2,0)	Et ₃ N (1,5)	MeCN	refluxo	24	220	31
6	EtBr (1,2)	Et ₃ N (1,5)	MeCN	t.a.	18		-
7	EtBr (1,2)	Et ₃ N (1,5)	MeCN	70°C ^d	48	222	29
8	EtBr (1,2)	K ₂ CO ₃ (1,5)	MeCN	70°C ^d	27	222	43
9	Etl (1,2)	-	EtOH	70°C ^d	5	222	92
10	BuBr (1,2)	Et ₃ N (1,5)	MeCN	refluxo	72	223	35
11	BuBr (1,2)	KI (2,0)	EtOH	refluxo	10	223	84
12	Br(CH ₂) ₃ NH ₂ .HBr (1,2)	KI (2,0) + K ₂ CO ₃ (1,5)	MeCN	refluxo	18		n.d. ^b
13	Br(CH ₂) ₃ NH ₂ .HBr (2,0)	KI (2,0)	EtOH	refluxo	24		n.d. ^b
14	CH ₂ OCHCH ₂ Cl (1,2) ^c	KI (2,0)	MeCN	refluxo	48		-

^a KI foi utilizado para formação *in situ* do iodeto correspondente

^b n.d. = rendimento não determinado

^c epicloridrina

^d procedimento realizado em ampola lacrada

*foi obtido o produto bis-alquilado

Como pode ser observado na Tabela 8, os rendimentos obtidos mostraram-se bastante dependentes das condições reacionais. Baixas temperaturas não são favoráveis para a reação de S-alkilação (entradas 1, 2 e 6).

A utilização de KI nas reações de benzilação (entradas 1-5) forneceu rendimentos melhores do que com a utilização de carbonato de potássio e trietilamina. Dentre os solventes estudados para reação de benzilação, a acetonitrila foi mais favorável que o THF para a síntese de **220** (entradas 2 e 3). A utilização de excesso de brometo de benzila em acetona levou a obtenção do produto bis-alkilado **221** em altos rendimentos (entrada 4).

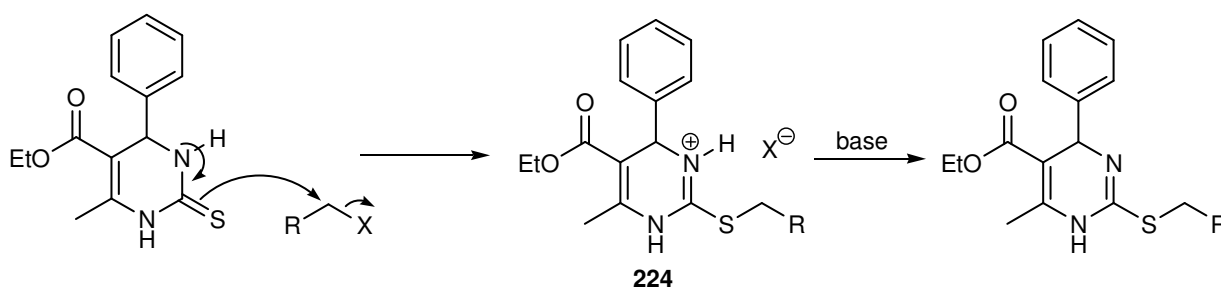
A S-alkilação com iodeto de etila utilizando etanol como solvente levou à obtenção do produto **222** em rendimentos melhores quando comparado com o uso de brometo de etila

(entrada 9 e entradas 6-8). Na reação com o brometo de butila (entradas 10-11), novamente a utilização do KI em solvente prótico forneceu um rendimento melhor do produto **223**.

As reações com a 3-bromo-propilamina (entradas 12 e 13) levaram a uma mistura complexa de produtos sem o consumo total do material de partida, principalmente quando a amina foi desprotegida com a utilização de base (entrada 12). Tentativa de reação com a epicloridrina não levou a consumo dos materiais de partida, verificado através de análise cromatográfica, mesmo com longos tempos reacionais (entrada 14).

A expectativa era de que solventes polares apróticos (como MeCN e THF) fossem mais favoráveis para esta reação, pois tratam-se de reações de substituição nucleofílica. Principalmente no caso dos haletos onde a formação do carbocátion não é favorecida, seriam reações com maior caráter de S_{N2} . Porém, a utilização de solventes mais polares, tanto apróticos (acetona), quanto próticos (EtOH), levaram a rendimentos melhores.

Uma explicação provável para este fato pode ser devido à formação do sal intermediário **224** (**Esquema 65**), que provavelmente é a etapa determinante da velocidade da reação. Portanto um provável estado de transição para sua formação a partir da DHPM deve apresentar um caráter iônico parcial, que pode ser estabilizado mais eficientemente pela utilização de solventes polares.



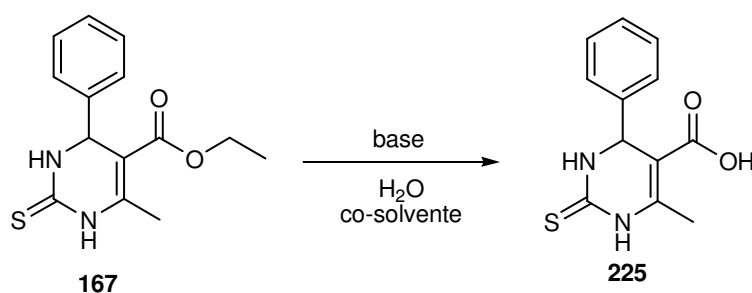
Esquema 65

A utilização de bases no meio reacional não se demonstrou favorável para a reação. Nas condições onde foram obtidos os melhores rendimentos, as bases foram adicionadas após a verificação do consumo do material de partida. A utilização do iodeto de potássio parece ser uma boa alternativa quando o haleto utilizado não é um iodeto, conforme se pode observar pelos maiores rendimentos obtidos com a presença deste no meio reacional (Tabela 8). Por tratar-se de um bom nucleófilo, o iodeto substitui o haleto existente no reagente e aumenta sua reatividade por ser um melhor grupo abandonador.

1.3.3.2. Reações de hidrólise da função éster das DHPMs

A função éster na posição C5 do núcleo DHPM representa outro ponto de modificação para obtenção de diversidade química e otimização do perfil farmacodinâmico desta classe de moléculas. Conforme discutido na introdução deste capítulo, o grupo éster das DHPMs não apresenta grande reatividade frente à nucleófilos e/ou condições de hidrólise. Existe muita contradição na literatura sobre o este fato, tendo sido reportadas casos de sucesso com a obtenção dos ácidos carboxílicos em condições de hidrólise básica,¹⁶⁹ falta total de reatividade⁵³ ou ainda degradação da molécula em tentativas de hidrólise.^{170,171}

A DHPM **167** foi submetida a condições de hidrólise básica, variando a base, o co-solvente, temperatura e tempo reacionais (**Esquema 66**). Os resultados são apresentados na Tabela 9.



Esquema 66

Tabela 9. Otimização das condições de hidrólise da DHPM **167**

Entrada	Catalisador	equiv.	Co-solvente	temperatura	Tempo (h)	Rend. 225 (%)
1	KOH _{aq}	2	-	t.a.	72	-
2	KOH _{alc.}	2	EtOH	t.a.	72	-
3	KOH _{aq}	3	MeOH	t.a.	72	-
4	KOH _{aq}	10	MeOH	t.a.	72	-
5	KOH _{aq}	2	MeOH	refluxo	3	42
6	KOH _{aq}	3	MeOH	refluxo	3	62
7	KOH _{aq}	3	MeOH	refluxo	5	96
8	KOH _{aq}	3	EtOH	refluxo	5	67
9	KOH _{aq}	3	MeOH	refluxo	16	23
10	KOH _{aq}	3	MeOH	refluxo	24	-
11	NaOH _{aq}	3	MeOH	refluxo	6	29
12	NaOH _{aq}	3	EtOH	refluxo	2	39

A necessidade da utilização de co-solventes foi estabelecida devido à baixa solubilidade da DHPM **167** em meio aquoso. Conforme pode ser visto na Tabela 9, não foi possível realizar a hidrólise básica do grupamento éster da DHPM **167** em condições de temperatura ambiente (entradas 1-4), mesmo utilizando excesso de base e longos tempos reacionais.

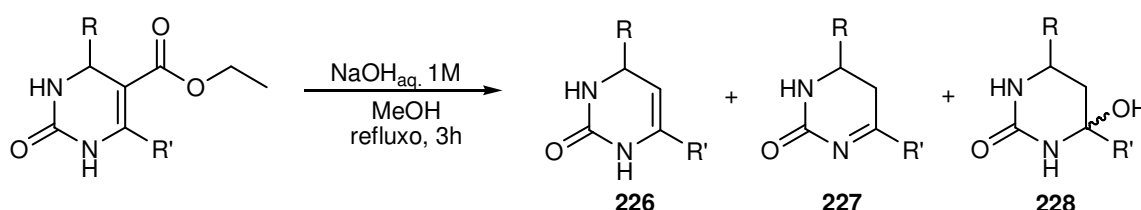
Utilizando temperaturas mais altas, foi possível realizar a hidrólise do enaminoéster (entradas 5-9). Aumentando a proporção de base é possível também obter um rendimento maior nas mesmas condições reacionais (entradas 5 e 6).

Em relação à base utilizada, os melhores rendimentos foram obtidos com a utilização de KOH do que com a utilização de NaOH. Em relação ao co-solvente, a utilização de MeOH demonstrou-se mais favorável para formação do ácido que a utilização de EtOH. A condição que levou ao melhor rendimento foi a utilização de KOH como base, MeOH como co-solvente em refluxo, durante 5h de reação (entrada 7), que possibilitou a obtenção do ácido carboxílico **225** em ótimo rendimento.

A utilização de tempos reacionais mais longos acarreta em uma diminuição no rendimento do produto isolado (entradas 9 e 10), sendo que com 24h de refluxo não foi possível obter o produto **225**.

Apesar da otimização da condição de hidrólise, esta não se mostrou reprodutível quando realizada em uma escala maior e em alguns casos observa-se a formação de subprodutos. Esta dependência do rendimento com o tempo reacional se deve provavelmente à reatividade do ácido carboxílico **225**, o que pode levar a degradação deste quando se utiliza longos tempos reacionais.

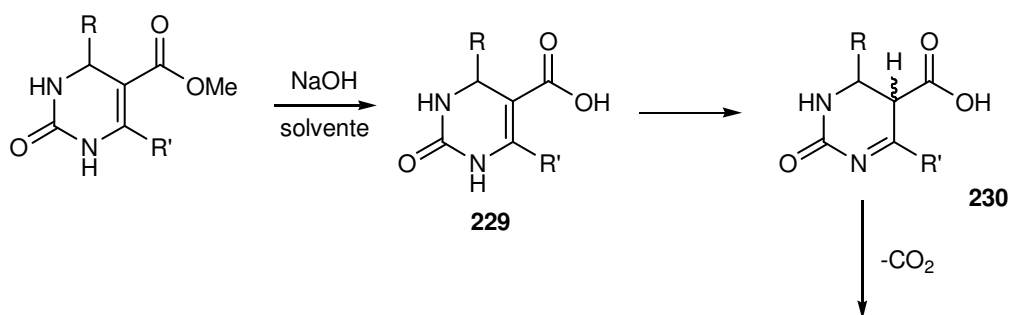
Steele *et al.*¹⁷⁰ demonstraram que, em condições de hidrólise básica, as DHPMs contendo o grupamento ácido carboxílico sofrem descarboxilação gerando os produtos **226**, **227** e **228** (**Esquema 67**). Portanto, a otimização do tempo e temperatura empregados na reação de hidrólise básica deve ser controlado a fim de evitar a degradação do produto.



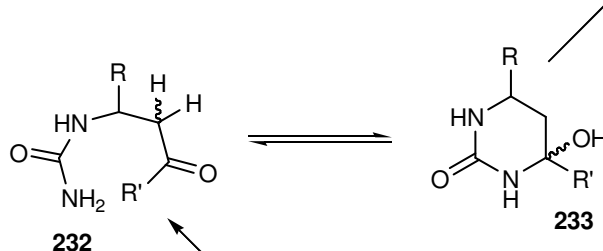
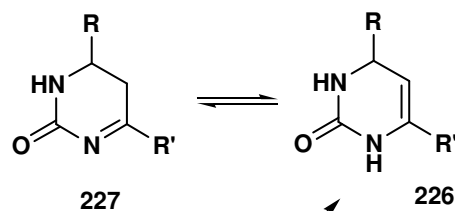
Esquema 67

Os autores propuseram dois possíveis mecanismos para a ocorrência destas reações colaterais (**Esquema 68**), sendo o caminho A possível com e sem a presença de uma fonte de prótons, e o caminho B sendo uma possibilidade somente quando água está presente no meio reacional. Após a hidrólise do grupamento éster, o ácido carboxílico **229** sofre uma isomerização catalisada por base gerando o intermediário **230**, comum aos dois caminhos de degradação.

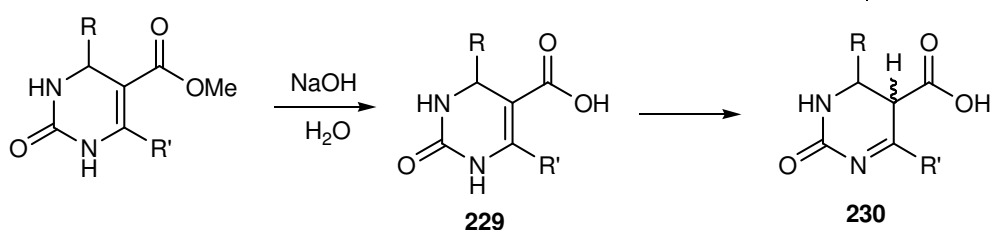
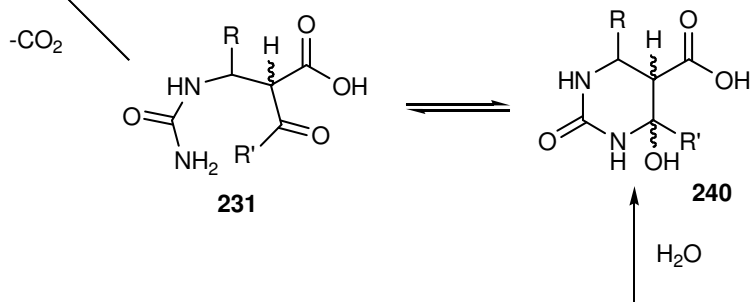
Pelo caminho A, este intermediário sofre descarboxilação gerando o subproduto **226**, que também pode sofrer isomerização catalisada por base gerando o outro subproduto observado pelos autores (**227**). Através do caminho B, o intermediário **230** pode sofrer adição de água com posterior abertura do ciclo levando ao intermediário **231**. Este intermediário acíclico **231** então sofre a descarboxilação usual de β -cetoácidos levando à γ -cetouréia **232**. A condensação intramolecular deste intermediário leva então ao intermediário hidratado **233** o qual produz os subprodutos descarboxilados **226** e **227**.



Caminho A



Caminho B

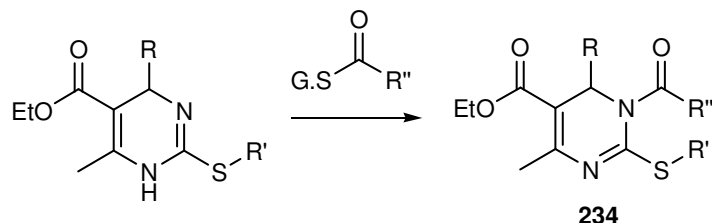


Esquema 68

A melhor alternativa para evitar tais reações de degradação seria a hidrólise ácida destes compostos. Entretanto, tentativas de hidrólise ácida foram frustradas, mesmo utilizando altas temperaturas e longos tempos reacionais (refluxo em água com HCl ou H₂SO₄ por 5 dias).

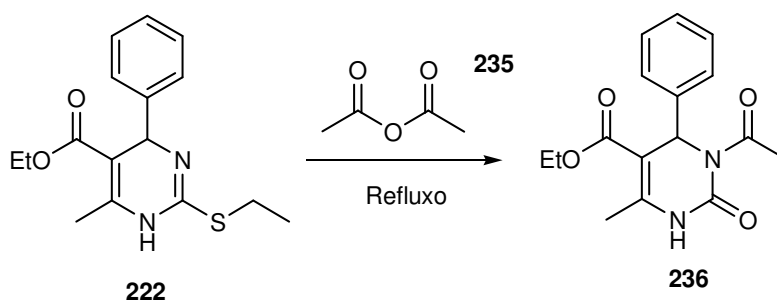
Uma alternativa possível seria a obtenção de DHPMs contendo grupos alquila, ou qualquer grupo diferente de hidrogênio como substituintes na posição N1. Outra possibilidade seria a síntese de derivados substituídos nas posições 2 e 3 (**234**, Esquema

69). Desta maneira o anel pirimidínico é forçado a assumir a forma tautomérica contendo dupla ligação entre o N1 e o C2, e não mais apresenta o átomo de hidrogênio na posição N1.



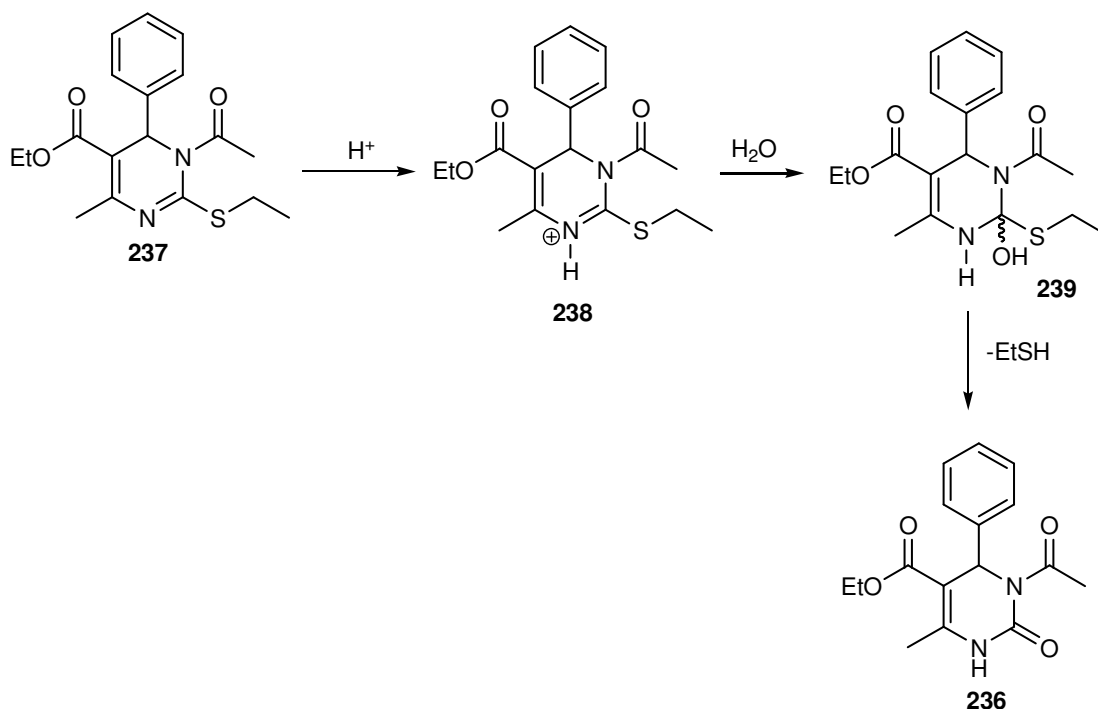
Esquema 69

Planejou-se uma rota sintética para obtenção destes derivados, e inicialmente foi investigada a reação de acilação da Diidropirimidina **222**. Esta foi tratada com excesso de anidrido acético (**235**) em refluxo durante 2 h (**Esquema 70**).



Esquema 70

Surpreendentemente, o produto observado foi a DHPM N3-acetilada **236**, contendo o grupamento oxo na posição 2. A análise do procedimento experimental adotado fornece uma possível explicação para a obtenção do grupo oxo na posição 2. Ao final da reação, após consumo total do material de partida, o produto ficou solúvel no excesso de anidrido acético. Foi adicionado uma solução aquosa de HCl 0,1M sob agitação para hidrólise do excesso de anidrido **235**. Esta mistura foi mantida à 4°C *overnight* para precipitação do produto em meio aquoso. A adição de água em meio ácido pode ter convertido o produto esperado **237** no produto observado **236** da maneira detalhada no **Esquema 71**.

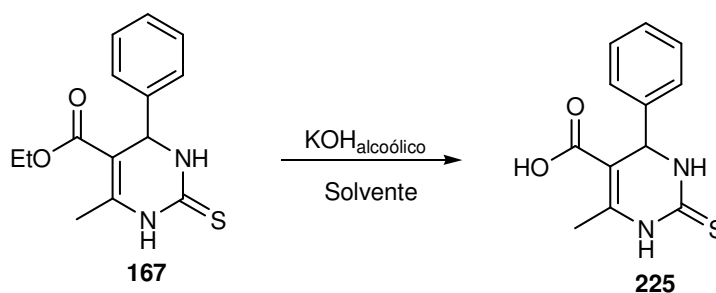


Esquema 71

O tratamento com ácido clorídrico pode ter levado à protonação do N1 formando o intermediário imínio **238**. Este intermediário seria suficientemente eletrofílico para sofrer adição de água na posição 2, levando ao intermediário **239**. Eliminação de EtSH de **239** poderia levar ao produto observado **236**. Portanto nos estudos futuros desta rota sintética o tratamento desta reação deve ser alterado, evitando a degradação de **237**.

Concomitantemente a esta abordagem foi investigada outra estratégia para evitar degradação do ácido carboxílico **225**. Através das análises por CCD das reações de hidrólise (**Esquema 70**), é possível observar a formação inicial do ácido **225**. Antes do consumo total do reagente de partida **167** já começa a ser detectada a formação de dois subprodutos menos polares que a DHPM **167**. Deve-se procurar condições reacionais para evitar a conversão do ácido **225** nos subprodutos, ou que ocorra em uma taxa menor que a conversão do reagente contendo o éster **167** no respectivo ácido **225**.

Para verificar o possível papel da água no meio reacional, foi realizada a reação utilizando $KOH_{\text{alcoólico}}$ em solventes apróticos. Desta maneira pretendeu-se eliminar uma das possibilidades de rota de degradação do ácido (**Esquema 72**). Os resultados são apresentados na Tabela 10.



Esquema 72

Tabela 10. Verificação da influência de diferentes solventes apróticos na hidrólise da DHPM **167**

Entrada	KOH (equiv.)	Solvente	Tempo (h)	temperatura	Rendimento 225 (%)
1	3	THF	4	refluxo	19
2	3	Acetato de etila	4	refluxo	23
3	3	MeCN	4	refluxo	21
4	3	Dioxano	4	refluxo	35
5	3	Dioxano	24	refluxo	15
6	2	Dioxano	24	refluxo	95

A avaliação inicial do melhor solvente para a reação foi realizada variando o solvente e mantendo as demais condições reacionais idênticas para comparação dos resultados (entradas 1-4). O solvente que se demonstrou mais adequado para otimização foi o dioxano, onde com 4h de reação foi obtido um rendimento de 35% de **225** e não foi observada formação de subprodutos (entrada 4). O melhor rendimento obtido pode ser atribuído à maior temperatura de ebulição do dioxano quando comparado aos demais solventes investigados.

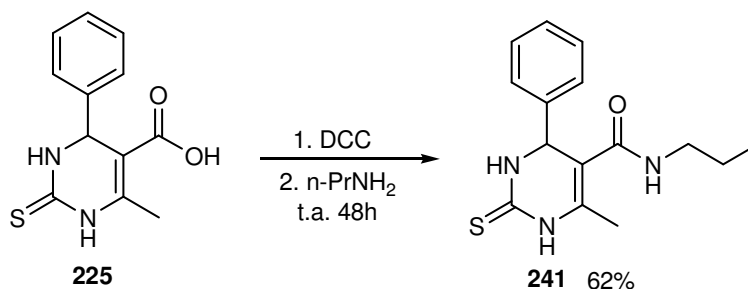
A utilização de longos tempos reacionais (entrada 5) nestas condições também levou a formação dos mesmos subprodutos de degradação pela análise por CCD, e o ácido **225** foi obtido em 24h de reação em rendimento menor do que em 4h de reação (entrada 4). A diminuição do número de equivalentes da base possibilitou encontrar uma condição reacional onde não se observou subprodutos, mesmo com longos tempos reacionais, e o produto **225** foi obtido em ótimo rendimento (entrada 6).

Mesmo após completa a reação de hidrólise, ainda sobram íons hidróxido para promover a isomerização do ácido para **230** quando 3 equivalentes de KOH são utilizados

(Esquema 68). O intermediário **230** pode reagir com íons hidróxido, levando à obtenção do intermediário **240** (Esquema 68) que pode sofrer a reação de descarboxilação através do caminho B proposto pelos autores.¹⁷⁰

Visto isso, pode-se dizer que a utilização de 2 equiv. de base possivelmente possibilitou evitar a degradação do produto **225** após completa a formação do ácido. A alteração do sistema de solventes evitou o excesso de água no meio reacional e também pode ter diminuído a taxa de conversão do ácido **236** nos intermediários descarboxiláveis (ex. **240**), o que minimizou a competição desta rota de degradação com a reação de hidrólise do éster **167**.

Conforme discutido no início deste item, a partir da DHPM contendo o grupo ácido carboxílico **225**, tem-se um novo ponto para agregar diversidade química a este heterociclo. Foi avaliada a possibilidade de síntese de amidas a partir do ácido carboxílico **225** (Esquema 73).



Esquema 73

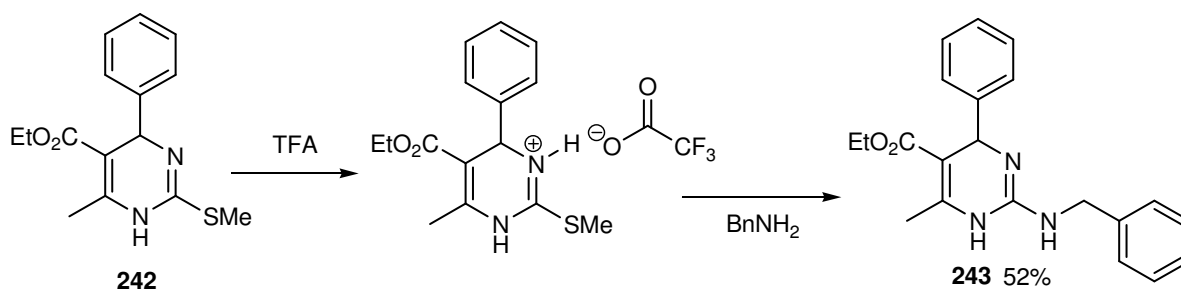
Verificou-se que o principal fator para o sucesso desta reação é a ordem de adição dos reagentes. A adição da diciclohexilcarbodiimida (DCC) deve ser feita 30 min. antes da presença da amina no meio reacional, assim evitando a reação do DCC diretamente com esta e possibilitando a ativação do grupamento ácido carboxílico menos nucleofílico. A reação ocorre em 48h à temperatura ambiente, e foi possível isolar a amida **241** em 62% de rendimento.

A reação de hidrólise da DHPM substituída com o grupo éster em C5 **167** foi otimizada com sucesso, e o ácido carboxílico **225** foi obtido em ótimo rendimento. Também foi demonstrada a aplicação sintética do grupo ácido carboxílico de **225** para a obtenção da DHPM substituídas com o grupo amida **241**. Os resultados iniciais da rota sintética para obtenção dos derivados contendo o grupamento acila em N3 **234** demonstram que é possível acetilar o N3 quimiosseletivamente, porém o tratamento da reação deve ser otimizado a fim de evitar degradação do produto almejado.

1.3.3.3. Guanilação das DHPMs

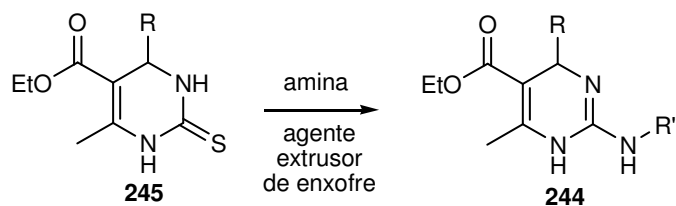
Conforme discutido na introdução deste capítulo, a função guanidina desempenha um papel importante em diversos sistemas biológicos. Objetivou-se a síntese de 2-alkilamino-1,4-diidropirimidinas para que estes possam ser comparados aos produtos *S*-alkilados numa futura investigação da relação estrutura-atividade.

Um dos poucos relatos na literatura para a síntese de 2-alkilamino-1,4-diidropirimidinas foi reportado por Matloobi *et al.*¹⁷² A partir de uma 2-metiltio-1,4-diidropirimidina **242**, obteve-se a 2-alkilamino-1,4-diidropirimidina **243** substituída com uma benzilamina na posição 2 (**Esquema 74**). A substituição do tioéter pela amina foi realizada após a posição N3 ser convertida em sal, o que aumenta a eletrofilicidade da posição 2. A utilização do contra-íon pouco nucleofílico derivado do ácido trifluoracético (TFA) possibilitou a obtenção do produto **243** em 52% de rendimento.



Esquema 74

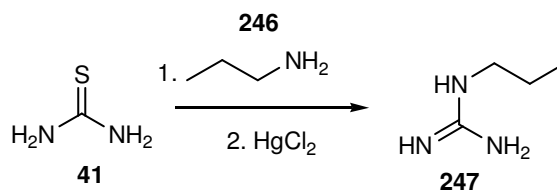
Para síntese de 2-alkilamino-1,4-diidropirimidinas do tipo **244**, pretendeu-se explorar a reatividade das DHPMs derivadas da tiouréia **245** frente a aminas e na presença de agentes extrusores de enxofre (**Esquema 75**). Não há relatos na literatura de reagentes extrusores de enxofre aplicados à síntese de guanidinas derivadas das diidropirimidin-2-tionas. Eifler-Lima *et al.*^{173,174} realizaram a síntese de amidinas heterocíclicas, a partir de tiolactamas empregando a amina primária em presença de HgCl₂, em refluxo do THF. Foi publicado que esta reação só ocorre com aminas primárias e a ordem de adição dos reagentes é fundamental para o sucesso da reação, onde o HgCl₂ deve ser adicionado ao meio reacional somente após a adição de largo excesso da amina



Esquema 75

A reação de guanilação de tiouréias envolvendo o uso de HgCl_2 é um método simples e eficaz de obtenção de guanidinas.¹⁷⁵ Estudos na literatura demonstram que para que a reação ocorra com sucesso, a tiouréia deve conter um grupamento ativador conjugado a, pelo menos, um dos nitrogênios.¹¹⁰ Como possivelmente o nitrogênio da posição 1 possui forte conjugação com o éster em C-5, a reação provavelmente seria possível utilizando o heterociclo obtido diretamente da reação de Biginelli **245**, sem modificações adicionais.

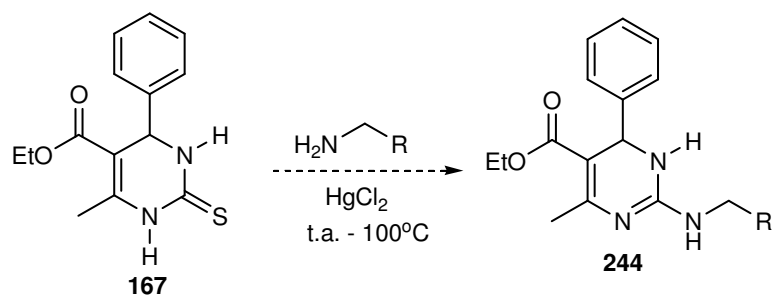
Para verificar se a técnica era capaz de produzir a guanidina, foi testada a reação entre a tiouréia (**41**) e a propilamina (**246**) na presença de HgCl_2 (**Esquema 76**), segundo protocolo publicado anteriormente.^{173,174} A guanidina **247** foi obtida com sucesso em 38% de rendimento.



Esquema 76

Desta maneira foi demonstrado que o protocolo é eficaz na síntese de guanidinas a partir de tiouréias, e a reação foi aplicada às DHPMs.

A DHPM (**167**) foi tratada com diferentes aminas na presença de HgCl_2 , em condições de temperatura ambiente, aquecimento e utilizando irradiação de microondas (**Esquema 77**). Apesar do desaparecimento da DHPM **167** por CCD, não foi detectada a formação dos produtos esperados **244**.



Esquema 77

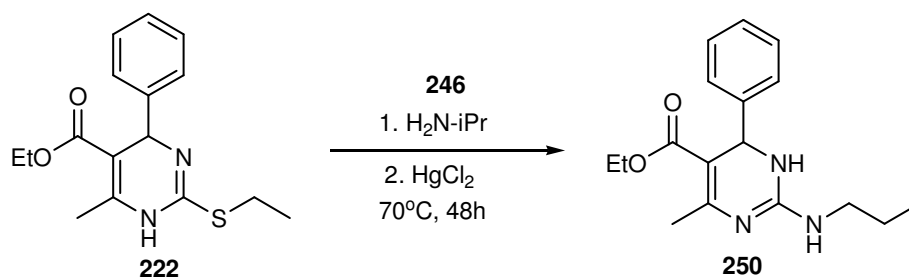
Tabela 11. Tentativas de obtenção das guanidinas 244

Entrada	R	Amina	Nº equiv.	Temperatura (°C)	Tempo (h)
1	-Et	246	10	t.a.	0,5
2	-Et	246	20	t.a.	1,0
3	-Et	246	20	70*	1,0
4	-Et	246	50	70*	1,5
5	-Et	246	50	M.O. (540 W)*	3 (min)
6	-Ph	248	30	t.a.	1,0
7	-Ph	248	35	100	1,5
8	-(CH ₂) ₂ NH ₂	249	10	t.a.	3,5

*reação realizada em ampola lacrada

Como as condições de síntese de guanidinas a partir de tiouréias não levaram à formação dos produtos desejados, fez-se uma busca de outras maneiras de síntese destes compostos relatadas na literatura. A síntese de guanidinas a partir de isotiouréias substituídas com grupos alquila no enxofre foi uma das possibilidades encontradas,¹¹¹ inclusive havendo alguns relatos da utilização de HgCl₂ como auxiliar nesta transformação tanto na síntese em solução¹⁷⁶ quanto na síntese em fase sólida.¹⁷⁷

Foi investigada a reação da S-alkil-diidropirimidina **222** com **246** na presença de HgCl₂ (**esquema 78**). A guanidina **250** foi obtida em 51% de rendimento através da utilização deste protocolo.



Esquema 78

1.3.3.4. Conjugação de moléculas bioativas com poliaminas

As poliaminas naturais, espermidina (**251**), espermina (**252**) e putrescina (**253**) (**Figura 6**) são compostos muito estudados devido à sua relação com o crescimento, diferenciação e proliferação celular e, portanto, com o desenvolvimento de tumores e a proliferação de células cancerígenas.¹⁷⁸ Existe um sistema específico de transporte de poliaminas na superfície das células denominado PTS (*Polyamine Transport System*), o qual transporta poliaminas e compostos estruturalmente relacionados do meio extracelular para o meio intracelular através do gasto de energia (ATP). Células tumorais apresentam maior expressão deste transportador devido a sua alta demanda por poliaminas¹⁷⁹ e vários estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de depletar poliaminas destes tipos celulares, assim impedindo seu crescimento. O composto mais conhecido neste tipo de tratamento é a α -difluormetilornitina (DFMO), que é um inibidor suicida da ornitina descarboxilase (ODC), enzima-chave na regulação fisiológica das poliaminas. Este composto, ao inibir a ODC, impede a conversão da ornitina, advinda do ciclo da uréia, em putrescina, assim diminuindo a concentração intracelular de poliaminas.¹⁸⁰

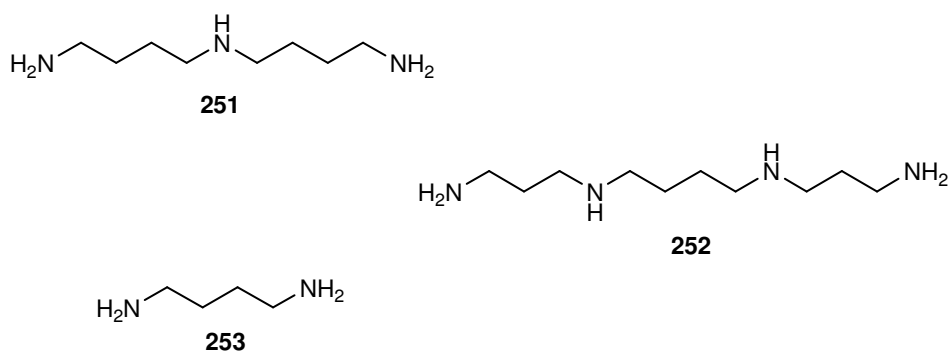


Figura 6. Poliaminas naturais

Alguns grupos de pesquisa vêm desenvolvendo moléculas conjugadas com poliaminas de forma a obter compostos com maior seletividade para as células tumorais e

menores efeitos colaterais.^{178,174} Segundo Delcros *et al*¹⁷⁸, devido à alta demanda das células tumorais por poliaminas, há maior expressão do transportador PTS nestas células do que nas células não cancerígenas, e assim moléculas conjugadas com poliaminas, uma vez passíveis de serem transportadas pelo PTS, seriam direcionadas às células tumorais. A utilização concomitante do DFMO causa uma depleção nos níveis de poliaminas, sinalizando para uma maior expressão do PTS na superfície celular, levando, assim, ao maior acúmulo destas moléculas em células tumorais. Outra atividade que moléculas conjugadas com poliaminas podem apresentar é a capacidade de agirem como bloqueadores do PTS, assim impedindo a entrada exógena de poliaminas nas células e potencializando a ação terapêutica do DFMO.¹⁷⁸ O padrão estrutural das poliaminas também vem sendo utilizado para conferir maior especificidade de ligação ao DNA em moléculas que apresentam baixa especificidade ou que não apresentam esta especificidade de ligação.¹⁷⁸

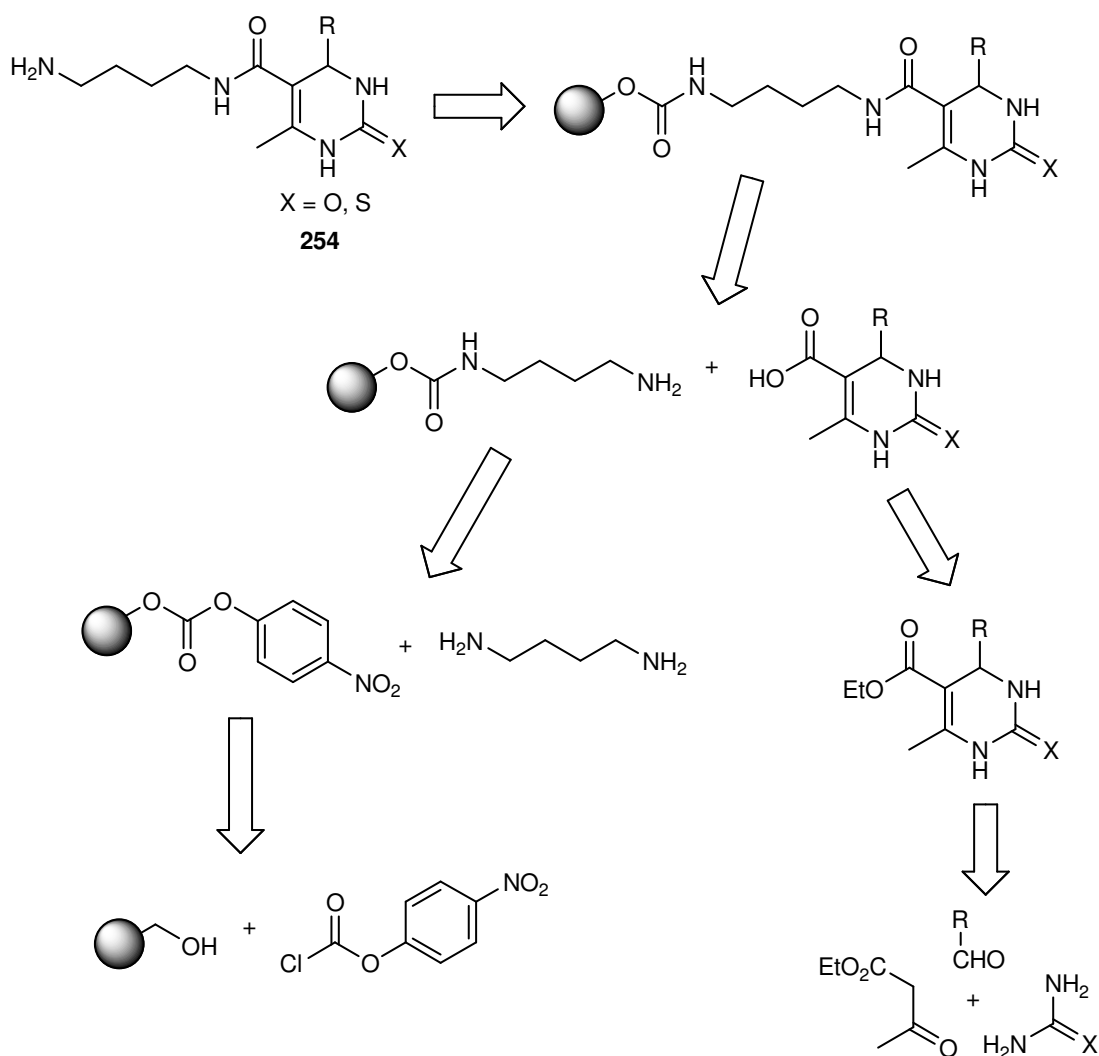
Moléculas conjugadas com poliaminas apresentam potencial na terapia antimicrobiana¹⁸¹ e também na terapia antiparasitária.¹⁸² Sua ação antiparasitária deve-se ao fato destas moléculas serem potentes inibidores de enzima tripanotona-reductase, enzima envolvida na proteção dos tripanossomas ao estresse oxidativo. Também no tratamento de parasitoses, a administração concomitante com DFMO potencializa a ação antiparasitária, uma vez que o DFMO age nestes parasitas interrompendo o seu ciclo celular, assim impedindo sua divisão e formação de novas glicoproteínas superficiais. Esta ação torna os parasitas mais suscetíveis ao sistema imunológico do hospedeiro.¹⁸² A derivatização de compostos que apresentam comprovada atividade antimicrobiana através de sua conjugação com poliaminas foi relatada na literatura, havendo uma melhora significativa na atividade antimicrobiana destes compostos, a qual os autores atribuem ao acréscimo na basicidade e hidrossolubilidade conferidos pela cadeia poliamínica.^{183,184}

1.3.3.4.1. Síntese em fase sólida de DHPMs:

Muitos problemas sintéticos estão relacionados à química de poliaminas, em especial problemas relacionados à purificação destes compostos altamente polares. A utilização da síntese orgânica em fase sólida (SOFS) na síntese de derivados poliaminados^{183,185} apresenta muitas vantagens como a simplificação dos processos de purificação, uma vez que estes são resumidos à filtração da resina do meio reacional; a possibilidade da utilização de um grande excesso de reagentes, devido a facilidade de purificação; além da

proteção do grupamento amino primário quando a poliamina é acoplada à resina, permitindo a utilização de substratos não protegidos.

Dando seqüência aos trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa na síntese de DHPMs multifuncionalizadas com potencial atividade farmacológica, foi planejada uma retrossíntese de uma rota sintética convergente para síntese de DHPMs contendo poliaminas ligadas através de um grupamento amida à posição 5 do núcleo DHPM, conforme pode ser exemplificado no **Esquema 79** contendo a putrescina como substituinte **254**.



Esquema 79

O planejamento de uma rota sintética convergente deve-se à simplicidade técnica na síntese em solução das DHPMs (conforme apresentado anteriormente). A proposta de utilizar o ácido carboxílico deve-se à baixa reatividade do grupamento éster das DHPMs

frente à nucleófilos, e também a possibilidade de utilização de protocolos bem estabelecidos na literatura para formação de ligações amida na SOFS.¹⁸⁶

Como o alongamento de cadeias poliamínicas utilizando SOFS apresenta diversas estratégias estabelecidas na literatura^{181,183} decidiu-se otimizar primeiramente as reações de acoplamento da amina, formação da amida e clivagem. Para isso foram utilizadas algumas diaminas comerciais e o ácido derivado da DHPM cujo protocolo para obtenção havia sido previamente otimizado (**Esquema 72**).

As reações foram analisadas através da Espectroscopia no Infravermelho (IV) diretamente na resina, utilizando pastilhas de KBr ou o ATR. A análise dos produtos ligados à resina através do IV apresenta limitações devido à sobreposição das bandas do produto ligado à resina com as bandas do suporte polimérico (**Figura 7**). Algumas técnicas especiais como *Raman FT-IR*, *FT-IR microspectroscopy* são reportadas na literatura como alternativas para contornar este problema.⁶⁹ Neste trabalho foi adaptada a técnica da diferença de espectros de IV em pastilhas de KBr utilizada por Crowley *et al.*¹⁸⁷ Segundo os autores, a utilização desta técnica possibilita uma boa visualização das bandas do produto, que, anteriormente à realização dessa diferença, eram apenas “ombros” nas bandas do suporte polimérico. Porém, ao contrário da técnica original, onde foi utilizada uma amostra de resina Wang não modificada como “branco” para a obtenção do espectro do produto ligado ao suporte, foi realizada a subtração após a aquisição dos espectros utilizando o software do próprio equipamento. Alternativamente, os dados dos espectros do produto ligado ao suporte e da resina não modificada foram inseridos em uma planilha eletrônica e subtraídos. Para minimizar as diferenças em transmitância devido a diferentes concentrações das pastilhas de KBr analisadas foi feita uma correção através da intensidade da banda em 1450cm^{-1} , referente ao poliestireno da resina, antes da subtração. Os dados subtraídos foram então plotados em gráficos de IV, os quais apresentaram as bandas do produto ligado com maior nitidez e possibilitaram uma melhor interpretação qualitativa.

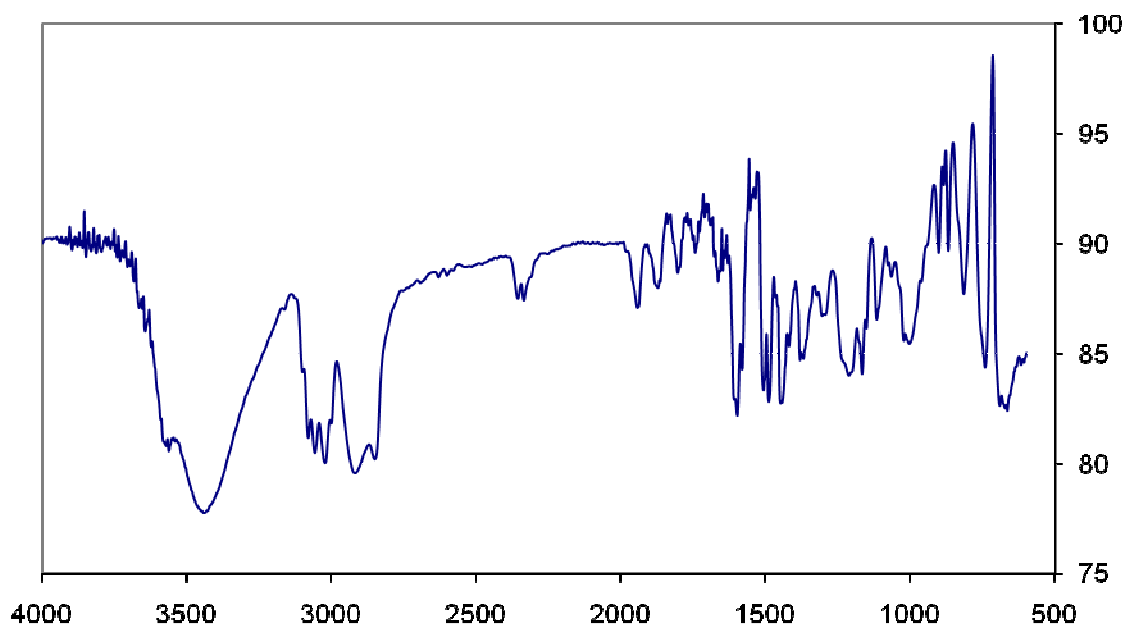
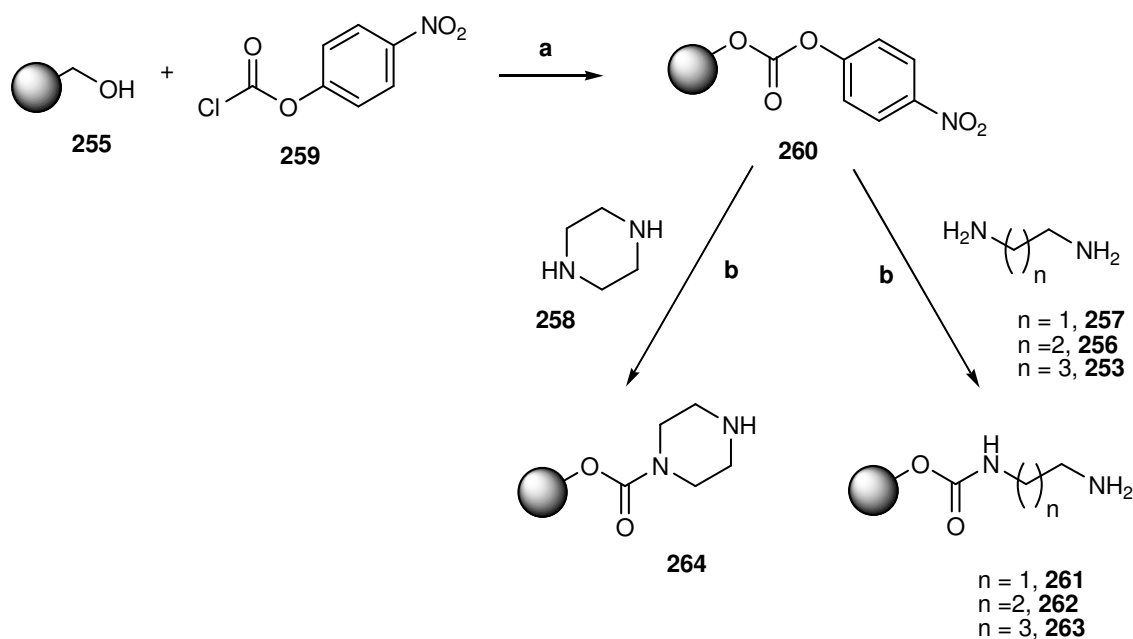


Figura 7. Espectro de IV da resina Wang

A síntese dos derivados diaminados das DHPMs foi realizada utilizando a resina Wang **255** (**Esquema 80**) como suporte sólido de acordo com trabalho relatado na literatura.¹⁸³ Primeiramente foi realizado o acoplamento da putrescina (1,4-diaminobutano, **253**), a 1,3-propanodiamina (**256**), a 1,2-etilenodiamina (**257**) e da piperazina (**258**) segundo protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório.¹⁸⁸



Esquema 80: Reagentes e Condições: **(a)** **259** (3eq.), Piridina (1,5eq.), DCM, T.A., 45min.; **(b)** diamina (10eq.); DCM, T.A., 2h

Conforme apresentado no **Esquema 80**, a resina Wang (**255**) reagiu primeiramente com o *p*-nitrofenilclorofornato (**259**) na presença de piridina para formação do carbonato ativado ligado à resina **260**. O tratamento desta resina **260** com excesso das diaminas levou à formação dos respectivos carbamatos **261-264**. A formação do carbonato ativado **260** é confirmada através do IV pelo aparecimento de uma banda em 1762 cm^{-1} característica deste grupo (**Figura 8**). A partir da subtração dos espectros as bandas referentes ao grupamento nitro (1552 e 1340 cm^{-1}), antes escondidas sob as bandas da resina, também ficam evidentes (**Figura 9**), permitindo melhor interpretação qualitativa do composto **260**.

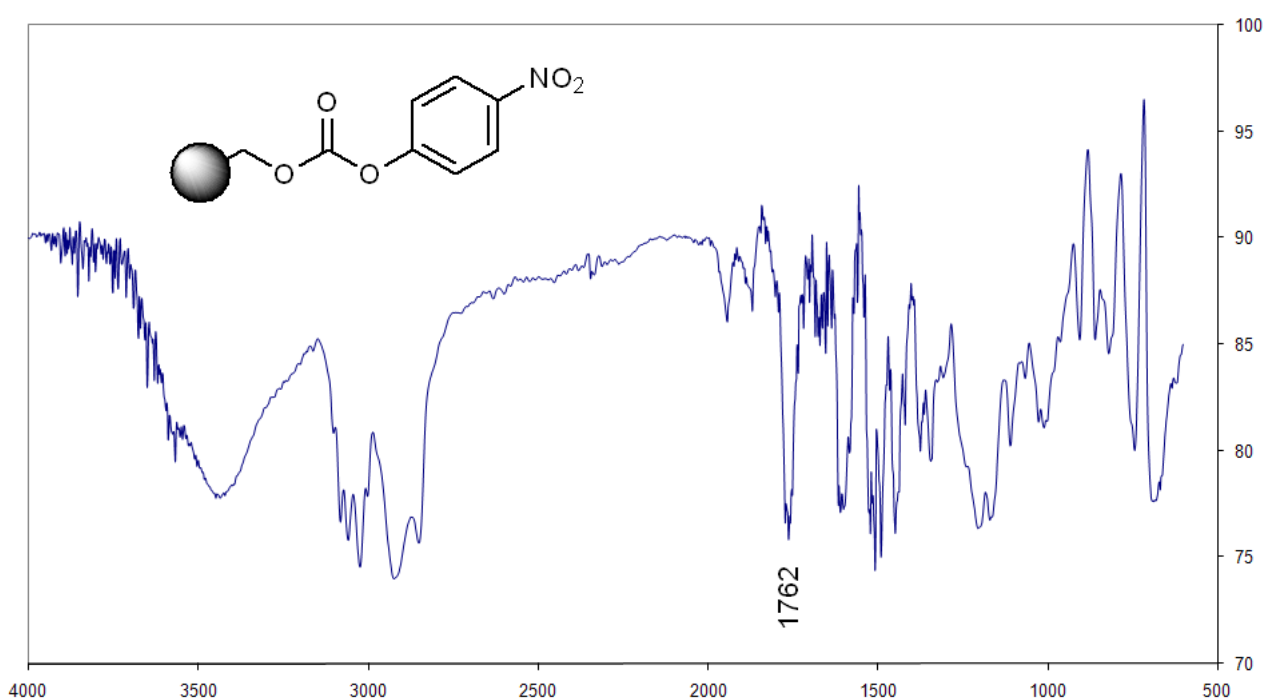


Figura 8. Espectro de IV do carbonato ligado à resina Wang 260.

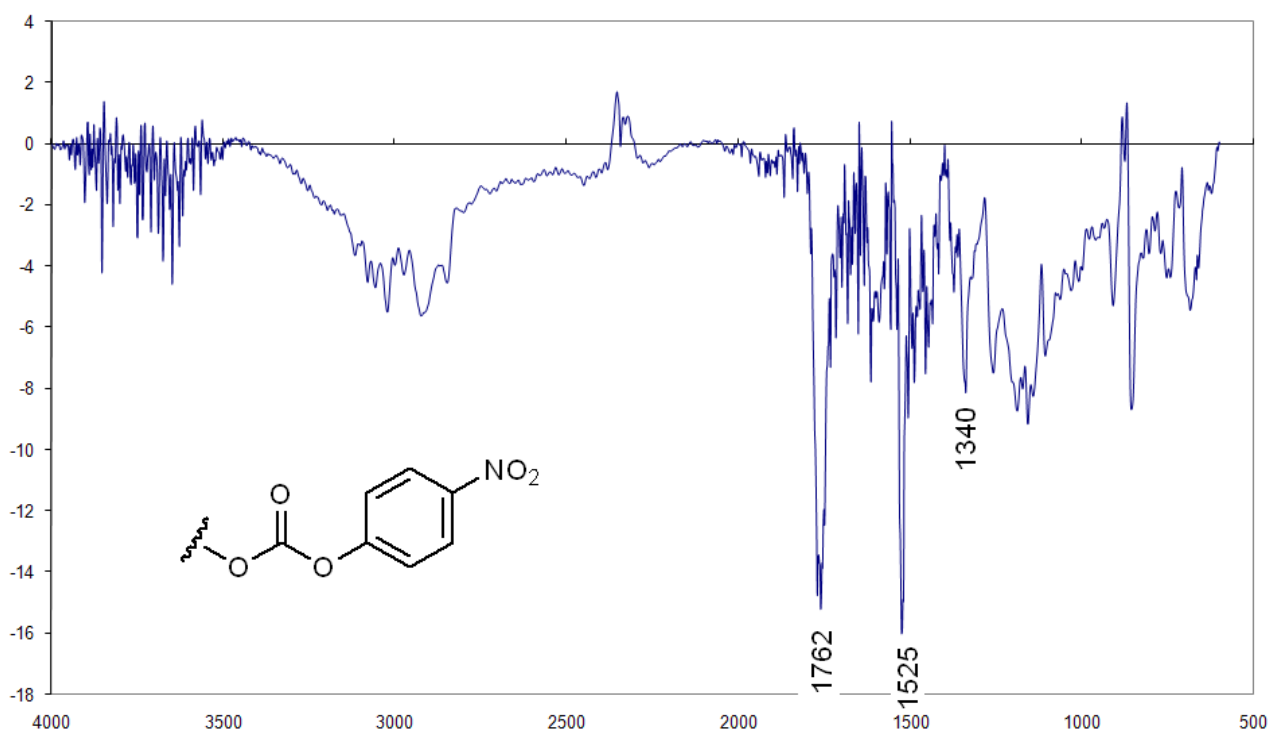


Figura 9. Espectro de subtração entre o carbonato ligado à resina Wang 260 e a resina Wang.

O completo desaparecimento da banda de carbonato e o aparecimento de uma banda de carbamato em 1710 cm^{-1} (1697 cm^{-1} para **264**) indica a conversão de **260** em **261-264** (Figuras 10 e 11).

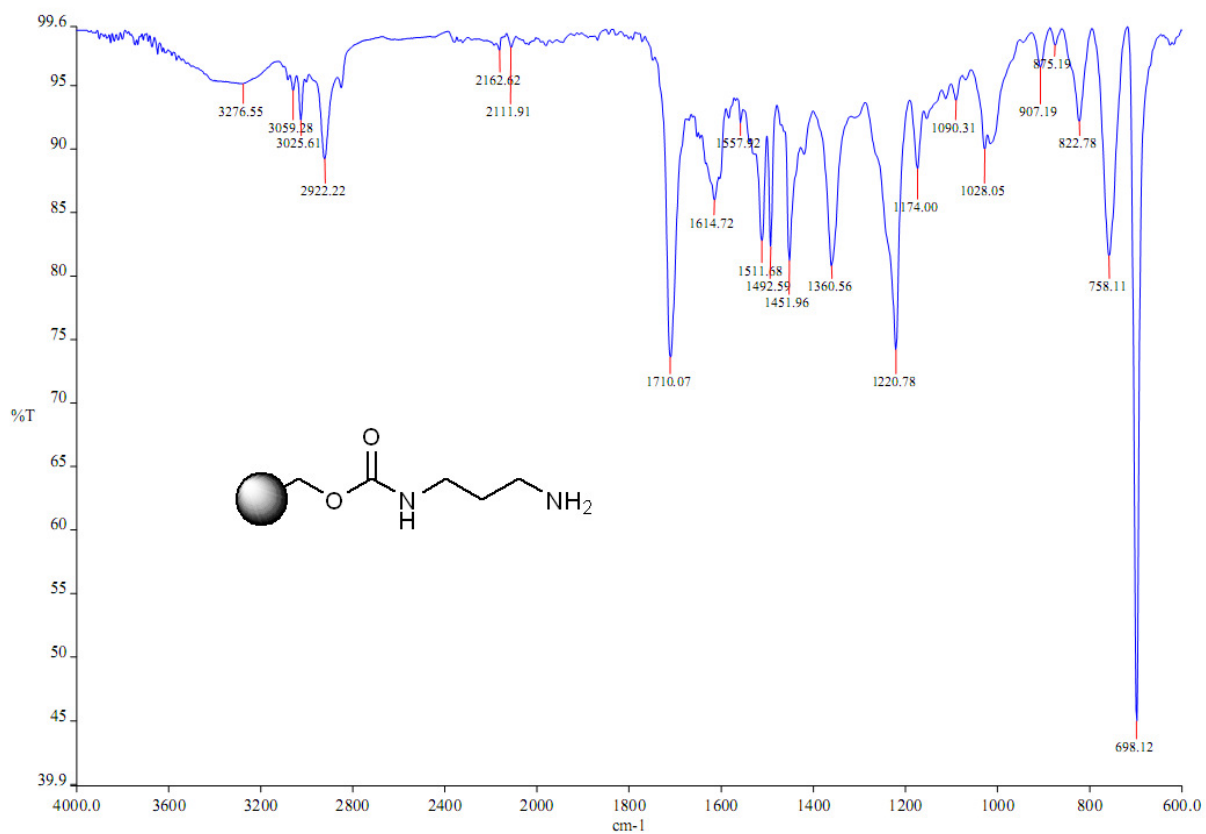


Figura 10. Espectro de IV (ATR) de 262

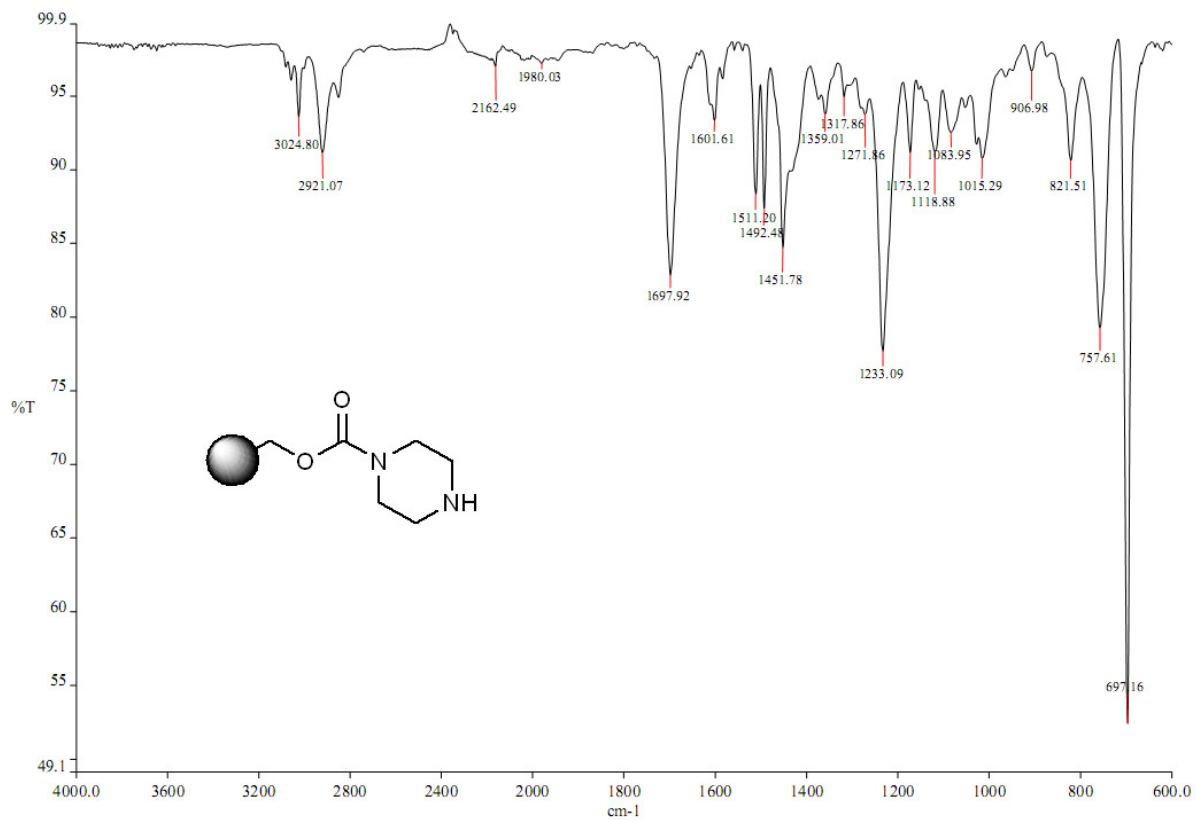
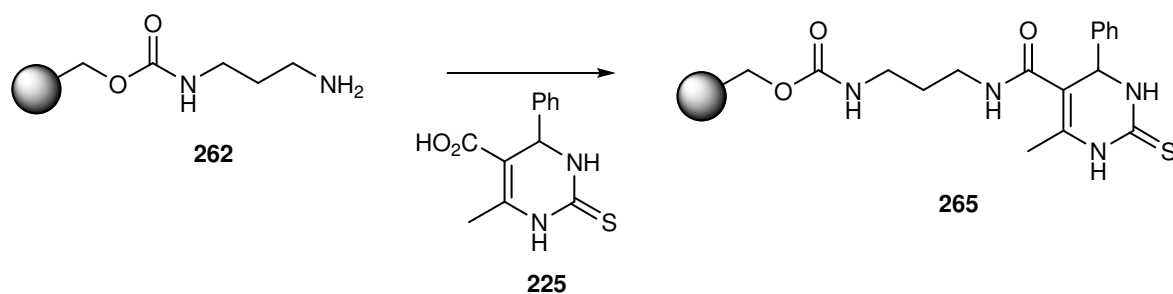


Figura 11. Espectro de IV (ATR) de 264

Posteriormente foi investigada a reação de acoplamento entre o ácido **225** e as aminas ligadas ao suporte **261-264** (**Esquema 81**). Para otimização desta etapa foi utilizada a 1,3-propanodiamina ligada à resina **262** (**Tabela 12**). O monitoramento das reações foi feito através do teste de Kaiser, teste colorimétrico da ninhidrina que indica a presença de aminas primárias. As reações foram dadas como completas quando o teste de Kaiser resultava na ausência de cor na resina e na solução (resultado negativo).

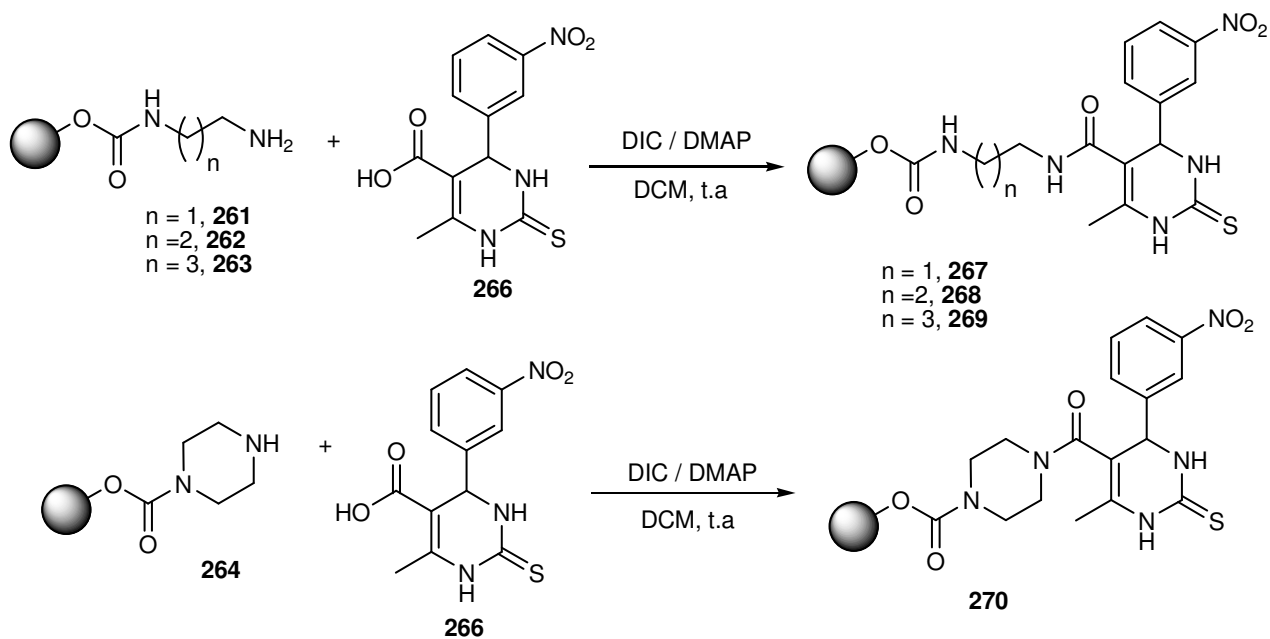


Esquema 81

Tabela 12. Condições investigadas na síntese de **265**

Entrada	Ácido (n° equiv.)	Agente acoplamento (equiv.)	Co-ativador (equiv.)	Tempo (h)
1	2,0	DCC (2,0)	-	48
2	2,0	DIC (2,0)	-	92
3	2,0	DIC (5,0)	DMAP (0,1)	80
4	3,0	DIC (5,0)	DMAP (0,1)	70

Conforme pode ser visto na Tabela 12, o DCC mostrou-se mais efetivo no acoplamento que o DIC (entradas 1 e 2). A utilização do DCC gerou um subproduto (provavelmente a uréia correspondente) difícil de eliminar e que contaminou as reações subseqüentes. Desta maneira a utilização do DIC foi otimizada adicionando-se co-promotores à reação. A utilização de maior proporção de DIC em presença de quantidades catalíticas de DMAP possibilitou redução do tempo reacional (entrada 3), e o aumento da proporção do ácido possibilitou maior redução no tempo (entrada 4). As condições otimizadas foram aplicadas no acoplamento do ácido **266** às diversas diaminas **261-264** em suporte sólido (**Esquema 82**).



Esquema 82

A obtenção dos produtos **267-270** foi confirmada pelo aparecimento das bandas entre $1650-1670\text{ cm}^{-1}$ (amida α,β -insaturada), $1110-1130\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{S}$), e pelas bandas referentes ao grupamento nitro (1530 e 1340 cm^{-1}) no IV (**Figuras 12 e 13**).

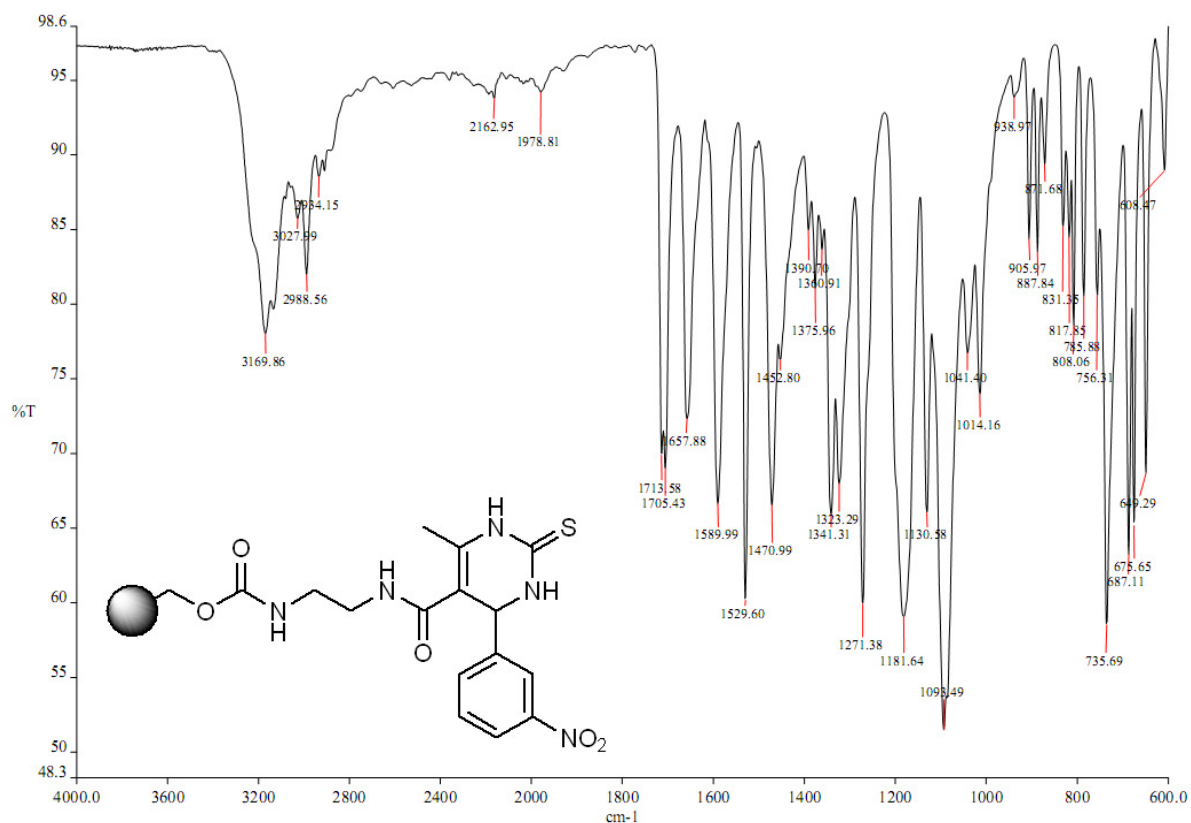


Figura 12. Espectro de IV (ATR) de 267

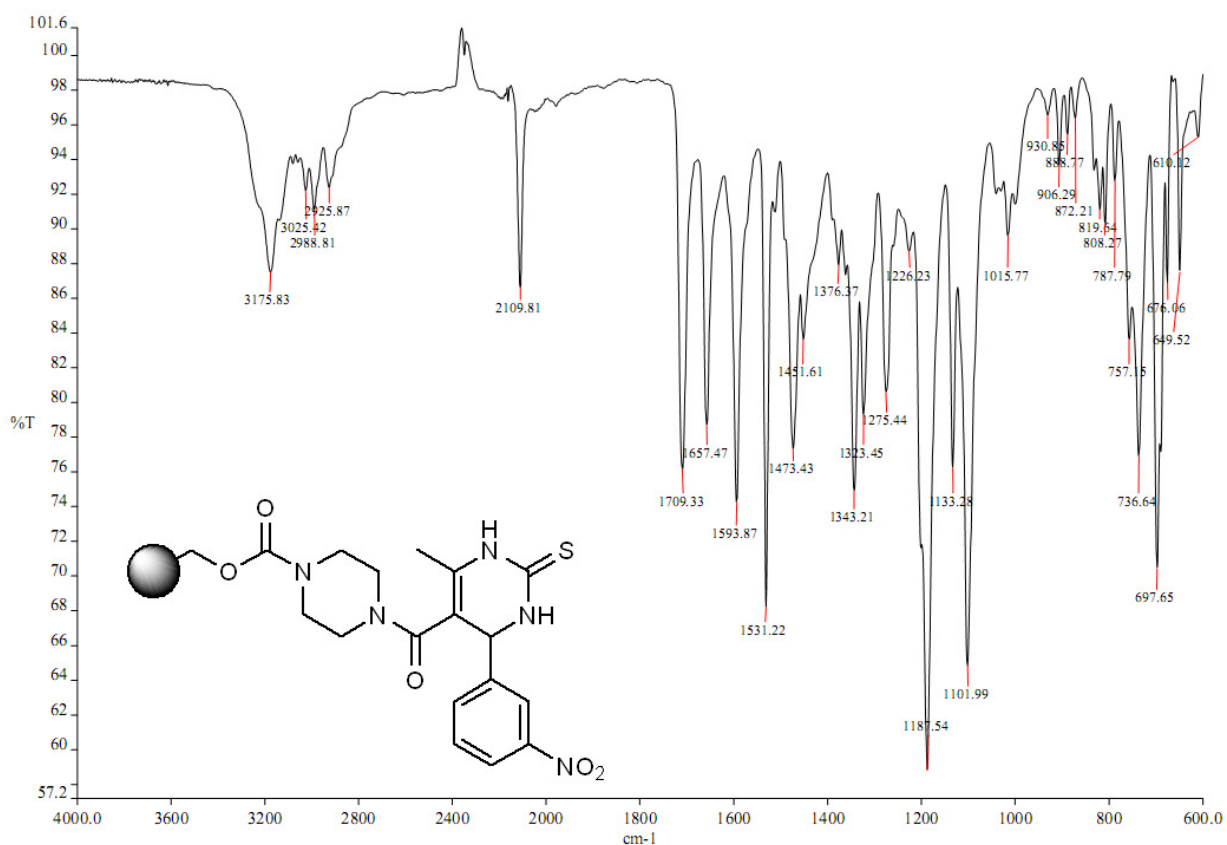
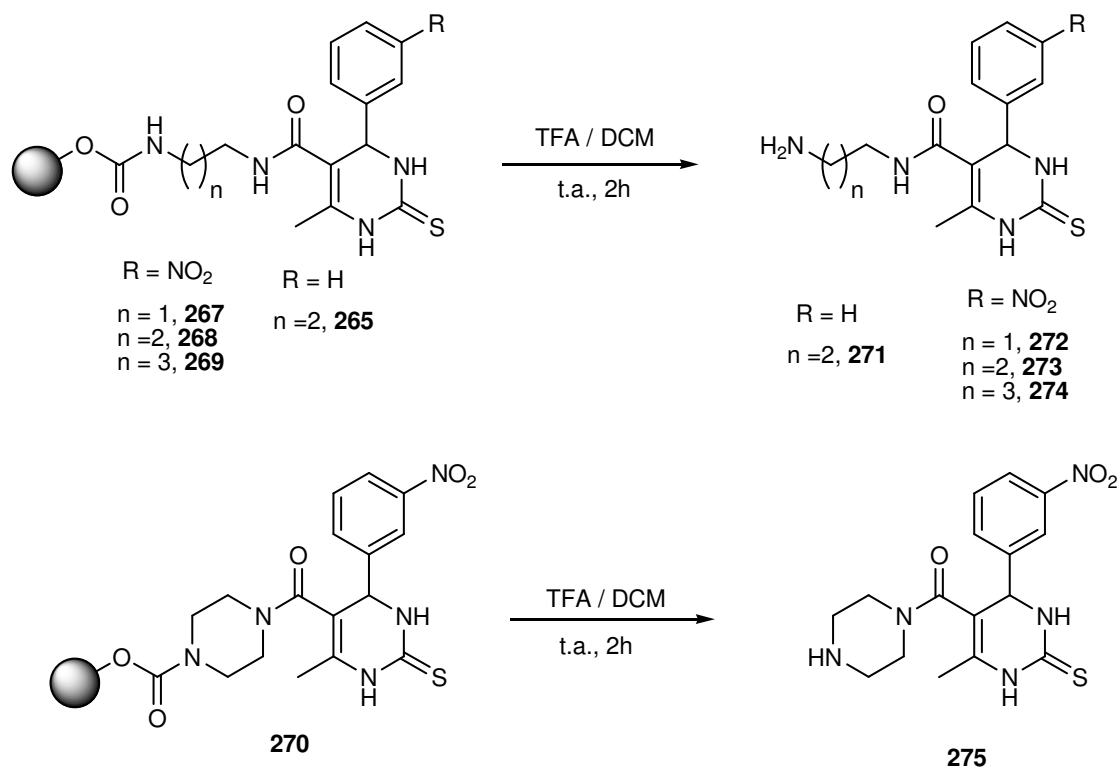


Figura 13. Espectro de IV (ATR) de 270

A reação de clivagem foi realizada com uma mistura de DCM 3:1 ácido trifluoracético (TFA) à temperatura ambiente por 2h (**Esquema 83**).



Esquema 83

A análise da resina após clivagem por IV (**Figura 14**) demonstra que houve clivagem completa dos produtos. Ocorre o desaparecimento das bandas do linker carbamato (1690-1715 cm^{-1}). As bandas presentes na resina indicam a provável ligação do trifluoracetato após degradação do linker e liberação do produto. No espectro da Figura 14 podemos observar a banda referente ao éster (1782 cm^{-1}), assim como as bandas referentes ao grupamento CF_3 (1200-1100 cm^{-1} e 756 cm^{-1}) e a ausência das bandas referentes à hidroxila (3300 cm^{-1}).

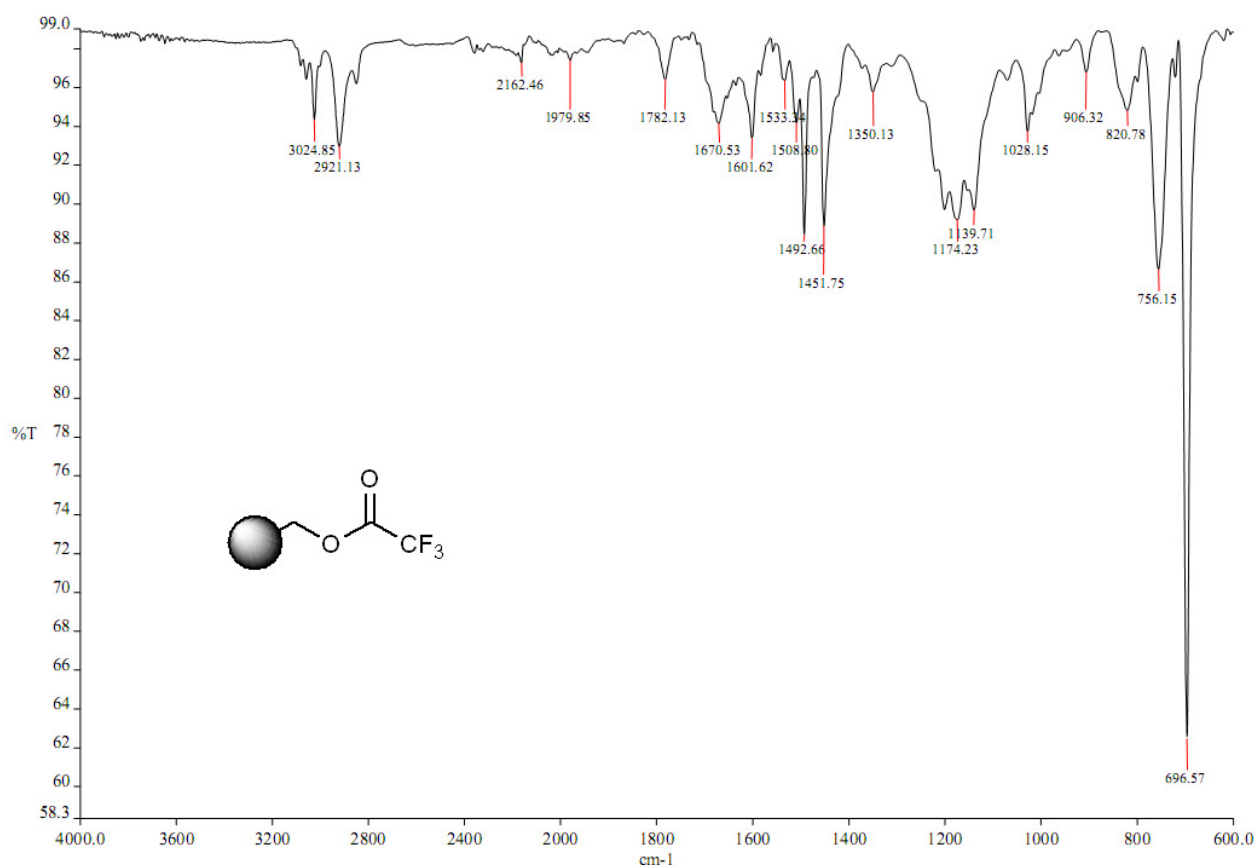


Figura 14. Espectro IV (ATR) da resina após a reação de clivagem

Assim, a rota de síntese em fase sólida foi parcialmente otimizada para síntese de amidas derivadas de DHPMs. Os compostos obtidos por clivagem foram obtidos em rendimentos muito baixos (2-12%) e muito impuros o que dificultou sua caracterização. As figuras abaixo mostram o espectro de IV obtido do produto **275** (**Figura 15**) o espectro de massas do bruto isolado do produto **271** (**Figura 16**). O sinal referente à forma protonada de **271** ($m/z = 305$) está presente majoritariamente no espectro, porém há muita impureza, o que não se esperava utilizando a técnica de síntese orgânica em fase sólida.

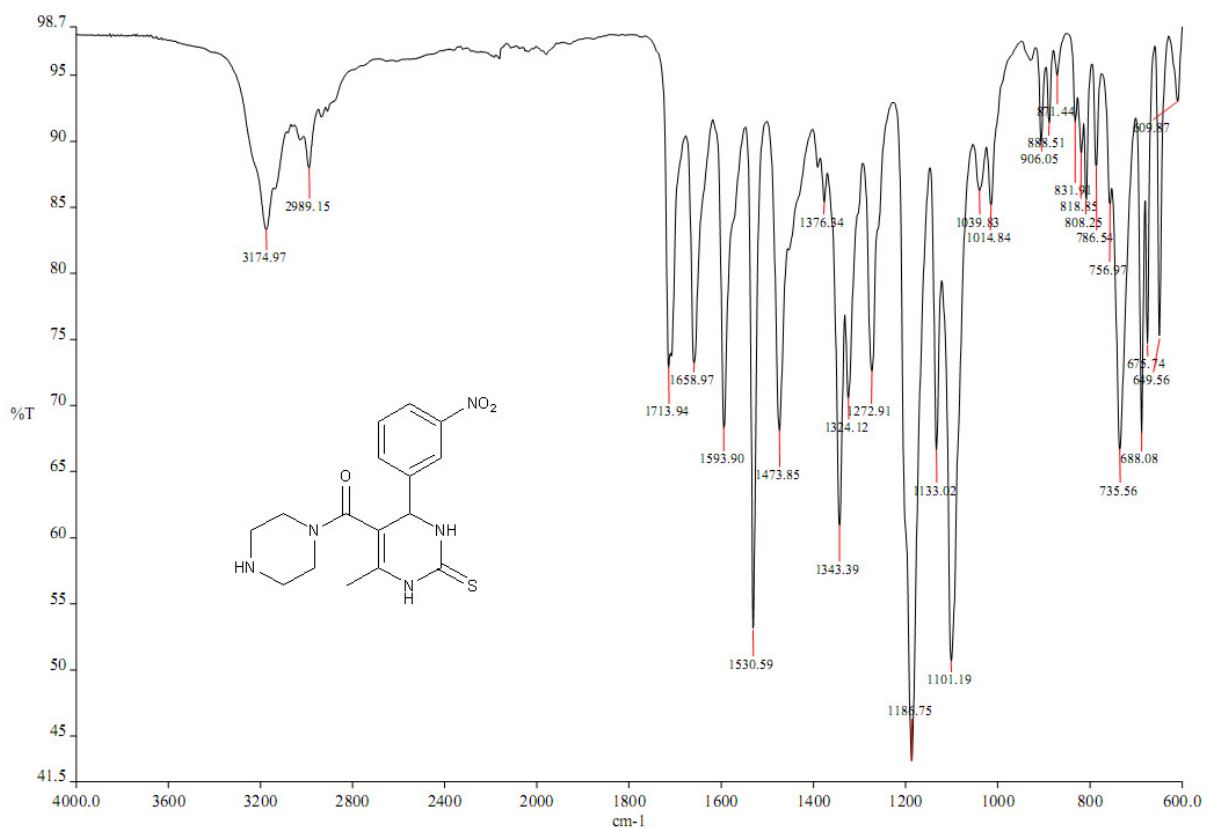


Figura 15. Espectro de IV (ATR) do produto 275

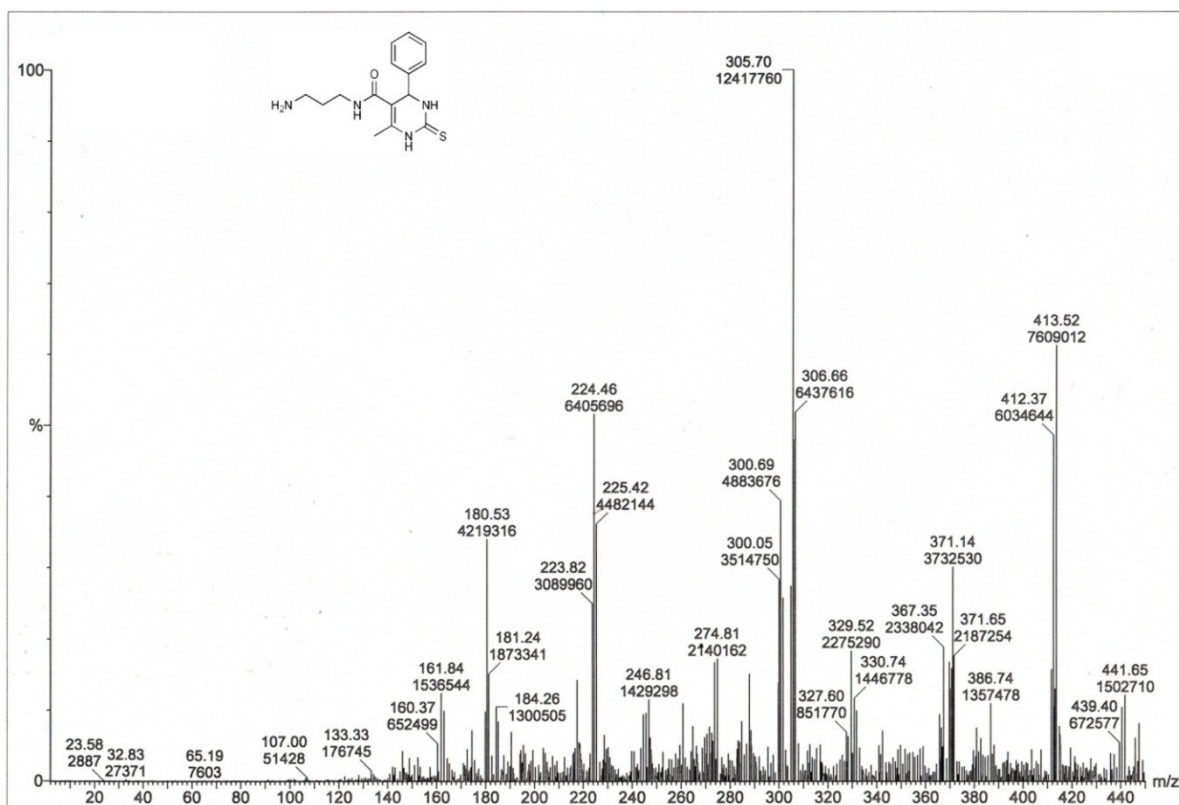


Figura 16. Espectro de massas (ES+, SCAN) do bruto reacional isolado na síntese de 271.

1.4. CONCLUSÕES

Foi realizada a síntese em solução de 26 DHPMs com sucesso e em bons rendimentos empregando diversos protocolos. Foi demonstrada a grande aceleração promovida pela utilização de energia de microondas na reação de Biginelli promovida por cloreto de estanho. Foi desenvolvido e otimizado um novo protocolo de síntese destes compostos a partir da utilização do agente desidratante trietilortoformato (TEOF) utilizando energia de microondas, e também através da utilização de TEOF juntamente com ácidos orgânicos fracos (ácido cítrico e oxálico) utilizando aquecimento convencional. O sistema ácido cítrico/TEOF, a 100°C, durante 1-2h apresentou melhores rendimentos, que variaram entre 71-96%. Foi demonstrada a aplicação do TEOF em métodos com aquecimento convencional com e sem a presença dos ácidos e métodos promovidos por microondas, o que possibilitou sugerir a maneira pela qual este composto promove a reação de Biginelli. Os protocolos empregados permitiram a obtenção de variedade estrutural em todos os três componentes da reação, obtendo-se DHPMs contendo anéis aromáticos com diversos padrões de substituição na posição 4, enxofre ou oxigênio na posição 2 e um derivado bicíclico a partir da variação do componente dicarbonílico.

A reatividade das DHPMs foi investigada em diversos pontos do heterocíclico. As reações de S-alkilação possibilitaram a obtenção de 3 compostos regioseletivamente alquilados na posição 2 em rendimentos de moderados a bons (58-92%), assim como a obtenção de um derivado bis-alkilado inédito em 99% de rendimento. Através da reação com anidrido acético, foi obtida uma DHPM regioseletivamente acetilada no N3 em 35% de rendimento. As reações de guanilação sobre o ciclo DHPM possibilitaram a demonstração de um novo protocolo para a síntese de 1 exemplo inédito de 2-alkilamino-diidropirimidina em 51% de rendimento. A reação de hidrólise foi otimizada possibilitando a obtenção de uma DHPM contendo o grupo ácido carboxílico na posição 5 em 95% de rendimento, e problemas de degradação observados foram contornados.

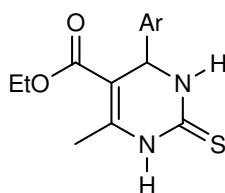
A aplicação sintética deste ácido foi demonstrada na síntese de uma amida derivada da n-propilamina em 62% de rendimento utilizando síntese em solução, e também foi aplicada no desenvolvimento de uma rota convergente inédita de síntese em fase sólida de 5 DHPMs contendo diaminas como substituintes na posição 5. A construção dos linkers carbamato contendo 4 diferentes diaminas e o acoplamento do ácido derivado das DHPMs foram realizados com sucesso. A etapa de clivagem da resina necessita de maior otimização

A diversidade química obtida com a síntese no total de 35 compostos pode ser aplicada na síntese de novos análogos. Também pode ser aproveitada em uma futura

investigação da relação estrutura-atividade destes compostos ou na otimização dos seus parâmetros farmacocinéticos, desta maneira permitindo a otimização de possíveis candidatos à protótipos de fármaco.

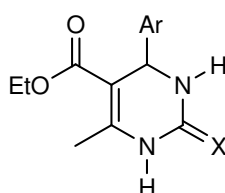
1.5. MATERIAIS E MÉTODOS

1.5.1. Protocolo geral para síntese de diidropirimidin-2-tionas promovida por $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ utilizando irradiação por microondas



Em um tubo de ensaio foram adicionados o acetoacetato de etila (1,5 mmol), o aldeído (1,5 mmol), a tiouréia (1,8 ou 3 mmol) e o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,3 mmol). O tubo de ensaio foi imerso em um Becker com SiO_2 e irradiado no MO na potência e número de ciclos de 1 minuto indicados nas tabelas, com resfriamento entre os ciclos. O sólido obtido foi solubilizado no mínimo de EtOH fervente e vertido em um Becker com água/gelo picado. Os produtos foram filtrados e lavados com água gelada. Os brutos reacionais foram recristalizados do solvente apropriado (EtOH, EtOH/ H_2O ou MeCN).

1.5.2. Protocolo geral para a síntese de DHPMs promovida por TEOF utilizando irradiação por microondas:

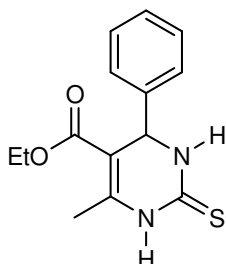


Em um tubo de ensaio foram adicionados o acetoacetato de etila (1,5 mmol), o aldeído (1,5 mmol), uréia ou tiouréia (3,0 mmol) e o TEOF (3,0 mmol). A mistura reacional foi submetida à irradiação por MO em 12 ciclos de 20s na potência máxima do equipamento. Ao final da reação foi adicionada água e agitado overnight, após o meio foi resfriado em banho de gelo e o precipitado gerado foi filtrado e lavado com água gelada. Os brutos reacionais foram recristalizados do solvente apropriado (EtOH, EtOH/ H_2O ou MeCN).

As reações em paralelo foram conduzidas em escala milimolar utilizando tubos de ensaio como frasco reacional conforme descrito no item 4.2. Cada frasco reacional foi etiquetado indicando o aldeído e uréia utilizados. As reações foram dadas como encerradas

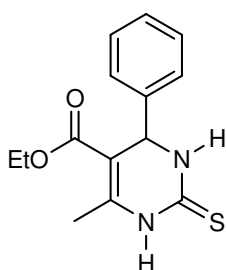
a partir da solidificação total do meio reacional da maior parte das reações.

1.5.2.1. Síntese de Etil 6-metil-2-tioxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (167), utilizando aquecimento convencional, promovida pelos ácidos de Bronsted:



Uma mistura de acetoacetato de etila (2,5 mmol), benzaldeído (2,5 mmol), tiouréia (5,0 mmol) e ácido cítrico (0,25 mmol) ou ácido oxálico (0,25 mmol) ou HCl_{conc.} (0,25 mmol) foram colocados em um balão de fundo redondo de 50 mL e aquecidos sob agitação em um banho de óleo pré-aquecido (50 ou 100°C) ou agitados à temperatura ambiente durante o tempo indicado na tabela tal. Ao final, foi adicionada água à mistura reacional, agitado pelo tempo apropriado para solidificação e resfriado em um banho de gelo. O precipitado foi filtrado, lavado com água gelada e seco sob vácuo.

1.5.2.2. Síntese de Etil 6-metil-2-tioxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (167), utilizando aquecimento convencional, promovida pelos ácidos de Bronsted juntamente com TEOF*:



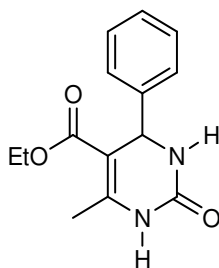
Uma mistura de acetoacetato de etila (2,5 mmol), benzaldeído (2,5 mmol), tiouréia (5,0 mmol) e ácido cítrico (0,25 mmol) ou ácido oxálico (0,25 mmol) ou HCl_{conc.} (0,25 mmol), juntamente com trietilortofornato (2,5 mmol, 1 equiv.; ou 5,0 mmol, 2 equiv.) foram colocados em um balão de fundo redondo de 50 mL e aquecidos sob agitação em um banho de óleo pré-aquecido (50 or 100°C) ou agitados à temperatura ambiente durante o tempo

* Um procedimento similar ao exposto no item 4.4 foi adotado para a síntese das demais DHPMs, de acordo com a tabela 7, Esquema 62. Quando necessário o bruto reacional foi deixado em contato com água a 4°C para completa precipitação (24-72h).

indicado na tabela tal. Ao final, foi adicionada água à mistura reacional, agitado pelo tempo apropriado para solidificação e resfriado em um banho de gelo. O precipitado foi filtrado, lavado com água gelada e seco sob vácuo gerando o produto.

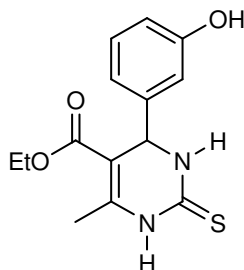
P.F. 204-207 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.09 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), 4.00 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.17 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H, CH), 7.23-7.37 (m, 5H, arom.), 9.65 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, N₃-H), 10.34 (br s, 1H, N₁-H). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.1, 17.2, 54.1, 59.9, 100.7, 126.4, 127.7, 128.6, 143.5, 145.1, 165.1, 174.2. **IV** (ATR) 3324.4, 3170.4, 2980.2, 1665.9, 1572.4, 1463.8, 1370.1, 1326.4, 1282.9, 1192.5, 1175.1, 1116.5, 1027.6, 1002.1, 757.8, 722.2, 691.8, 651.5 cm⁻¹.

1.5.3. Etil 6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (**181**):



P.F. 210-212°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.09 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 3.98 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.15 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, CH), 7.22-7.32 (m, 5H, arom.), 7.74 (br s, 1H, NH), 9.20 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** δ (75 MHz, DMSO-*d*⁶) 12.2, 16.0, 52.1, 57.3, 97.4, 124.4, 125.3, 126.4, 143.1, 145.2, 150.2, 163.3. **IV** (ATR) 3236.9, 3112.9, 2974.7, 1721.7, 1697.3, 1643.5, 1454.1, 1418.8, 1312.9, 1289.9, 1217.1, 1085.9, 879.0, 772.2, 755.8, 697.1, 660.4 cm⁻¹.

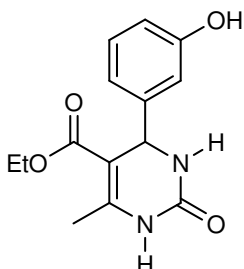
1.5.4. Etil 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (**209**):



P.F. 184-187°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.04 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.11 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, CH), 6.65-6.69 (m, 3H, arom.), 7.10-7.18 (m, 1H, CH_{arom.}), 9.46 (s, 1H, OH), 9.62 (br s, 1H, NH), 10.31 (br s, 1H, NH). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.1, 17.2, 53.9, 59.6, 100.8, 113.2, 114.6, 117.0,

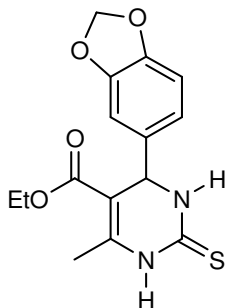
129.5, 144.8, 144.9, 157.5, 165.2, 174.2. **IV** (ATR) 3298.8, 3180.4, 2983.7, 1663.8, 1572.6, 1473.6, 1445.4, 1369.9, 1281.7, 1188.2, 1153.1, 1113.4, 1024.2, 787.6, 752.4, 700.4 cm^{-1} .

1.5.5. Etil 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (213):



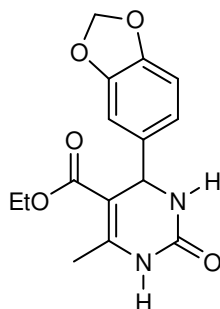
P.F. 163-166°C. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d^6$) δ 1.11 (t, 3H, $J=7.0$ Hz, CH_3), 2.22 (s, 3H, CH_3), 3.98 (q, 2H, $J=7.0$ Hz CH_2O), 5.04 (s, 1H, C-4H), 6.64-7.09 (m, 4H, arom.), 7.64 (s, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, NH) ; $^{13}\text{C RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 75MHz) δ 14.2, 17.6, 52.9, 59.2, 100.1, 113.2, 114.9, 116.7, 129.4, 147.0, 148.5, 152.2, 157.3, 165.9. **IV** (ATR) 3512.9, 3341.3, 3236.7, 3116.4, 1723.3, 1674.7, 1633.5, 1599.6, 1452.1, 1295.6, 1218.4, 1089.3, 1025.9, 872.1, 775.4, 702.9 cm^{-1} .

1.5.6. Etil 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (191):



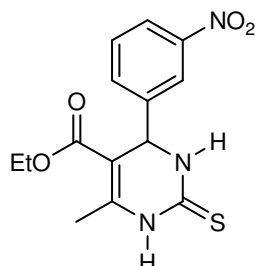
P.F. 156-159°C. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d^6$) δ 1.11 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3). , 2.28 (s, 3H, CH_3), 3.99 (q, $J=7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 5.08 (d, $J=3.8$ Hz, 1H, CH), 5.99 (s, 2H, OCH_2O), 6.64-6.72 (m, 1H, arom.), 6.87 (m, 2H, arom.), 9.61 (br s, 1H, NH), 10.33 (br s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO}-d^6$) δ 14.1, 17.2, 53.6, 59.6, 100.6, 101.0, 106.7, 108.1, 119.6, 137.4, 145.0, 146.7, 147.3, 165.0, 173.9. **IV** (ATR) 3312.0, 3175.8, 2981.0, 1662.3, 1573.9, 1483.9, 1444.6, 1371.4, 1336.0, 1265.9, 1234.9, 1189.4, 1110.3, 1037.6, 937.8, 917.3, 815.2, 748.1, 657.5 cm^{-1} .

1.5.7. Etil 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (190):



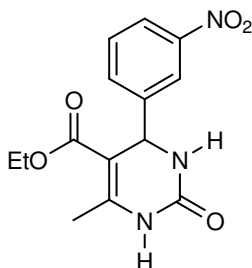
P.F. 188-190°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.11 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 3.99 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.08 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH), 5.98 (s, 2H, OCH₂O), 6.69-6.75 (m, 2H, arom.), 6.84-6.86 (m, 1H, arom.), 7.71 (s, 1H, NH), 9.20 (s, 1H, NH). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.1, 17.8, 53.7, 59.2, 99.3, 101.0, 106.7, 108.0, 119.4, 138.9, 146.4, 147.3, 148.3, 152.1, 165.4. **IV** (ATR) 3353.8, 3221.1, 3103.8, 2965.4, 1688.0, 1637.3, 1488.3, 1446.5, 1373.0, 1295.5, 1242.0, 1222.6, 1166.6, 1089.6, 1039.3, 927.7, 810.2, 793.8, 674.2 cm⁻¹.

1.5.8. Etil 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (210):



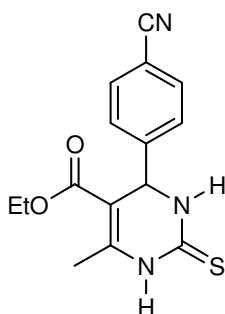
P.F. 206-209°C (206-207 °C) **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.36 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH), 7.70-7.72 (m, 2H, arom.), 8.10-8.11 (m, 1H, arom.), 8.17-8.20 (m, 1H, arom.), 9.81 (br s, 1H, NH), 10.55 (br s, 1H, NH). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.0, 17.3, 53.5, 59.8, 99.8, 121.2, 122.8, 130.5, 133.0, 145.5, 146.0, 147.8, 164.9, 174.5. **IV** (ATR) 3175.5, 2990.1, 1707.3, 1659.5, 1593.4, 1529.5, 1472.5, 1343.5, 1277.7, 1183.9, 1100.5, 892.7, 727.0, 687.9 cm⁻¹.

1.5.9. Etil 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (214):



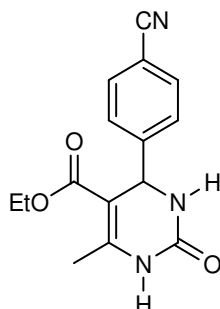
P.F. 225-227°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.08 (t, 3H, *J* 6.9 Hz, CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃), 3.98 (q, 2H, *J* 6.9 Hz CH₂O), 5.29 (s, 1H, CH), 7.64-8.10 (m, 4H, arom.), 8.90 (s, 1H, NH), 9.37 (s, 1H, NH) ; **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.0, 17.9, 53.6, 59.4, 98.4, 121.2, 122.3, 130.0, 133.0, 147.0, 147.8, 149.3, 151.9, 165.0. **IV** (ATR) 3326.0, 3089.7, 2963.3, 1705.9, 1686.5, 1625.6, 1523.1, 1455.9, 1345.1, 1309.8, 1265.8, 1221.4, 1085.6, 900.4, 815.9, 794.1, 738.7, 685.5 cm⁻¹.

1.5.10. Etil 4-(4-cianofenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (182):



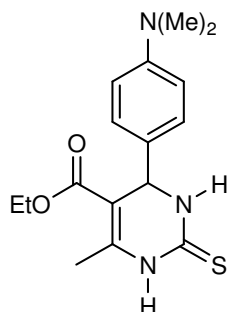
P.F. 178-181°C; **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.09 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.00 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.24 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, CH), 7.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, arom.), 7.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2xHa arom.), 9.74 (br s, 1H, NH), 10.47 (br s, 1H, NH). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.0, 17.2, 53.8, 59.8, 99.8, 127.5, 129.9, 132.7, 133.2, 138.8, 145.9, 148.5, 164.9, 174.5. **IV** (ATR) 3299.4, 3274.2, 2983.9, 2238.9, 1650.9, 1556.6, 1456.2, 1370.5, 1319.9, 1282.4, 1198.0, 1167.1, 1108.0, 1032.1, 1002.9, 842.2, 759.7, 611.1 cm⁻¹.

1.5.11. Etil 4-(4-cianofenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (183):



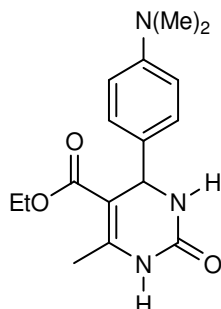
P.F. 218-221°C; **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.07 (t, 3H, *J* 7.1 Hz, Me), 2.25 (s, 3H, CH₃), 3.97 (q, 2H, *J*=7.1 Hz CH₂O), 5.21 (s, 1H, C-4H), 7.42 (d, 2H, *J* = 8.1Hz), 7.80 (d, 2H, *J* = 8.1Hz), 7.88 (s, 1H, NH), 9.33 (s, 1H, NH) ; **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.5, 18.3, 54.3, 59.8, 98.7, 110.5, 119.2, 127.8, 133.0, 149.8, 150.5, 152.3, 165.6. **IV** (ATR) 3298.6, 2979.6, 2229.7, 1699.9, 1651.9, 1543.5, 1384.9, 1362.8, 1250.9, 1199.6, 1074.9, 1018.9, 934.7, 825.0, 756.1 cm⁻¹.

1.5.11.1. Etil 4-(4-(dimetilamino)fenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (184):



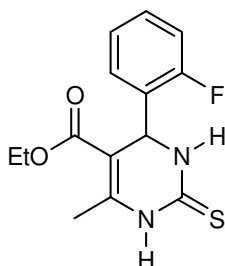
P.F. 206-208°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.85 (s, 6H, N(CH₃)₂), 3.97 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.04 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, CH), 6.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2xCHarom.), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2xCHarom), 9.55 (br s, 1H, NH), 10.24 (br s, 1H, NH). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.1, 17.1, 40.1, 53.5, 59.5, 101.3, 112.2, 127.1, 131.2, 144.3, 150.0, 165.3, 173.8. **IV** (ATR) 3322.4, 3168.7, 2981.7, 1665.8, 1575.8, 1522.9, 1461.7, 1364.3, 1327.1, 1284.4, 1182.1, 1116.0, 1023.3, 804.5, 754.7, 649.9 cm⁻¹.

1.5.12. Etil 4-(4-(dimetilamino)fenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (195):



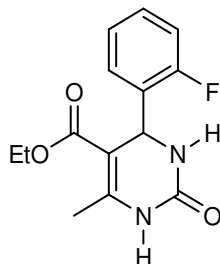
P.F. 257-259°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.05 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.84 (s, 6H, N(CH₃)₂), 3.95 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.03 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2xCH_{arom.}), 7.04 (d, *J* = 8.5, 2H, 2xCH_{arom.}), 7.59 (br s, 1H, NH), 9.09 (br s, 1H, NH). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.2, 17.7, 40.2, 53.3, 59.1, 99.9, 112.2, 126.9, 132.7, 147.6, 149.8, 152.3, 165.5. **IV** (ATR) 3240.9, 3114.7, 2972.9, 1719.2, 1699.9, 1647.2, 1525.9, 1456.2, 1365.2, 1289.8, 1219.4, 1087.6, 1046.8, 879.5, 784.2, 659.0 cm⁻¹.

1.5.13. Etil 4-(2-fluorofenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (211):



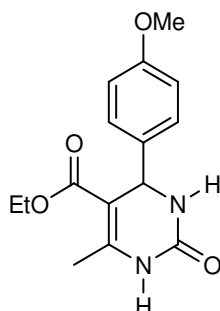
P.F. 140-143°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.03 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 3.93 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz CH₂O), 5.45 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, CH), 7.13-7.34 (m, 4H, arom.), 9.59 (s, 1H, NH), 10.37 (s, 1H, NH); **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14.5, 17.8, 49.4, 60.2, 100.0, 116.1, 116.4, 125.3, 129.9, 130.5, 131.27, 146.1, 165.5, 174.7. **IV** (ATR) 3184.0, 3007.4, 1715.6, 1652.7, 1583.5, 1478.8, 1380.3, 1317.7, 1264.2, 1185.2, 1102.3, 846.4, 760.2, 744.4, 646.2 cm⁻¹.

1.5.14. Etil 4-(2-fluorofenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (215):



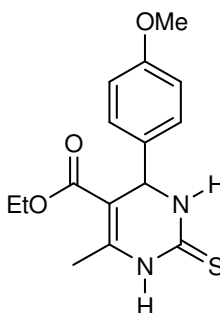
P.F. 235-237°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1.20 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 4.07 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz CH₂O), 5.62 (s, 1H, CH), 7.28-7.48 (m, 4H, arom.), 7.87 (s, 1H, NH), 9.43 (s, 1H, NH) ; **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 13.8, 17.5, 54.5, 61.1, 115.2, 122.4, 124.0, 127.8, 129.3, 135.8, 154.7, 157.2, 158.3, 160.3. **IV** (ATR) 3228.9, 3158.2, 2973.3, 1747.4, 1699.3, 1616.2, 1538.9, 1436.5, 1384.6, 1319.2, 1228.7, 1198.6, 1143.8, 1075.3, 932.6, 754.6 cm⁻¹.

1.5.15. Etil 4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (189):



P.F. 198-200°C. **IV** (ATR): 3248.5, 3116.4, 2968.0, 1706.3, 1654.6, 1515.2, 1463.7, 1279.9, 1260.4, 1225.1, 1183.8, 1088.3, 1032.7, 785.9.

1.5.16. Etil 4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (169):

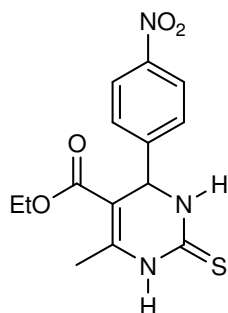


P.F. 151-154°C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1,10 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); 2,28 (s, 3H); 3,71 (s, 3H, OMe); 4,00 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H); 5,11 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H); 6,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 2Har);

7,12 (d, J = 8,5 Hz, 2Har); 9,61 (brs, 1H, NH); 10,30 (s, 1H, NH) **IV** (ATR) 3310.0, 3166.7, 2982.2, 1664.1, 1609.2, 1573.2, 1508.0, 1461.7, 1371.4, 1330.5, 1283.5, 1251.6, 1194.1, 1169.5, 1120.5, 1026.2, 818.2, 764.9 cm⁻¹.

1.5.17. Etil 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato

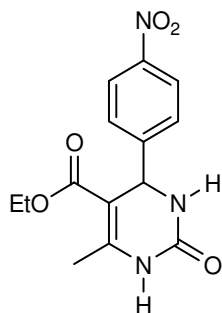
(171):



P.F. 107-110°C; **IV** (ATR) 3161.1, 2974.8, 1706.2, 1658.3, 1561.6, 1498.5, 1471.7, 1370.8, 1339.8, 1284.6, 1196.1, 1127.5, 1081.8, 762.0 cm⁻¹.

1.5.18. Etil 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato

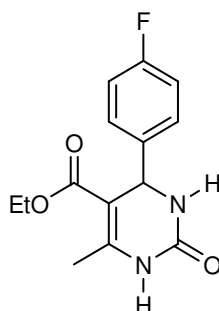
(217):



P.F. 210–212°C; **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1,11 (t, J = 7,1 Hz, 3H); 2,29 (s, 3H); 4,01 (q, J = 7,0 Hz, 2H); 5,30 (d, J = 3,1 Hz, 1H); 7,53 (d, J = 8,6 Hz, 2Har); 7,92 (s, 1H, NH); 8,23 (d, J = 8,7 Hz, 2Har); 9,39 (s, 1H, NH); **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 14,1; 17,9; 53,7; 59,4; 98,2; 123,9; 127,7; 146,7; 149,4; 151,8; 152,0; 165,1

1.5.19. Etil 4-(4-fluorofenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato

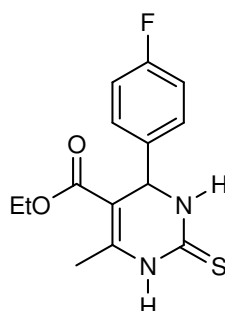
(194):



P.F. 182-184°C; **IV** (ATR) 3184.0, 3047.4, 1715.5, 1654.8, 1583.9, 1438.5, 1384.1, 1322.7, 1271.6, 1182.0, 1102.3, 848.8, 763.2, 749.5, 646.4 cm⁻¹.

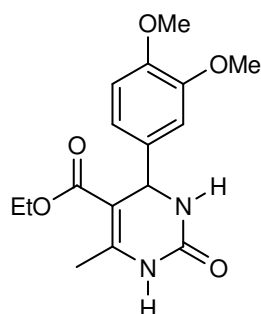
1.5.20. Etil 4-(4-fluorofenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato

(173):



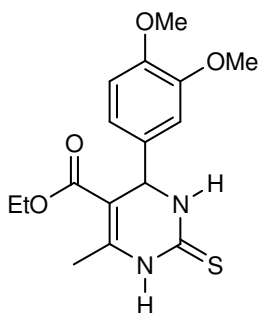
P.F. 146-150°C; **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 1,08 (t, J = 6,8 Hz, 3H); 2,29 (s, 3H); 3,99 (q, J = 6,6 Hz, 2H); 5,17 (d, J = 3,2 Hz, 1H); 7,14-7,27 (m, 4H, Ar); 9,67 (s, 1H, NH); 10,37 (s, 1H, NH).

1.5.21. Etil 4-(3,4-dimetoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (196):



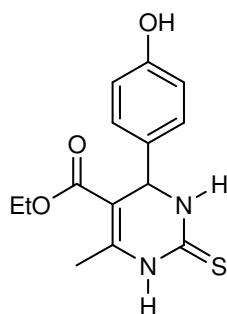
P.F. 179-180°C. **IV** (ATR) 3149.8, 3097.3, 2956.4, 2877.6, 1706.7, 1654.0, 1593.1, 1523.4, 1452.8, 1283.1, 1258.9, 1225.5, 1137.0, 1089.4, 1019.4, 789.7, 690.1 cm⁻¹

1.5.22. Etil 4-(3,4-dimetoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (197):



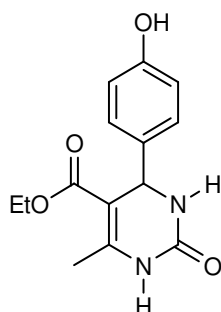
P.F. 213-216°C. **IV** (ATR) 3234.7, 3084.4, 2949.4, 2892.8, 1692.5, 1633.4, 1580.7, 1523.5, 1458.0, 1368.1, 1287.6, 1283.2, 1183.1, 1004.4, 753.7 cm⁻¹

1.5.23. Etil 4-(4-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (199):



P.F. 202-206°C. **IV** (ATR) 3434.8, 3079.7, 2950.4, 1684.5, 1628.9, 1573.1, 1515.0, 1449.9, 1360.1, 1283.4, 1274.5, 1170.3, 1013.0, 769.9 cm⁻¹

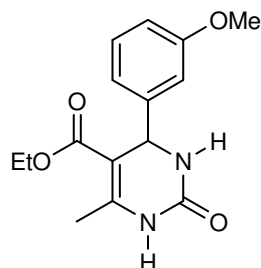
1.5.24. Etil 4-(4-hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (198):



P.F. 232-234 °C. **IV** (ATR) 3412.3, 3192.3, 3124.7, 2980.9, 1697.1, 1681.4, 1615.8, 1598.7, 1519.0, 1463.6, 1383.2, 1317.8, 1296.4, 1228.5, 1137.1, 1093.4, 1022.1, 823.0, 798.9, 752.1 cm⁻¹.

1.5.25. Etil 4-(3-metoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato

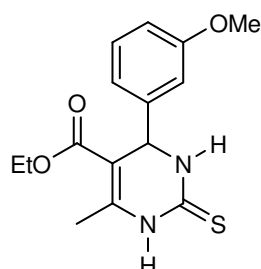
(216):



P.F. 207-210 °C. **IV** (ATR) 3243.5, 3095.4, 2960.3, 1732.4, 1692.3 1654.6, 1525.2, 1464.6, 1281.3, 1266.4, 1230.1, 1173.8, 1086.3, 934.8, 785.9 cm^{-1} .

1.5.26. Etil 4-(3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato

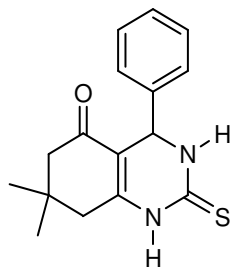
(212):



P.F. 151-153 °C. **IV** (ATR) 3203.5, 3122.7, 2986.2, 1699.4, 1651.1, 1596.7, 1570.0, 1518.3, 1461.7, 1377.4, 1333.5, 1284.5, 1258.6, 1194.8, 1169.5, 1120.5, 1026.2, 818.2, 764.9 cm^{-1} .

1.5.27. Síntese da 7,7-dimetil-4-fenil-2-tioxo-1,2,3,4,7,8-hexaidroquinazolin-5(6H)-ona (219) promovida pelo sistema ác. Cítrico/TEOF:

Uma mistura da dimedona (2.5 mmol, 350,5 mg), benzaldeído (2.5 mmol, 265.3 mg), tiourea (5.0 mmol, 380.7 mg, 2.0 equiv) e ácido cítrico (0.25 mmol, 48 mg, 10mol%) junto com TEOF (5.0 mmol, 741 mg, 2 equiv) foi adicionada em um balão de 50 mL e e agitada sob aquecimento em um banho de óleo pré-aquecido (100°C) por 1h. Após, foi adicionado água à mistura reacional, agitado pelo tempo apropriado e resfriado em um banho de gelo. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água gelada e seco sob vácuo.

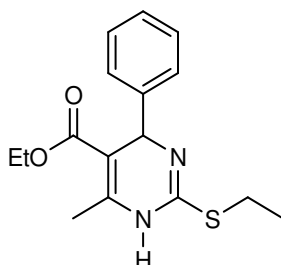


P.F. >250 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 0,88 (s, 3H, Me); 1,02 (s, 3H, Me); 2,03-2,42 (m, 2xCH₂, 4H); 5,17 (s, 1H, CH); 7,23-7,33 (m, 5H, Ar); 9,70 (s, 1H, NH); 10,60 (s, 1H, NH). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 26,8; 28,8; 49,8; 52,2; 108,1; 126,4; 127,6; 128,5; 143,4; 148,7; 174,6; 193,7

1.5.28. Protocolo geral para síntese das S-alquil-diidropirimidinas:

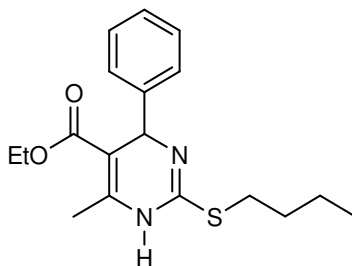
O composto **167** foi solubilizado em THF, MeCN, Acetona, ou EtOH com posterior adição de 1,5 ou 2,0 equiv. de Na₂CO₃, K₂CO₃, Et₃N ou KI e Brometo de benzila, brometo de butila, brometo de etila, iodeto de etila, 3-bromopropilamina ou epiclorigrina como agente alquilante nas proporções de 1,2-2,0 equiv. As reações foram conduzidas em t.a., 70°C ou refluxo durante 2-72h. Ao final o bruto reacional foi resfriado e vertido em um banho com água e gelo picado. As reações sem base, somente com a presença do KI, foram adicionalmente tratadas com Piridina ou trietilamina (1,1 equiv.) por 20 min antes de serem vertidas no banho de gelo. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água gelada e seco sob vácuo. Os produtos foram recristalizados de MeOH, ou purificados através de cromatografia preparativa em coluna de sílica.

1.5.29. Etil 2-(etiltio)-6-metil-4-fenil-1,4-diidropirimidina-5-carboxilato (**222**):



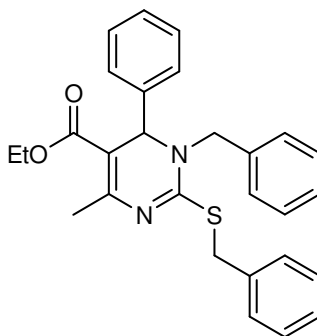
P.F. 115-119 °C. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ 1,17-1,26 (m, 6H, 2xCH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 2,88-3,00 (m, 1H, CH₂), 3,07-3,18 (m, 1H, CH₂), 4,09 (q, 2H, *J*=7.1 Hz CH₂O), 5,63 (s, 1H, CH), 7,19-7,35 (m, 5H, arom.). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃) δ 14,2, 14,6, 19,9, 25,5, 29,6, 57,9, 59,8, 126,9, 127,3, 128,3, 144,4, 164,7, 166,7

1.5.30. Etil 2-(butiltio)-6-metil-4-fenil-1,4-diidropirimidina-5-carboxilato (223):



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0,78 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃), 1,14 (t, J = 6,9 Hz, 3H, CH₃), 1,23-1,30 (m, 1H, CH₂), 1,40-1,48 (m, 1H, CH₂), 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.79-2.85 (m, 1H, CH₂), 2,92-2,98 (m, 1H, CH₂), 3.99 (q, 2H, J = 7.0 Hz CH₂O), 5.50 (s, 1H, CH), 7.20-7.30 (m, 5H, arom.), 9,56 (s, 1H, NH).

1.5.31. Etil 1-benzil-2-(benziltio)-4-metil-6-fenil-1,6-diidropirimidina-5-carboxilato (221):



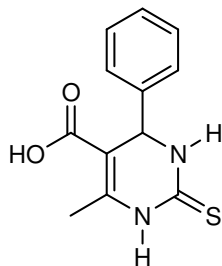
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1,05 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 3.90-3.95 (m, 2H, CH₂), 4,16 (d, J = 16,3 Hz, 1H, CH₂), 4.42 (q, 2H, J = 15.5 Hz CH₂), 4,84 (d, J = 16,3 Hz, 1H, CH₂), 5.18 (s, 1H, CH), 7.18-7.39 (m, 15H, arom.),

1.5.32. Protocolo geral para hidrólise das DHPMs:

O composto **167** foi solubilizado em EtOH, MeOH, THF, AcOEt, MeCN ou Dioxano, com posterior adição de NaOH 0,5M ou KOH 0,5M ou KOHalcoólico 10% na proporção de 2-10 equiv. As reações foram conduzidas em t.a. ou refluxo em tempos que variaram de 2-72h. Ao final, o meio reacional foi resfriado e foi adicionado 5mL de NaOH_{aq.} 0,5M. A solução aquosa resultante foi extraída com Et₂O (5x5mL), acidificada e extraída com acetato de etila (3x10 mL). A fase orgânica foi tratada com 5mL de Brine (sol. NaCl_{sat.}), seca sob NaSO₄, filtrada e evaporada à pressão reduzida. Quando necessário o produto obtido foi cristalizado e lavado com Et₂O*.

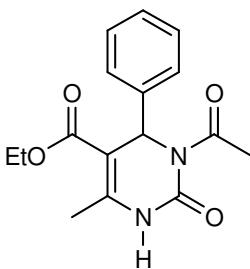
* Alternativamente, nas reações sem a presença de meio aquoso, ao bruto reacional em dioxano foram adicionados 10mL de Et₂O e a fase orgânica foi extraída com 5x15mL de uma solução NaOH_{aq.} 0,1M. A fase aquosa básica foi posteriormente acidificada com uma

1.5.33. 6-metil-4-fenil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-ácido carboxílico (225):



P.F. 200-205°C (decomposição) **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 2.29 (s, 3H, CH₃), 5.16 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H, CH), 7.22-7,37 (m, 5H, arom.), 9.61 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, N₃-H), 10.26 (s, 1H, N₁-H).

1.5.34. Protocolo para síntese de Etil 1-acetil-4metil-2-oxo-6-fenil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato (236):

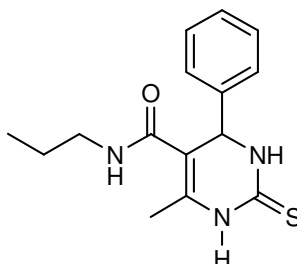


O composto **222** (300mg, 0,98 mmol) foi solubilizado em excesso de anidrido acético (5 mL) e refluxada por 2h. Ao final foi adicionado HCl 0,1M e agitado, mantida à 4°C overnight para precipitação do produto. O precipitado branco resultante foi filtrado, lavado com água gelada e seco em estufa a vácuo (rendimento de 27%, 83 mg).

P.F. 167-169°C. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃) 2.57 (s, 3H, CH₃), 4.18 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂), 6.64 (s, 1H, CH), 7.26-7.34 (m, 5H, arom.), 8.21 (br s, 1H, NH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃) δ 14.2, 17.7, 26.6, 53.4, 60.5, 105.6, 126.8, 128.0, 128.5, 139.8, 145.3, 152.4, 165.0, 171.4.

solução de HCl_{aq.} 3M e extraída com 5x15mL de AcOEt. A fase orgânica foi então tratada com 5mL de Brine (sol. NaCl_{sat.}), seca sob NaSO₄, filtrada e evaporada à pressão reduzida. Quando necessário o produto obtido foi cristalizado e lavado com Et₂O.

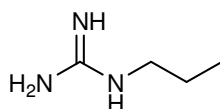
1.5.35. Protocolo para síntese de 6-metil-4-fenil-N-propil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxamida (241):



Em um erlenmeyer, sob atmosfera inerte, foi adicionado o ácido 225 (1,0 mmol, 250 mg), 8 mL de THF_{seco} e DCC (2 equiv., 2,0 mmol, 412,6 mg). Estes foram agitados à temperatura ambiente por 0,5 h e então foi adicionada propilamina (3 equiv. , 3,0 mmol, 0,13 mL). A reação foi conduzida por 48h em um shaker com agitação constante. Ao final, o sólido presente no meio reacional foi filtrado e lavado com THF. O filtrado foi evaporado à pressão reduzida e o semi-sólido amarelo resultante foi recristalizado de EtOH (189,1 mg, 62% rendimento).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 0,71 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,32 (m, 2H, CH₂), 2,00 (s, 3H, CH₃), 2,92-3,02 (m, 2H, CH₂), 5,26 (d, J = 2,9 Hz, 1H, CH), 7,19-7,36 (m, 5H, arom.), 7,76 (t, J = 5,6 Hz, 1H, NH), 9,30 (s, 1H, NH), 9,81 (s, 1H, NH). **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 12,0, 17,0, 22,9, 41,2, 55,7, 107,9, 127,1, 128,3, 129,2, 134,7, 143,7, 166,6, 174,7.

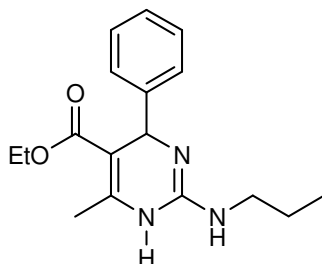
1.5.36. Protocolo geral para síntese da 1-propilguanidina, 247:



Em uma ampola foram adicionados tiouréia (1 eq.) e a propilamina (5 equiv.). Estes foram mantidos em contato com agitação por 1h a 45°C e após adicionado HgCl₂ (1 equiv.). A mistura reacional foi agitada por 40 min a 45°C. Ao final foi adicionado EtOH ao bruto reacional e este foi filtrado através de uma camada de sílica, lavado com EtOH até o filtrado perder coloração. A mistura foi evaporada em evaporador rotatório à secura, obtendo-se cristais incolores higroscópicos (38% rendimento).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 0,89 (t., 3H, J = 7,5 Hz), 1,57 (m, J = 7,5Hz, 2H), 2,68 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 8,20 (sl, 3H); **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 11,0; 20,4, 39,5

1.5.37. Protocolo geral para a síntese da Etil 4-metil-6-fenil-2-(propilamino)-1,6-diidropirimidina-5-carboxilato (**250**):



Em uma ampola foram adicionados o composto **222** (1 equiv., 0,59 mmol, 179,5 mg), propilamina (10 equiv., 5,9 mmol, 0,48 mL), Et₃N (5 equiv., 2,95 mmol, 0,41 mL), HgCl₂ (1 equiv., 0,59 mmol, 160 mg) e metanol (5 mL). A mistura reacional foi agitada na temperatura de 50°C por 72h. Ao final o meio reacional foi filtrado e lavado com MeOH. O filtrado foi evaporado em evaporador rotatório à secura, e o óleo obtido foi cristalizado com acetona (51% de rendimento).

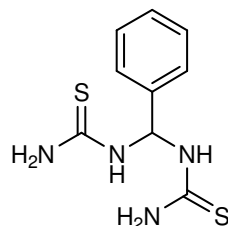
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 0,85 (t, 3H, J = 7,3 Hz), 1,12 (t, J = 7,0Hz, 3H), 1,46 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 4,50 (q, J = 6,9 Hz, 2 H), 5,42 (s, 1H), 7,30-7,39 (m, 5H), 8,66 (br s, 1H);
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 10.8, 14.0, 17.7, 21.8, 42.8, 51.9, 60.0, 81.6, 126.5, 128.1, 128.7, 141.9, 150.0

1.5.38. Protocolo geral para a análise mecanística:

Em um balão foram adicionados o acetoacetato de etila (1 equiv.) e o benzaldeído (1 equiv.) (**reação do caminho I**), ou acetoacetato de etila (1 equiv.) e tiouréia (1 equiv.) (**reação do caminho II**), ou o benzaldeído (1 equiv.) e a tiouréia ou uréia (2 equiv.) (**reação do caminho III**). Também foi adicionado ácido cítrico (0,1 equiv.) e TEOF (1 equiv.) (**caminhos I, II e III**). Os componentes foram agitados em um banho pré-aquecido a 100°C por 2h. Ao final deste tempo, somente a reação do **caminho III** apresentava consumo dos reagentes iniciais, e esta foi tratada adicionando-se tolueno ao meio reacional. O precipitado formado foi filtrado, lavado com tolueno e DCM e seco em dessecador resultando em um sólido branco (**204a** e **204b**).

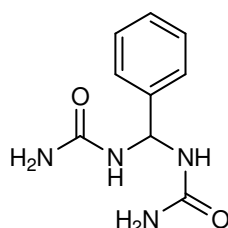
As estruturas dos compostos **204a** e **204b** são apresentadas a seguir.

1,1'-(fenilmetileno)ditiouréia (204a)



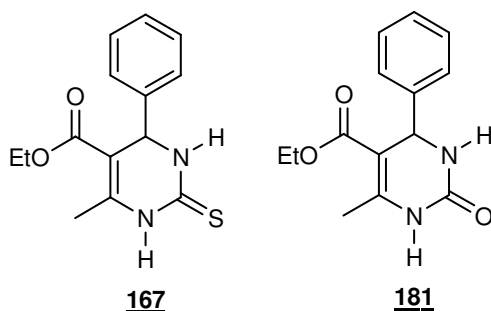
P.F. 213-215°C. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d^6) δ 64.7, 125.9, 128.9, 129.1, 139.7, 173.4, 183.8

1,1'-(fenilmetileno)diuréia (204b)



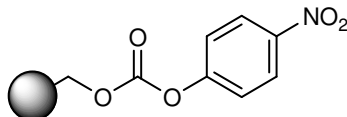
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d^6) δ 59.1, 126.0, 127.0, 128.1, 142.6, 157.7, 159.7

Os intermediários **204a** e **204b** (1 equiv.) foram colocados em um balão juntamente com o acetoacetato de etila (1 equiv.), ácido cítrico (0,1 equiv.) e TEOF (1 equiv.). A mistura reacional foi colocada em um banho de óleo pré-aquecido a 100°C e solidificou totalmente em 10 min. O precipitado branco formado foi tratado com água, resfriado e filtrado, sendo lavado diversas vezes com água gelada. O produto foi seco em estufa a vácuo gerando as DHPMs **167** (para reação com **204a**) e **181** para a reação com **204b**. A caracterização destes compostos foi apresentada nos itens 4.4 (**167**) e 4.5. (**181**)



1.5.39. Procedimento para as reações em fase sólida:

1.5.39.1. Construção do 4-nitrofenil carbonato ligado à resina Wang (260):



1 g de resina Wang (255) (0,65 mmol; loading 0,65 mmol/g) foram colocados em um erlenmeyer, juntamente com piridina (1,5 eq, 0,975 mmol, 125 μ L) e 8 mL de DCM seco e deixados sob atmosfera inerte por aproximadamente 10 min. Depois foram adicionados 3 eq. de *p*-nitrofenilcloroformato (1,95 mmol, 589,5 mg) em solução com DCM seco, gota-a-gota, em banho de gelo, sob atmosfera inerte. Após completa a adição, a mistura reacional foi levada à temperatura ambiente e agitada em shaker por 45 min. A resina foi filtrada, submetida ao coquetel de lavagem DCM (3x5mL), EtOH (3x5mL) e éter etílico (3x5mL) e seca em estufa a vácuo.

IV (cm^{-1}): 1762, 1527, 1346, 860.

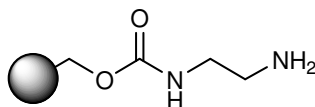
1.5.39.2. Formação das resinas diaminadas (261-264):

A resina 260 (1eq., 200 mg) foi adicionada em um erlenmeyer juntamente com DCM seco. Após 10 min., 10 eq. (1,3 mmol, aprox. 0,1 mL) da diamina correspondente foi adicionada de uma vez só ao meio reacional (1,4-diaminobutano 253, 1,3-propanodiamina 256, 1,2-etilenodiamina 257 e piperazina 258). A adição da amina gerou uma coloração amarelada no meio reacional, indicando o deslocamento do *p*-nitro fenolato. Após a adição da diamina o erlenmeyer foi agitado durante 2h à temperatura ambiente. A resina foi filtrada do meio reacional em um funil sinterizado, submetida ao coquetel de lavagem e seca em estufa a vácuo.

Coquetel de lavagem: DCM (2x10mL), THF (2x10mL), THF 1:1 H₂O (2x10mL), H₂O (2x10mL), THF (2x10mL), e Et₂O (2x10mL).

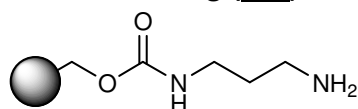
As estruturas e caracterização das resinas 261-264 são apresentadas a seguir:

2-aminoetilcarbamato ligado à resina Wang (261):



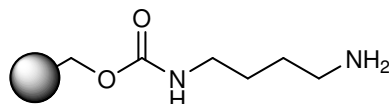
IV (cm^{-1}): 1710

3-aminopropilcarbamato ligado à resina Wang (262):



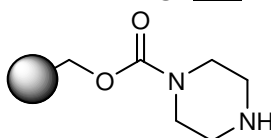
IV (cm⁻¹): 1710

4-aminobutilcarbamato ligado à resina Wang (263):



IV (cm⁻¹): 1710

piperazina-1-carboxilato ligado à resina Wang (264):



IV (cm⁻¹): 1698

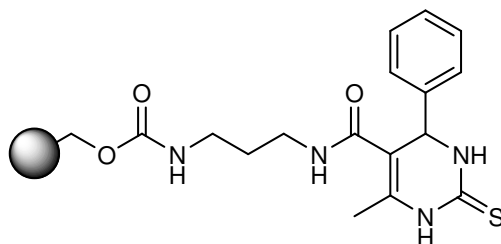
1.5.39.3. Acoplamento da DHPM 225 à resina:

As resinas **261-264** (1eq.) foram adicionadas em um erlenmeyer juntamente com DCM seco. Após 10 min., a DHPM **225** foi adicionada ao meio reacional na proporção 2-3 equiv. juntamente com os agentes de acoplamento DCC ou DIC e DMAP (2-5 e 0,1-0,2 equiv., respectivamente). O erlenmeyer foi agitado durante 48-145h à temperatura ambiente, até o teste de Kaiser ser negativo. Ao final, a resina foi filtrada do meio reacional em um funil sinterizado, submetida ao coquetel de lavagem e seca em estufa a vácuo.

Coquetel de lavagem: DCM (2x10mL), THF (2x10mL), THF 1:1 H₂O (2x10mL), H₂O (2x10mL), EtOH (2x10mL), e Et₂O (2x10mL).

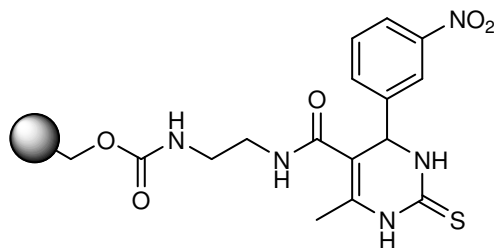
As estruturas e caracterização das resinas **265-270** são apresentadas a seguir:

3-(6-metil)-4-fenil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxamido)propilcarbamato ligado à resina Wang (265):



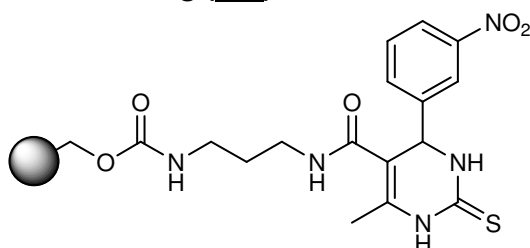
IV (cm⁻¹): 1707, 1669.0, 1194

2-(6-metil)-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxamido etilcarbamato ligado à resina Wang (267):



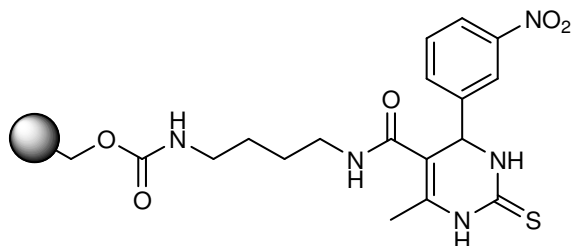
IV (cm^{-1}): 1713.6, 1657, 1530, 1341, 1193

3-(6-metil)-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxamido propilcarbamato ligado à resina Wang (268):



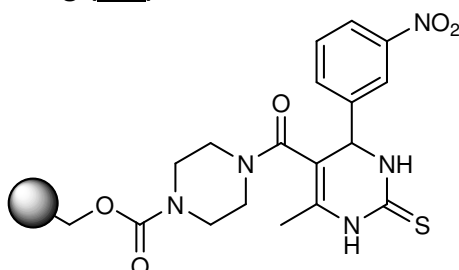
IV (cm^{-1}): 1710, 1668, 1532, 1341, 1189

4-(6-metil)-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxamido butilcarbamato ligado à resina Wang (269):



IV (cm^{-1}): 1706, 1654, 1530, 1343, 1185

4-(6-metil)-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carbonil)piperazina-1-carbamato ligado à resina Wang (270):



IV (cm^{-1}): 1709, 1657, 1531, 1343, 1187

1.5.39.4. **Protocolo para a clivagem ácida das resinas 265-270:**

As resinas 265-270 foram adicionadas em um erlenmeyer juntamente com DCM por 10 min., após foi adicionado 1/3 de TFA e agitado por 2h à temperatura ambiente quando a resina foi filtrada em funil sinterizado e lavada com o coquetel: DCM (5x10mL), EtOH (10x10mL), DCM (2x10mL), e Et₂O (2x10mL). O filtrado foi evaporado à secura obtendo-se o bruto na forma de óleo (amarelo-avermelhado) que foi tratado com NaOH_{aq.} 0,1M. O produto foi extraído com AcOEt e a fase orgânica foi tratada com Brine, Na₂SO₄, filtrada e evaporada à secura. Tentativas de purificação por coluna cromatográfica não foram bem sucedidas devido a pouca quantidade isolada.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Multicomponent Reactions*; Zhu, J., Bienaymé, H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005
2. Armstrong, R. W.; Combs, A.P.; Tempest, P.A.; Brown, S. D.; Keati, T. A. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 123
3. Strecker, S. *Liebigs Ann. Chem.* **1850**, 27
4. Hantzsch, A. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1882**, 215, 1
5. Biginelli, P. *Gazz. Chim. Ital.* **1893**, *23*, 360
6. Mannich, C.; Krosche, W. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1912**, *250*, 647
7. Passerini, M. *Gazz. Chim. Ital.* **1921**, *51*, 126
8. Bucherer, H. T.; Fischback, H. T. *J. Prakt. Chem.* **1934**, *140*, 24
9. Khand, I.U.; Knox, G. R.; Pauson, P. L.; Watts, W. E.; Foreman, M. I. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1973**, *9*, 977
10. Domling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168
11. Chem. Abstr., 70: 96641d, 1969
12. Rossen, K.; Pye, P. J.; DiMichele, L. M.; Volante, R. P.; Reider, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6823
13. Dömling, A. *Comb. Chem. HighThroughputScreen.* **1998**, *1*, 1
14. Ugi, I.; Steinbrückner, C. *Patent DE-B 1103337*, 1959
15. Ahmed, N.; van Lier, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5407
16. Fu, N. Y.; Yuan, Y. F.; Cao, Z.; Wang, S. W.; Wang, J. T.; Peppe, C. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4801
17. Kalita, H. R.; Phukan, P. *Catal. Commun.* **2007**, *8*, 179
18. Sabitha, G.; Reddy, G. S. K. K.; Reddvand, K. B.; Yadav, J. S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6497
19. Reddy, C. V.; Mahesh, M.; Raju, P. V. K.; Babu, T. R.; Reddy, V. V. N. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2657
20. Godoi, M. N.; Costenaro, H. S.; Kramer, E.; Machado, P. S.; D'Oca, M. G. M. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 1010
20. Ma, Y.; Qian, C.; Wang, L.; Yang, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3864
21. Suzuki, I.; Suzumura, Y.; Takeda, K. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7861
22. Bose, D. S.; Fatima, L.; Mereyala, H. B. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 587
23. Russowsky, D.; Lopes, F. A.; Silva, V. S. S.; Canto, K. F. S.; D'Oca, M. G. M.; Godoi, M. N. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 165
24. Hassani, Z.; Islami, M. R.; Kalantari, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4479
25. Bose, A. K.; Manhas, M. S.; Pednekar, S.; Dang, H.; He, W.; Mandadi, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1901

26. Debache, A.; Boumoud, B.; Amimour, M.; Belfaitah, A.; Rhouati, S.; Carboni, B.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5697
27. Tu, S.; Fang, F.; Miao, C.; Jiang, H.; Feng, Y.; Shi, D.; Wang, X. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 6153
28. Chen, W. Y.; Qin, S.; Jin, J. R. *Catal. Comm.* **2007**, 8, 123
29. Maradur, S. P.; Gokavi, G. S. *Catal. Comm.* **2007**, 8, 279
30. Maiti, G.; Kundu, P.; Guin, C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2757
31. Jain, S. L.; Singhal, S.; Sain, B. *Green Chem.* **2007**, 9, 740
32. Bhosale, R. S.; Bhosale, S. V.; Bhosale, S. V.; Wang, T.; Zubaidha, P. K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 9111
33. Chen, X. H.; Xu, X. Y.; Liu, H.; Cun, L. F.; Gong, L. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14802
34. Kappe, C. O.; Falsone, S. F. *Synlett* **1998**, 718
35. Zhu, Y.; Pan, Y.; Huang, S. *Synth. Comm.* **2004**, 34, 3167
36. Sabitha, G.; Reddy, G. S. K. K.; Reddy, C. S.; Yadav, J. S. *Synlett* **2003**, 858
37. Zumpe, F. L.; Flüß, M.; Schmitz, K.; Lender, A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1421
38. Kappe, C. O. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7201
39. Li, J.-T.; Han, J.-F.; Yang, J.-H.; Li, T.-S. *Ultrasonics Sonochem.* **2003**, 10, 119
40. Reddy, A. V.; Reddy, V. L. N.; Ravinder, K.; Venkateswarlu, Y. *Heterocycl. Commun.* **2002**, 8, 459
41. Kappe, C. O.; Kumar, D.; Varma, R. S. *Synthesis* **1999**, 1799
42. Tu, S. J.; Zhou, J. F.; Cai, P. J.; Wang, H.; Feng, J. C. *Synth. Commun.* **2002**, 32, 147
43. Kidawi, M.; Saxena, S.; Mohan, R.; Venkataramanan, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1845
44. O'Reilly, B. C.; Atwal, K. S. *Heterocycles* **1987**, 26, 1185
45. Atwal, K. S.; O'Reilly, B. C.; Gougoutas, J. Z.; Malley, M. F. *Heterocycles* **1987**, 26, 1189
46. Atwal, K. S.; Rovnyak, G. C.; O'Reilly, B. C.; Schwartz, J. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5898
47. Bakibaev, A. A.; Filimonov, V. D. *Russ. J. Org. Chem.* **1991**, 27, 854
48. Shutalev, A. D.; Kishko, E. A.; Sivova, N. V.; Kuznetsov, A. Y. *Molecules* **1998**, 3, 100
49. Abdel-Fattah, A. A. A. *Synthesis* **2003**, 2358
50. Taguchi, H.; Yazawa, H.; Arnett, J. F.; Kishi, Y. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 627; Kishi, Y. *Heterocycles* **1980**, 14, 1477
51. Elliott, M. C.; Kruiswijk, E. *Chem. Commun.* **1997**, 2311; Elliott, M. C.; Kruiswijk, E.; Willock, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8911; Elliott, M. C.; Monk, A. E.; Kruiswijk, E.; Hibbs, D. E.; Jenkins, R. L.; Jones, D. V. *Synlett* **1999**, 1379; Elliott, M. C.; Kruiswijk, E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 3157; Elliott, M. C.; Kruiswijk, E.; Willock, D. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 57, 10139; Elliott, M. C.; Long, M. S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 9191

52. Kappe, C. O. *Tetrahedron* **1993**, 49, 6937
53. Sweet, F.; Fissekis, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 8741
54. Folkers, K.; Johnson, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 3784; Folkers, K.; Johnson, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, 54, 3751
55. Valverde, M. G.; Dallinger, D.; Kappe, C. O. *Synlett* **2001**, 741
56. Kolosov, M. A.; Orlov, V. D.; Beloborodov, D. A.; Dotsenko, V. V. *Mol. Divers.* **2009**, 13, 5
57. Russowsky, D.; Lopes, F. A.; D'oca, M. G. M.; Pilli, R. A.; Sabino, A.; Eberlin, M. N. Ureidoiminium ion: the key intermediate in the multicomponent Biginelli reaction. In: 11 Brazilian Meeting in Organic Synthesis, Abstracts, Canela-RS, 2005
58. Sabino, A.; Russowsky, D.; Lopes, F. A.; D'oca, M. G. M.; Eberlin, M. N.; Pilli, R. A. O Íon Ureído-imínio: Um Intermediário Chave na Reação de Biginelli. In: I Congresso da BrMASS, 2005, Campinas. Livro de Resumos, 2005
59. Souza, R. O. M. A.; Penha, E. T.; Milagre, H. M. S.; Garden, S. J.; Esteves, P. M.; Eberlin, M. N.; Antunes, O. A. C. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9799
60. Hu, E. H.; Sidler, D. R.; Dolling, U.-H. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3454
61. Saloutin, V. I.; Burgat, Y. V.; Kuzueva, O. G.; Kappe, C. O.; Chupakhin, O. N. *J. Fluorine Chem.* **2000**, 103, 17
62. Capanec, I.; Litvic, M.; Filipan-Litvic, M.; Grüngold, I. *Tetrahedron* **2007**, 63, 11822
63. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149
64. Marquardt, M.; Eifler-Lima, V.L. *Quim.Nova*, **2001**, 24, 846
65. Merrifield, R. B. *Nobel Lecture: Solid Phase Synthesis*. Disponível no endereço <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1984/merrifield-lecture.html> acessado em 11/09/2009
66. Gouault, N.; Schwebel, H.; Cupif, J. F.; Eifler-Lima, V. L.; David, M. Preparation of various heterocycles using solid phase organic synthesis.. In: 22 Reunião Anual - Sociedade Brasileira de Química., 1999, Poços de Caldas. 22, 1999. v. 1. p. 1-100.
67. Antonow, D.; Mahler, S. G.; Serra, G. L.; Manta, E.; Eifler-Lima, V. L. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 477
68. Antonow, D.; Graebin, C. S.; Eifler-Lima, V. L. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 5, 782
69. Graebin, C. S.; Eifler-Lima, V. L. *Quim. Nova* **2005**, 28, 73
70. Hermkens, P. H. H.; Ottenheijm, H. C. J.; Rees, D. *Tetrahedron* **1996**, 52, 4527
71. Hermkens, P. H. H.; Ottenheijm, H. C. J.; Rees *Tetrahedron* **1997**, 53, 5643
72. Lacombe, P.; Castagner, B.; Gareau, Y.; Ruel, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6785
73. Bettinetti, L.; Löber, S.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; *J. Comb. Chem.* **2005**, 7, 309
74. Egner, B. J.; Bradley, M. *Drug Discovery Today* **1997**, 3, 102
75. Gordonand, K.; Balasubramanian, S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, 74, 835
76. Dallinger, D.; Stadler, A.; Kappe, C. O. *Pure Appl. Chem.* **2004**, 76, 1017

77. Studer, A.; Hadida, S.; Ferrito, R.; Kim, S.-Y.; Jeger, P.; Wipf, P.; Curran, D. P. *Science* **1997**, 275, 823
78. Studer, A.; Jeger, P.; Wipf, P.; Curran, D. P. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2917
79. Strohmeier, G. A.; Kappe, C. O. *J. Comb. Chem.* **4**, **2002**, 154
80. Kappe, C. O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 49
81. Strohmeier, G. A.; Kappe, C. O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 621
82. George, T.; Tahilramani, R., Metha, D. V. *Synthesis* **1975**, 405
83. Kappe, C. O.; Roschger, P. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, 26, 55
84. Atwal, K. S.; Rovnyak, G. C.; Schwartz, J.; Moreland, S.; Hedberg, A.; Gougoutas, J. Z.; Malley, M. F.; Floyd, D. M. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1510
85. Saudi, M. N. S.; Gaafar, M. R.; El-Azzouni, M. Z.; Ibrahim, M. A.; Eissa, M. M. *Med. Chem. Res.* **2008**, 17, 541
86. Dallinger, D.; Kappe, C. O. *Pure Appl. Chem.* **2005**, 77, 155
87. Prokopcová, H.; Kappe, C. O. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4440
88. Pisani, L.; Prokopcová, H.; Kappe, C. O. *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 415
89. Liebeskind, L. S.; Srogl, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11260; Yu, Y.; Liebeskind, L. S. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 3554; Yang, H.; Li, H.; Wittenberg, R.; Egi, M.; Huang, W.; Liebeskind, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1132
90. Lengar, A.; Kappe, C. O. *Org. Lett.* **2004**, 6, 771
91. Singh, S.; Schober, A.; Gebinoga, M.; Gross, G. A. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1838
92. Dallinger, D.; Gorobets, N. Y.; Kappe, C. O. *Org. Lett.* **2003**, 5, 1205
93. Kappe, C. O.; Uray, G.; Roschger, P.; Lindner, W.; Kratky, C.; Keller, W. *Tetrahedron* **1992**, 48, 5473
94. Legeay, J. C.; Eynden, J. J. V.; Bazureau, J. P. *Tetrahedron* **2008**, 64, 5328
95. Kappe, C. O.; Roschger, P. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, 26, 55
96. Rovnyak, G. C.; Atwal, K. S.; Hedberg, A.; Kimball, S. D.; Moreland, S.; Gougoutas, J. Z.; O'Reilly, B. C.; Schwartz, J.; Malley, M. F. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3254
97. Wang, X.; Quan, Z.; Wang, J.-K.; Zhang, Z.; Wang, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4592
99. Wannberg, J.; Dallinger, D.; Kappe, C. O.; Larhed, M. *J. Comb. Chem.* **2005**, 7, 574
100. Klapars, A.; Huang, X.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7421
101. Brewster, R. Q.; Groening, T. *Organic Syntheses Coll. Vol. 2*, 445
102. Folkers, K.; Johnson, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 2886
103. Desai, B.; Dallinger, D.; Kappe, C. O. *Tetrahedron* **2006**, 62, 4651

104. Klein, E.; DeBonis, S.; Thiede, B.; Skoufias, D. A.; Kozielski, F.; Lebeau, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6474
105. Singh, K.; Singh, S.; Mahajan, A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6114
106. Khanetsky, B.; Dallinger, D.; Kappe, C. O. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 884
106. Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004
107. Kappe, C. O.; Wagner, U. G. *Heterocycles* **1989**, *29*, 761
108. Berlinck, R. G. S. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, 337
109. Levallet, C.; Lerpiniere, J.; Ko, S. Y. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5291; Reddy, N. L.; Fan, W.; Magar, S. S.; Perlman, M. E.; Yost, E.; Zhang, L.; Berlove, D.; Fischer, J. B.; Howie, K. B.; Wolcott, T.; Durant, G. J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3298
110. Manimala, J. C.; Anslyn, E. V. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3909
111. Robinson, R.; Roskamp, E. J. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6697; Ho, K.-C.; Sun, C.-M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1517
112. Josey, J. A.; Tarlton, C. A.; Payne, C. E. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5899; Wilson, L. J.; Klopfenstein, S. R.; Li, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3999
113. Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3888
114. Wang, F.; Hauske, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8651
115. Yong, Y. F.; Kowalski, J. A.; Lipton, M. A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1540
116. Schneider, S. E.; Bishop, P. A.; Salazar, M. A.; Bishop, O. A.; Anslyn, E. V. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15063
117. Kilbrun, J. P.; Lau, J.; Jones, R. C. F. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1739
118. Ramadas, K.; Srinivasan, N. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2841
119. Cunha, S.; Rodrigues, M. T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6955
120. Ube, H.; Uruguchi, D.; Terada, M. *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 545
121. Cho, H.; Shima, K.; Hayashimatsu, M.; Ohnaka, Y.; Mizuno, A.; Takeuchi, Y. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4227
122. Milcent, R.; Malanda, J.-C.; Barbier, G. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, *34*, 329
123. Vanden Eynde, J. J.; Hecq, N.; Kataeva, O.; Kappe, C. O. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1785
124. Nilsson, B. L.; Overman, L. E. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7706
125. Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C. *Quím. Nova* **2003**, *26*, 123
126. Anastas, P. T.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: Oxford, 1998
127. Trost, B. *Science* **1991**, *254*, 1471

128. Martins, M. A. P.; Frizzo, C. P.; Moreira, D. N.; Buriol, L.; Machado, P. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4140
129. Taber, G. P.; Pfistere, D. M.; Colberg, J. C. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, 8, 835
130. Dunn, P. J.; Galvin, S.; Hettenbach, K. *Green Chem.* **2004**, 6, 43
131. Horváth, I. T.; Anastas, P. T. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2167
132. Wipf, P.; Cunningham, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7819
133. Paraskar, A. S.; Dewkar, G. K.; Sudalai, G. K. A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3305
134. Maiti, G.; Kundu, P.; Guin, C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2757
135. Jauk, B.; Pernat, T.; Kappe, C. O. *Molecules* **2000**, 5, 227
136. Bose, D. S.; Fatima, L.; Mereyala, H. B. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 587
137. Peng, J.; Deng, Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5917
138. Russowsky, D.; Benvenuti, E. V.; Roxo, G. S. *Letters in Organic Chemistry* **2007**, 4, 39
139. Khabazzadeh, H.; Saidi, K.; Sheibani, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 278
140. Jain, S. L.; Prasad, V. V. D. N.; Sain, B. *Cat. Comm.* **2008**, 9, 499
141. Singh, V.; Sapehivya, V.; Srivastava, V.; Kaur, S. *Cat. Comm.* **2006**, 7, 571
142. Choudhary, V. R.; Tillu, V. H.; Narkhede, V. S.; Borate, H. B.; Wakharkar, R. D. *Cat. Comm.* **2003**, 4, 449
143. Dondoni, A.; Massi, A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7975
144. Azizian, J.; Mohammadi, A. A.; Karimi, A. R.; Mohammadizadeh, M. R. *Applied Catalysis A: General* **2000**, 300, 85
145. Saxena, I.; Borah, D. C.; Sarma, J. C. *Tetrahedron. Lett.* **2005**, 46, 1159
146. Yu, Y.; Liu, D.; Liu, C.; Luo, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3508
147. Jiang, C.; You, Q. D. *Chinese Chemical Letters* **2007**, 18, 64
148. Shaabani, A.; Bazgir, A.; Teimouri, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 857. b) Stefani, H. A.; Oliveira, C. B.; Almeida, R. B.; Pereira, C. M. P.; Braga, R. C.; Cella, R.; Borges, V. C.; Savegnago, L.; Nogueira, C. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, 41, 513
149. Amini, M. M.; Shaabani, A.; Bazgir, A. *Cat. Comm.* **2006**, 7, 843. b) Mishra, B. G.; Kumar, D.; Rao, V. S. *Cat. Comm.* **2006**, 7, 457
150. Nandurkar, N. S.; Bhanushali, M. J.; Bhor, M. D.; Bhanage, B. M. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2007**, 271, 14.
151. Kamal, A.; Krishnaji, T.; Azhar, M. A. *Cat. Comm.* **2007**, 8, 1929
152. Banik, B. K.; Reddy, A. T.; Datta, A.; Mukhopadhyay, C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 7392
153. Chen, W.; Qin, S.; Jin, J. *Cat. Comm.* **2007**, 8, 123
154. Domínguez, J. C. R.; Bernardi, D.; Kirsch, G. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 5777

155. Adibi, H.; Samimi, H. A.; Beygzadeh, M. *Cat. Comm.* **2007**, 8, 2119
156. Su, W.; Li, J.; Zheng, Z.; Shen, Y. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6037
157. Kwart, H.; Price, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 5123
158. Chen, J.; Fritz, J. S. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2016
159. Anzalone, P. W.; Baru, A. R.; Danielson, E. M.; Hayes, P. D.; Nguyen, M. P.; Panico, A. F.; Smith, R. C.; Mohan, R. S. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2091
160. Look, G. C.; Murphy, M. M.; Campbell, D. A.; Gallop, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2937
161. Clavier, H.; Nolan, S. P. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B* **2007**, 103, 193; Zaki, M. E. A. *Molecules* **1998**, 3, 71
162. Kouwer, P. H. J.; Welch, C. J.; McRobbie, G.; Dodds, B. J.; Priest, L.; Mehl, G. H. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 1798
163. Guccione, S.; Raffaelli, A.; Barretta, G. U.; Scolaro, L. M.; Pucci, S.; Russo, F. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30, 333
164. Ramu, E.; Kotra, V.; Bansal, N.; Varala, R.; Adapa, S. R. *Rasayan J. Org. Chem.* **2008**, 1, 188
165. Sanghetti, J. N.; Sinde, D. B.; Kokare, N. D. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, 45, 1191
166. Cordes, E. H.; Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 832
167. DeWolfe, R. H.; Jensen, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3264
168. Kumar, R.; Mittal, A.; Ramachandran, U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 4613
169. Steele, T. G.; Coburn, C. A.; Patane, M. A.; Bock, M. G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9315
170. Shutalev, A. D.; Aksionov, A. N. *Mendeleev Commun.* **2005**, 15, 73
171. Matloobi, M.; Kappe, C. O. *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 275
172. Eifler-Lima, V.L.; Uriac, P.; Huet, J.; Jenkins, T.C.; Thurston, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 3003.
173. Tomasi, S.; Eifler-Lima, V.L.; Le Roch, M.; Corbel, J.C.; Renault, J.; Uriac, P.; Mens, T.; Catros-Quemener, V.; Moulinoux, J.P. *J. Pharm. Sci.* **1997**, 3, 241
174. Cunha, S.; Costa, M. B.; Napolitano, H. B.; Lariucci, C.; Vencato, I. *Tetrahedron* **2001**, 57, 1671
175. Obase, H.; Nakamizo, N.; Takai, H.; Teranishi, M. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1983**, 56, 3189
176. Lin, P.; Ganesan, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9789
177. Delcros, J. G.; Tomasi, S.; Duhieu, S.; Foucault, M.; Martin, B.; Le Roch, M.; Eifler-Lima, V.; Renault, J.; Uriac, P. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 232
178. Wang, C.; Delcros, J. G.; Cannon, L.; Konate, F.; Carias, H.; Biggerstaff, J.; Gardner, R. A.; Phanstiel, O. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5129
179. Larqué, E.; Sabater-Molina, M.; Zamora, S. *Nutrition*, **2007**, 23, 87
180. Marsh, I R.; Smith, H. K.; LeBlanc, C.; Bradley, M. *Mol. Div.* **1996**, 2, 165

181. Reguera, R. M.; Redondo, C. M.; Pérez-Pertejo, Y.; Balaña-Fouce, R. *Molec. Biochem. Paras.* **2007**, 152, 1
182. Tomasi, S.; Picard, S.; Lainé, C.; Babonneau, V.; Goujeon, A.; Boustie, J.; Uriac, P. *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 11
183. Malabarba, A.; Ciabatti, R.; Kettenring, J.; Scotti, R.; Candiani, G.; Pallanza, R.; Berti, M.; Goldstein, B. P. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4054
184. Tomasi, S.; LeRoch, M.; Renault, J.; Corbel, J. C.; Uriac, P.; Carboni, B.; Moncoq, D.; Martin, B.; Delcros, J. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 635
185. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827
186. Crowley, J. I.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3215
187. Canto, R. F. S. Trabalho de Conclusão de Curso, UFRGS, **2007**
188. Angeles-Beltran, D.; Lomas-Romero, L.; Lara-Corona, V. H.; Gonzales-Zamora, E.; Negron-Silva, G. *Molecules* **2006**, 11, 731
189. Dwivedi, N.; Mishra, R. C.; Tripathi, R. P. *Lett. Org. Chem.* **2005**, 2, 450
190. Sujatha, K.; Shanmugam, P.; Perumal, P. T.; Muralidharan, D.; Rajendran, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4893
191. Kolb, S.; Mondesert, O.; Goddard, M. L.; Jullien, D.; Villoutreix, B. O.; Ducommun, B.; Garbay, C.; Braud, E. *Chem. Med. Chem.* **2009**, 4, 633
192. Ghosh, R.; Maiti, S.; Chakraborty, A. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, 217, 47
193. Karade, H. N.; Sathe, M.; Kaushik, M. P. *Molecules* **2007**, 12, 1341
194. Wu, Y. Y.; Chai, Z.; Liu, X. Y.; Zhao, G.; Wang, S. W. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6, 904
195. Niknam, K.; Daneshvar, N. *Heterocycles* **2007**, 71, 373
196. Attaby, F. A.; Ramla, M. M.; Harukuni, T. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2008**, 183, 2956
197. Gholap, A. R.; Venkatesan, K.; Daniel, T.; Lahoti, R. J.; Srinivasan, K. V. *Green Chem.* **2004**, 6, 147
198. Kapoor, K. K.; Ganai, B. A.; Kumar, S.; Andotra, C. S. *Can. J. Chem.* **2006**, 84, 433
199. Salehi, H.; Guo, Q.-X. *Synth. Commun.* **2004**, 34, 171
200. Shaabani, A.; A. Rahmati *Catalysis Lett.* **2005**, 100, 177
201. Xu, F. Wang, J.-J. Tian, Y.-P. *Synth. Commun.* **2008**, 38, 1299
202. Badaouia, H. E.; Bazia, F.; Sokoria, S.; Boulaajaja, S.; Lazrekb, H. B.; Sebti S. *Lett. Org. Chem.* **2005**, 2, 561
203. Kumar, A.; Maurya, R. A. *J. Mol. Catal. A: Chemical* **2007**, 272, 53
204. Kantevari, S.; Bantu, R.; Nagarapu, L. *Arkivoc* **2006**, xvi, 136

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

2.1. INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico para um grupo de mais de 100 doenças crônicas que podem afetar qualquer parte do corpo. Uma característica que define o câncer é o crescimento de células anormais que podem invadir partes adjacentes do organismo. Estas células também podem espalhar-se para outras partes do corpo em um processo conhecido como metástase. Estas doenças são a maior causa de mortes no mundo inteiro e a previsão da Organização Mundial da Saúde é que o número de óbitos continuará crescendo, com uma estimativa de 9 milhões de pessoas morrendo em 2015 e 11,4 milhões em 2030.¹

Dentre as estratégias utilizadas no tratamento do câncer estão: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia pode ser utilizada por si só ou como adjuvante das outras formas de tratamento. Dentre as abordagens farmacológicas estão o uso de agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos citotóxicos, alguns hormônios e antagonistas, isótopos radioativos, além de outros agentes diversos. Estes compostos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação e fase do ciclo celular na qual atuam.²

Uma das estratégias para o tratamento do câncer é o desenvolvimento de fármacos que interrompam o ciclo celular durante o estágio da mitose. Compostos que perturbam a polimerização/despolimerização dos microtúbulos interferem na segregação cromossômica necessária para a correta divisão celular. Uma variedade de fármacos que se ligam à tubulina e inibem a formação do fuso mitótico são atualmente utilizados na terapia antitumoral, como por exemplo: os alcalóides da vinca, vincristina, vinblastina e vindesina; e os taxanos, paclitaxel e docetaxel.³ Uma das maiores desvantagens destes agentes é o fato dos microtúbulos também estarem envolvidos em muitos outros processos celulares como na manutenção das organelas e forma celular, na mobilidade celular, em vesículas sinápticas e fenômenos de transporte intracelular. Assim, a interferência nos microtúbulos também leva aos seus maiores efeitos colaterais, como, por exemplo, a neurotoxicidade.

Cinesinas são proteínas motoras que utilizam energia advinda do ATP para moverem-se ao longo dos microtúbulos. Estas proteínas estão envolvidas em processos de transporte celular e na mitose.^{4,5} Existem mais de 45 diferentes Cinesinas em humanos, e seu papel no processo mitótico é essencial para formação e funcionamento do fuso mitótico, segregação e transporte dos cromossomos, controle de *checkpoint* mitótico e citocinese.⁶

Ao início da mitose, após duplicação dos centrossomos e replicação do DNA durante a intérfase, a formação inicial do fuso começa com a separação dos centrossomos, os quais se tornam os centros de organização dos microtúbulos. Experimentos utilizando interferência por RNA demonstram que três cinesinas, dentre elas a cinesina Eg5, são

responsáveis pela formação bipolar do fuso mitótico.⁷ A cinesina Eg5 humana (*Homo Sapiens* Eg5 – KSP) desliza ao longo dos microtúbulos gerando forças para a formação do fuso bipolar e separação dos centrôssomos. Durante a pró-metáfase (**Figura 17**), os cromossomos condensados começam a se ligar aos microtúbulos e mover-se para o centro do fuso. Quando os cromossomos estão corretamente alinhados a célula passa pela fase de *checkpoint* e começa a anáfase, com separação das cromátides irmãs e segregação dos centrôssomos. Ao final da mitose, o fuso se alonga e as duas células filhas separam-se durante a citocinese.⁸

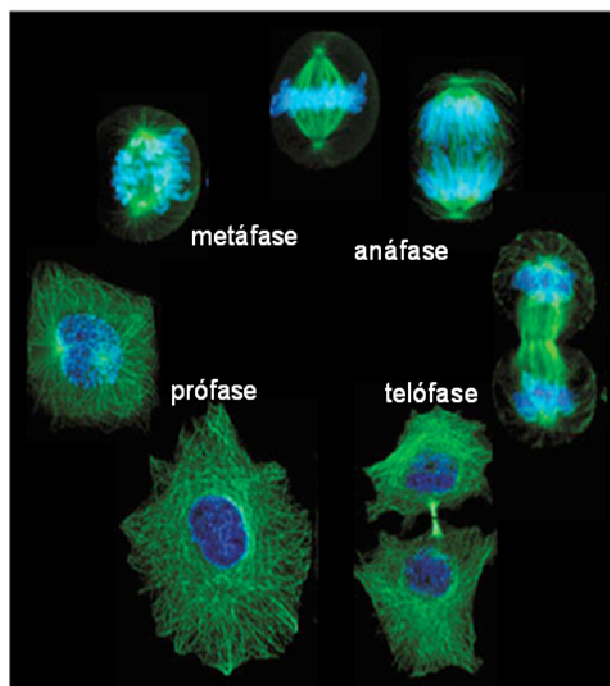


Figura 17. Fases do ciclo celular, mostrando microtúbulos em verde e material genético em azul

Utilizando *High Throughput Screening* (HTS) em uma quimioteca de 16.320 compostos, Mayer e colaboradores⁹ descobriram uma nova molécula que, em sua forma racêmica, é capaz de interromper a formação do fuso mitótico em células de mamíferos. Esta molécula foi denominada Monastrol devido ao fenótipo monoastral monopolar dos microtúbulos cercados por um anel de cromossomos que foi observado no lugar do fuso mitótico bipolar normal (**Figura 18**). Os autores também demonstraram que a atividade do Monastrol deve-se à inibição seletiva da Cinesina Eg5. Sendo o primeiro inibidor seletivo desta proteína, o (+/-)-Monastrol ($IC_{50} = 30 \mu M$)¹⁰ tornou-se uma molécula-plataforma (*lead*) para a síntese de novas moléculas e uma nova abordagem no tratamento do câncer. Ambos enantiômeros, *R*- e *S*-Monastrol, apresentam efeito inibitório sobre a cinesina Eg5, porém o enantiômero *S* é mais potente e induz o fenótipo monoastral em concentrações inferiores às do enantiômero *R* ou da mistura racêmica.¹¹ O *S*-monastrol inibe a motilidade da Eg5 em um

valor de IC_{50} de 14 μM e causa um bloqueio específico e reversível no ciclo celular.⁹ Também foi descrito que o Monastrol é um inibidor alostérico que se liga em uma porção distante 12Å do centro catalítico da enzima e realiza sua ação através da indução de mudanças conformacionais que bloqueiam a liberação do ADP deste centro catalítico.¹²

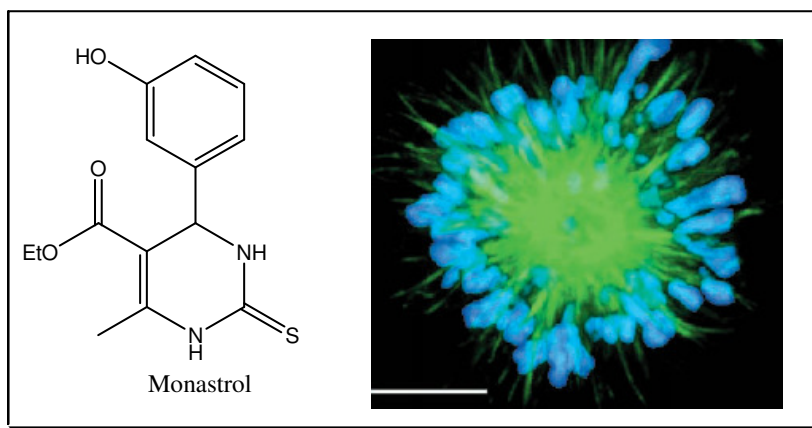


Figura 18. Monastrol e o fenótipo apresentado pelo fuso mitótico após tratamento.

As abordagens mais utilizadas para verificar ação sobre a Cinesina Eg5 são a verificação do fenótipo monoastral e um ensaio onde é averiguada *in vitro* a ação ATPásica da cinesina estimulada pelos microtúbulos (*in vitro steady-state ATPase assay*). Através destes estudos, vários outros inibidores da Cinesina Eg5 já foram publicados contendo a estrutura base das DHPMs (**Figura 19**). A ciclização das cadeias laterais do Monastrol levou à obtenção de derivados bicíclicos conformacionalmente restritos com maior atividade inibitória sobre a Eg5. O Enastron (**276** $IC_{50} = 2 \mu M$), o Enastrol (**277** $IC_{50} = 2 \mu M$) e o Dimetilenastron (**278** $IC_{50} = 200 \text{ nM}$) foram identificados como inibidores potentes e específicos.¹³ A aromatização da cadeia lateral levou ao Vasastrol **279** ($IC_{50} = 1,2 \mu M$), porém existem dúvidas sobre ação seletiva deste composto sobre a Eg5 devido ao fenótipo observado.¹⁴

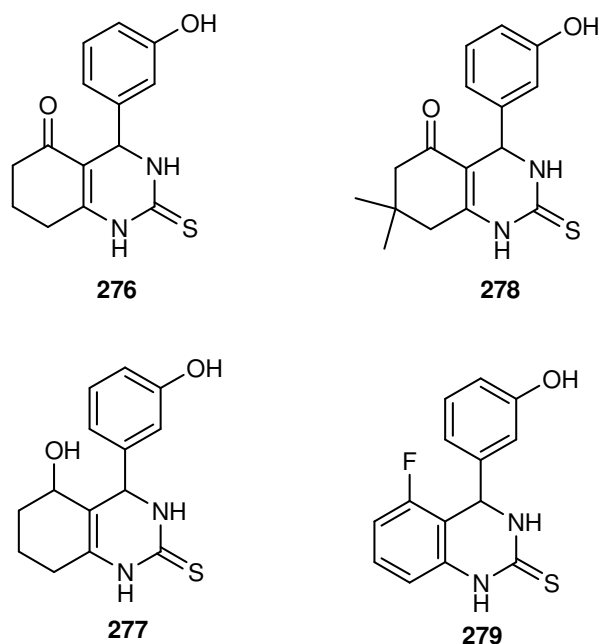


Figura 19. Análogos bicíclicos do Monastrol

Outras classes de compostos também demonstraram eficácia na inibição da Cinesina Eg5 (**Figura 20**). O Terpendole E (**280**) é o único produto natural reportado até o momento a apresentar ação sobre esta enzima ($IC_{50} = 23 \mu M$).¹⁵ Um inibidor alostérico potente da Eg5 é o enantiômero *R* do CK0106023 **281**,¹⁶ e seu análogo SB-715992 (Ispinesib) apresenta atividade antitumoral em muitos modelos murinos e de tumores sólidos em ensaios clínicos em fase II.¹⁸ Uma molécula relativamente mais simples, a S-tritil-L-cisteína **282**, também demonstrou ação sobre a Eg5, com um IC_{50} de $1,3 \mu M$ ¹⁸ e foi demonstrado que, apesar da estrutura bastante diferente em relação ao Monastrol, ambos ligam-se à mesma região da enzima Eg5.¹⁹ A classe das tetraidro- β -carbolinas, representada pelo HR22C16 **283**, também apresentou vários análogos potentes e seletivos em relação à Eg5, o composto **284** apresenta um IC_{50} de 90 nM.²⁰ Diidropirróis como **285** também apresentam ação potente e específica sobre a Eg5 ($IC_{50} = 11 \text{ nM}$).²¹

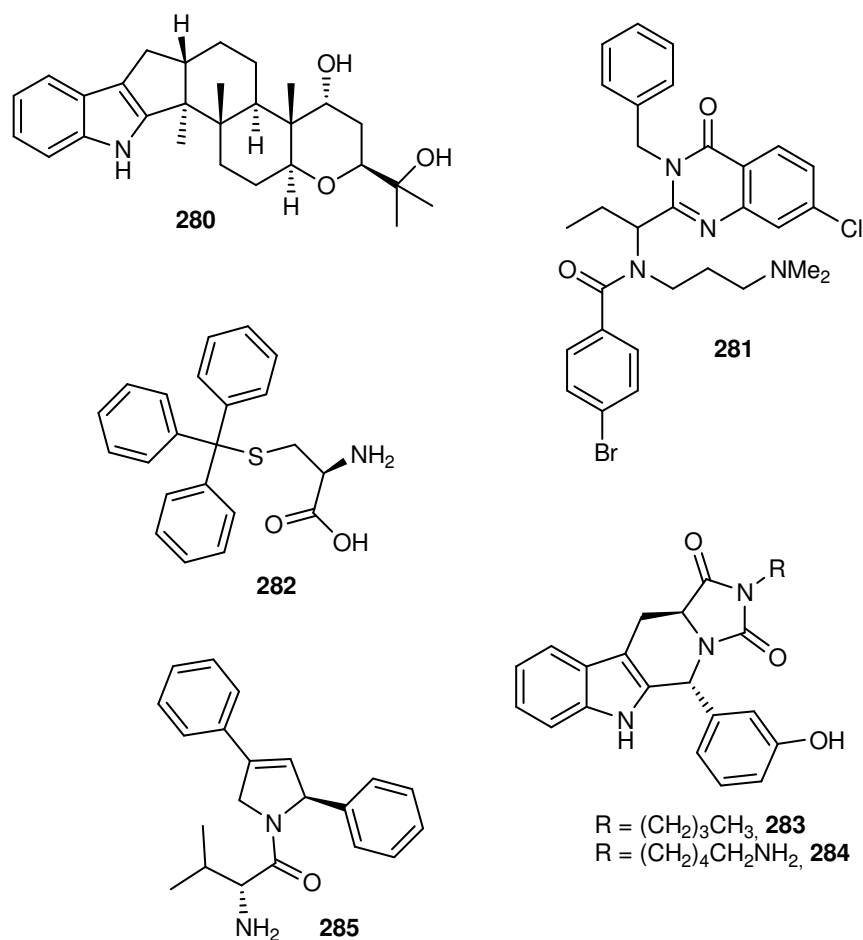


Figura 20. Alguns inibidores da cinesina Eg5 reportados até o momento

Embora a maioria destes análogos apresente potência superior ao Monastrol, acredita-se que esta classe ainda possa ser otimizada quanto à sua ação antitumoral. Em um estudo de relação estrutura atividade (REA) publicado pelo nosso grupo de pesquisa,²² foi verificada a ação de análogos do Monastrol sobre 7 linhagens de células tumorais. Neste estudo foi estabelecido o papel fundamental do enxofre para a atividade citotóxica das DHPMs, uma vez que os derivados contendo o grupamento 2-oxo apenas apresentaram atividade citostática. Entre os compostos ativos, foi descoberto um novo análogo 30 vezes mais potente que o Monastrol, apresentando maior atividade em 6 das 7 linhagens estudadas. Ainda, este composto foi mais ativo que o padrão doxorrubicina em 3 das 7 linhagens testadas. Este análogo no qual a porção molecular derivada do aldeído apresenta como substituinte o grupamento 3,4-metilenodioxí foi então denominado Piperastrol **191** (**Figura 21**, codificado em nosso laboratório como LaSOM 64).

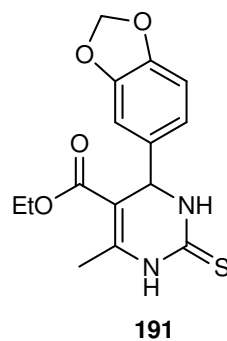


Figura 21. Estrutura molecular do LaSOM 64

De acordo com estudos de REA da classe das DHPMs relatados,²³ a ação destes compostos sobre a cinesina Eg5 não pode ser melhorada em relação ao Monastrol através da modificação no padrão de substituição do anel aromático (**Figura 22**). Foi determinado que a presença de grupamentos volumosos em C-4, como naftila ou stirila, levam a uma diminuição na atividade sobre a cinesina Eg5. Substituição do grupamento metila em C-6 por uma fenila ou isopropila também leva a uma diminuição na atividade. Compostos contendo enxofre na posição 2 apresentaram maior inibição que aqueles contendo oxigênio. Alterações no substituinte do grupamento éster em C5 são bem toleradas, e a utilização de grupamentos mais volumosos favorece a atividade. Metilação do N1 não causa perda nem diminuição da atividade.

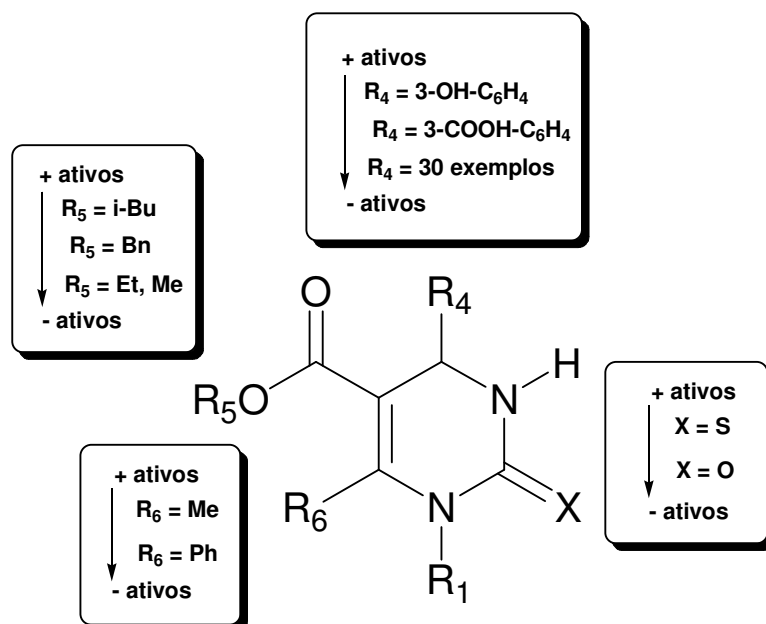


Figura 22. Esquema de relação estrutura-atividade das DHPMs em relação à inibição da cinesina Eg5

Apesar de já haver uma REA estabelecida para estes heterociclos, muitos autores questionam o motivo destas moléculas apresentarem melhor perfil de atividade quando

utilizadas em culturas celulares em relação aos resultados utilizando somente a enzima.^{11,24} Uma das possíveis explicações foi a inibição de outras proteínas envolvidas na formação e manutenção do fuso mitótico. Porém foi demonstrado que o Monastrol exerce sua ação exclusivamente sobre a cinesina Eg5 no fuso mitótico. Outra explicação está baseada na força iônica do meio, que pode alterar a capacidade do Monastrol de ligar-se à cinesina, pois não haveria cuidado de reproduzir a mesma força iônica nos diferentes ensaios.

A classe das DHPMs apresenta ação em diversos sistemas biológicos, sendo consideradas estruturas privilegiadas (*privileged structure*).²⁵ Além da ação sobre a cinesina Eg5, algumas DHPMs se demonstraram moduladoras da chaperona molecular Hsp70 (*Heat Shock Protein 70*) acentuando o interesse de agentes antitumorais com base neste tipo de heterociclo.^{26,27} DHPMs também foram reportadas como antagonistas seletivas do receptor α_{1A} -adrenérgico, e encontraram aplicação no tratamento da hiperplasia benigna de próstata.²⁸ Não se pode descartar que estas moléculas exerçam sua ação sobre células tumorais através de mais de um mecanismo concomitantemente. Saudi e colaboradores²⁹ demonstraram recentemente que uma grande coleção de DHPMs e análogos apresentam potencial no tratamento da Toxoplasmose. Porém a desvantagem apontada pelos autores foi o fato delas não apresentarem ação seletiva sobre a diidrofolato redutase (DHFR) do parasita, contrariamente ao fármaco referência Trimetopim. Os ensaios de inibição da DHFR humana mostraram que os compostos são potentes inibidores desta enzima, com valores de IC_{50} na faixa de nM. A inibição da DHFR humana é o mecanismo de ação dos compostos antimetabólitos, representados pelo Metotrexato, no tratamento do câncer. Portanto não pode-se descartar que as DHPMs possam agir no tratamento do câncer através de dois ou mais mecanismos distintos e concomitantes, que podem funcionar de maneira sinérgica. Existem autores^{30,31} que defendem a premissa de que a inibição parcial de dois ou mais alvos biológicos é mais eficiente na resolução da patologia do que a inibição total de um único alvo. Baseado nisso está o conceito de fármacos com ação em múltiplos alvos moleculares, também chamados duais ou simbióticos³².

Visto isso, acredita-se que esta classe de compostos merece ser mais bem estudada quanto à sua ação antitumoral, uma vez que a grande maioria dos estudos está centrada na ação do Monastrol e somente visando inibição da Eg5.

* “Estruturas privilegiadas” são moléculas-plataformas com ligações versáteis, onde uma simples molécula é capaz de fornecer ligantes potentes e seletivos para uma série de alvos biológicos diferentes através de modificações de seus grupos funcionais. Além disso, as estruturas privilegiadas geralmente apresentam excelentes propriedades drug-like, e que podem, também, levar a quimiotecas de compostos drug-like e protótipos.

Gliomas são os tumores mais freqüentes no sistema nervoso central (CNS) em humanos.³³ O Glioblastoma multiforme (GBM) é classificado como grau IV pela organização mundial de saúde (WHO) e representa a forma mais agressiva destes tumores. Apesar dos progressos consideráveis nas pesquisas sobre os aspectos moleculares de gliomas malignos, a expectativa de vida de pacientes portadores deste tipo de câncer continua a ser pequena.³⁴ O tratamento cirúrgico seguido de radioterapia continua sendo o tratamento de escolha para GBM,³⁵ e a quimioterapia adjuvante disponível atualmente pode aumentar apenas de um a três meses a sobrevida dos pacientes.³⁶ Apesar destes tratamentos, os gliomas reincidem rapidamente devido à sua elevada taxa de proliferação e natureza altamente infiltrativa e invasiva.³³ A quimioterapia paliativa é comumente usada no tratamento dos pacientes reincidentes, porém somente o agente alquilante temozolomida produz bons resultados, e ainda assim em uma pequena percentagem dos pacientes.³⁴ Recentemente, Müller e colaboradores³⁸ demonstraram que o Monastrol e análogos bicíclicos são promissores no tratamento de tumores no SNC, sendo efetivos contra a proliferação de glioblastomas humanos. Os compostos têm as vantagens³⁸ de não apresentarem a neurotoxicidade de outros agentes, não serem inativados por ligação às proteínas do soro nem por clivagem através de esterases, além de não serem substratos para a bomba de efluxo p-gp, principal responsável pela resistência de tumores cerebrais a vários agentes antitumorais.

O sarcoma 180 é um tumor originário de camundongos e é uma das linhagens de células mais utilizadas na pesquisa *in vivo* de novos agentes antitumorais, uma vez que histologicamente apresenta-se como massa sólida formada por células com pleomorfismo acentuado, estroma conjuntivo vascularizado circundando e permeando o tumor, necrose central e padrão histológico misto apresentando aspecto tanto de carcinoma como de sarcoma.³⁹ A atividade de inibição frente a um tumor com estas características revela uma substância de alto poder citotóxico com grande poder de penetração em massas sólidas, fator determinante para um candidato a fármaco antitumoral. Não existem relatos na literatura de investigação da atividade antitumoral *in vivo* do Monastrol nem de seus análogos. A investigação da ação antitumoral *in vivo* utilizando modelos animais é um passo muito importante na avaliação pré-clínica e no processo de aperfeiçoamento de novos candidatos a fármaco, uma vez que permite verificação de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos.

2.1.1. Outras atividades biológicas das DHPMs

DHPMs e seus derivados apresentam uma vasta gama de atividades biológicas.²⁵ Dentre algumas das atividades descritas para esta classe estão antifúngica e antibacteriana,⁴⁰ antiviral,⁴¹ antiinflamatória⁴² e antioxidante. DHPMs também apresentam efeito modulador dos canais de cálcio, sendo anti-hipertensivos e dilatadores coronarianos no tratamento da angina, além de apresentarem ação anti-isquêmica em modelos animais.^{44,45}

Estes heterociclos podem ser consideradas aza-análogos das Diidropiridinas de Hantzsch, representadas pelo fármaco Nifedipino. Rovnyak e colaboradores⁴⁶ demonstraram que a ação das DHPMs sobre os canais de cálcio é altamente dependente da configuração do carbono quiral em C4, o qual funciona como um “*switch* molecular”, sendo um dos enantiômeros agonista e o outro, antagonista dos canais de Ca²⁺. Derivados contendo o grupamento amida na posição C5 apresentaram atividade anticoagulante⁴⁸ ou inibição da captação de adenosina pelos trombócitos. Outras atividades relatadas para esta classe são o antagonismo de receptores de glutamato metabotrópicos do grupo 2⁴⁸ e do neuropeptídeo Υ .⁴⁹

2.2. OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo constituem-se em: a) avaliar, através de testes farmacológicos *in vitro* e *in vivo*, a atividade antitumoral de alguns compostos sintetizados neste trabalho, selecionados de acordo com os critérios expostos no capítulo 1; b) investigar o perfil farmacocinético do composto mais ativo encontrado nos testes realizados para a atividade antitumoral c) avaliar a atividade carrapaticida e antifúngica *in vitro* dos compostos sintetizados visto as atividades farmacológicas relatadas na literatura para esta classe; d) avaliar a farmacocinética pré-clínica do LASOM 65 em roedores após administração intravenosa (iv) *bolus* e intraperitoneal de diferentes doses.

2.3. Avaliação da atividade carrapaticida contra *Ripicephalus (Boophilus) Microplus*

Os testes de atividade larvica e ovica contra carrapatos da espécie *Ripicephalus (Boophilus) Microplus*⁷² foram realizados em colaboração com a Professora Vera Lucia Sardá Ribeiro, Faculdade de Veterinária, UFRGS e Professora Gilsane Von Poser, Faculdade de Farmácia, UFRGS. Foram selecionados 8 compostos e estes são apresentados na **Figura 23**.

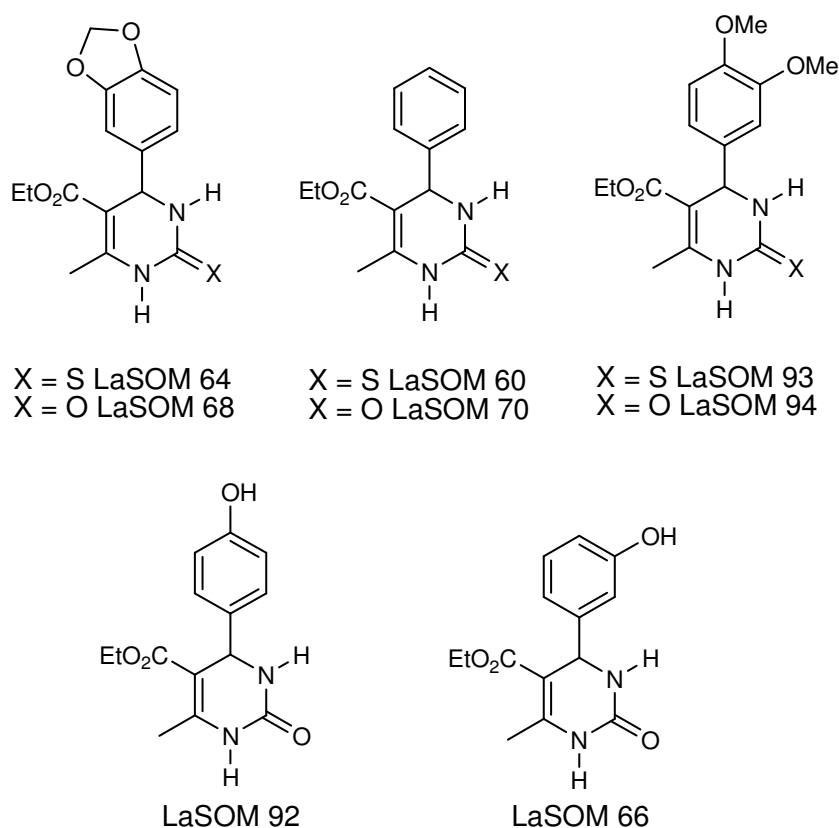


Figura 23. DHPMs testadas como carrapaticidas contra a espécie *Ripicephalus (Boophilus) Microplus*

2.3.1. Materiais e métodos

2.3.1.1. Procedimento Experimental para determinação da atividade Larvica

Para a realização dos ensaios de atividade larvica foram pesados 5mg de ovos viáveis (correspondente a aproximadamente 100 ovos), e estes foram lacrados dentro de sacos de chá. Após a eclosão dos ovos, as larvas, presas dentro dos sacos de chá foram

submetidas ao ensaio. Todos os compostos testados foram utilizados em triplicata, assim como o branco contendo somente o solvente. As amostras foram testadas inicialmente em duas concentrações (1µg/mL e 0,1µg/mL), diluídas em DMSO 1% em EtOH 95%. Os sacos de chá contendo as larvas foram imersos nas soluções contendo os produtos por 5 minutos, secos e incubadas à 37°C por 48h. A leitura foi então realizada por contagem com auxílio de lupa de aumento e o resultado foi expresso em percentual de larvas vivas (% vivas).

2.3.1.2. Procedimento Experimental para determinação da atividade

Ovicida:

Para os testes de atividade ovicida, foram pesados 5mg de ovos viáveis (aproximadamente 100 ovos) e colocados dentro de tubos de ensaio. Uma amostra destes ovos foi incubada sem imersão em nenhum produto para controle do tempo de eclosão dos ovos. As amostras foram todas testadas em triplicata nas concentrações de 1µg/mL e 0,1µg/mL, diluídas em uma mistura de DMSO 1% em EtOH 95%, a qual também foi utilizada como branco. As colônias de ovos, dentro de tubos de ensaio, foram imersas nas soluções contendo as amostras por 5 minutos, decantadas, secas e incubadas em estufa à 37°C pelo período necessário para eclosão dos controles. A leitura dos resultados foi realizada com auxílio de lupa de aumento, e os resultados foram expressos em porcentagem de eclosão dos ovos (% eclosão).

2.3.2. Resultados e Discussão

No teste da atividade larvicida, nenhuma das 8 DHPMs testadas demonstrou atividade nas concentrações utilizadas, ocorrendo 100% de sobrevivência em todas as amostras. Nos testes de atividade ovicida também não houve atividade alguma destas moléculas, havendo eclosão de 100% dos ovos. Possivelmente, os resultados negativos obtidos devem-se à incapacidade das DHPMs de atravessar a camada de actina polar que compõe o exoesqueleto destes ectoparasitas. Outros compostos testados pelo nosso grupo de pesquisa com a mesma linhagem de larvas e ovos apresentaram atividade, descartando, assim, a possibilidade de falsos negativos.

2.4. Avaliação da atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*

Botrytis cinerea é o fungo responsável pelo mofo cinzento (“*Gray mold*”). Esta patologia encontra-se amplamente distribuída no mundo e afeta mais de 200 espécies vegetais⁵⁷ sendo responsável por danos consideráveis em colheitas e causando grande impacto econômico na agroindústria mundial.⁵⁸ Alguns exemplos de produções vegetais afetados por este problema são as produções de morango, tomate, pepino, pimentão, feijão, abóbora, uva e beringela⁵⁹ (**Figura 24**). A aplicação de fungicidas sintéticos tem sido a principal forma de combater a doença causada por *B. cinerea*,⁶⁰ porém o uso inadequado destes agentes tem levado a ocorrências de resistência aos fungicidas disponíveis atualmente.^{61,62} Desta maneira a busca por novos agentes ativos contra este tipo de fungo faz-se necessária.



Figura 24. Morangos e uvas infectados por *Botrytis cinérea*

Colletotrichum gloeosporioides é outro fungo fitopatógeno que causa significativo impacto econômico mundial. Este fungo representa um grande problema na produção de manga, mamão, goiaba, pimentão e maracujá^{63,64} (**Figura 25**). Este fitopatógeno também é o principal responsável por perdas econômicas no cultivo de cebola em várias regiões brasileiras.⁶⁵ Assim como ocorre com *B. cinerea*, o uso indiscriminado de agentes antifúngicos levou ao desenvolvimento de resistência nesta espécie,⁶⁵ e neste caso o desenvolvimento de novas moléculas capazes de inibir sua proliferação se faz igualmente necessário.



Figura 25. Mamão e manga infectados por *Colletotrichum gloeosporioides*

DHPMs e derivados têm sido estudados quanto à sua atividade antifúngica. Singh e colaboradores⁶⁶ demonstraram recentemente que diidropirimidinonas obtidas diretamente através da reação de Biginelli apresentam atividade antifúngica contra *T. hammatum*, *T. koningii* e *A. niger*. Os valores de concentração mínima inibitória (MIC) para estas cepas ficaram na faixa de 25-350ng/mL. DHPMs conjugadas com anéis tiazólicos⁶⁷ demonstraram atividades entre moderadas e excelentes contra uma série de fungos patogênicos. DHPMs substituídas com ácidos borônicos na posição aromática (C4) não demonstraram ação antifúngica contra 4 cepas de fungos patógenos.⁶⁸ Pirimidinas derivadas das DHPMs apresentam atividade comparável aos fármacos referência com MICs na faixa de nanomolar contra cepas de fungos patogênicos como *Candida albicans* e *Criptococcus neoformans*.⁶⁹ Octaidroquinazolinonas, as formas bicíclicas das DHPMs representadas pelo Enastron **276**, também foram investigadas quanto à sua atividade antifúngica e as atividades encontradas contra uma série de fungos patogênicos são de moderadas a excelentes.⁷¹ Apesar do grande número de relatos, todos os estudos reportados focam apenas na atividade antifúngica destas moléculas contra fungos capazes de infectar seres humanos.

Em vista disso, 20 DHPMs sintetizadas neste trabalho foram investigadas frente os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Os ensaios antifúngicos foram realizados em colaboração com a Professora Gilsane Von Poser (Faculdade de Farmácia, UFRGS) e a Professora Rosa Durán Patrón do Departamento de Química Orgânica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Cádiz, Espanha, com supervisão do Professor Isidro González Collado.

2.4.1. Materiais e Métodos

As 20 DHPMs testadas para atividade antifúngica são apresentadas na **Figura 26**.

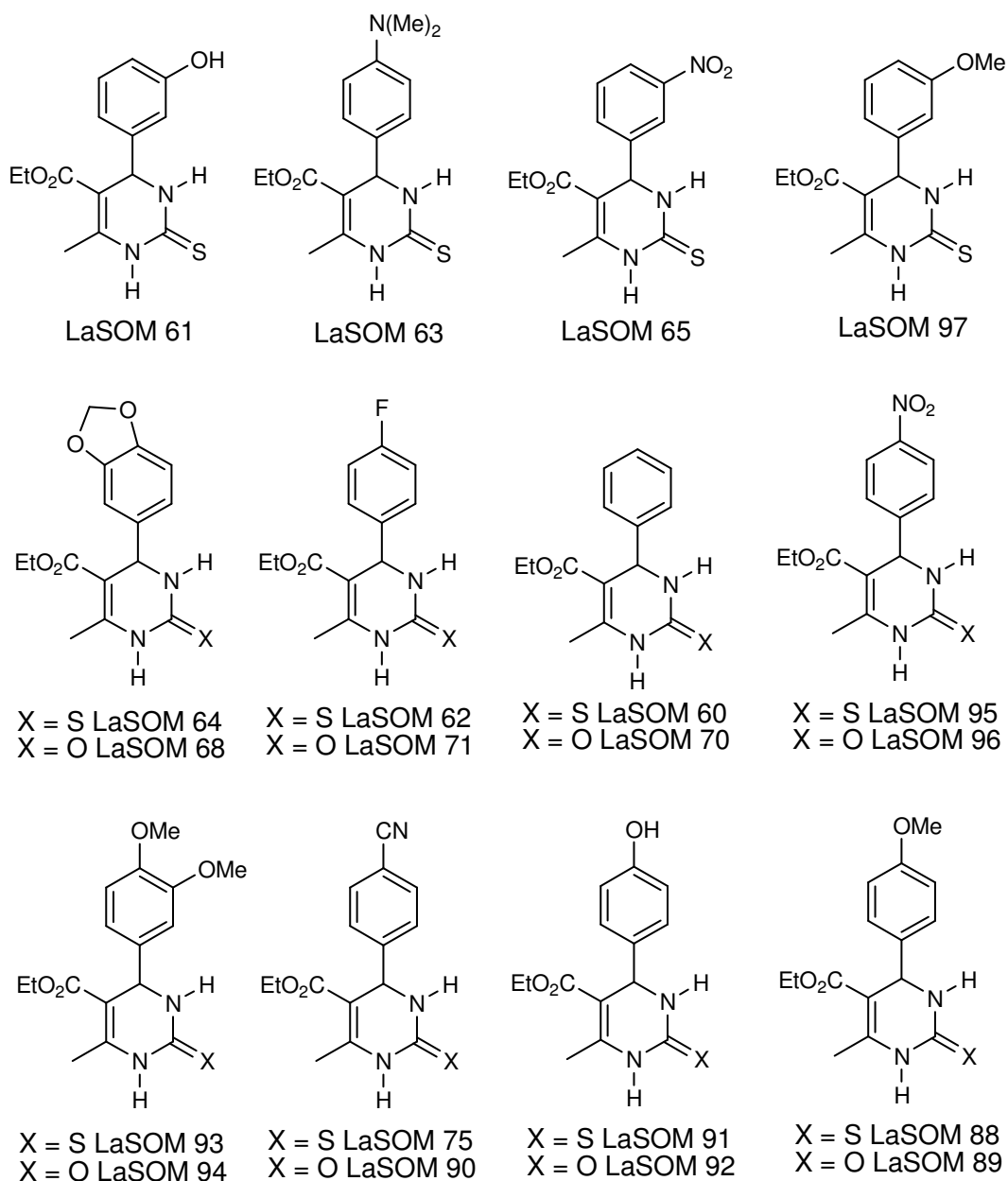


Figura 26. DHPMs avaliadas nos ensaios antifúngicos

As culturas de *B. cinerea*, *B. cinerea* 2100, e de *C. gloeosporioides* empregadas neste trabalho foram obtidas do Centro Espanol de Cultivos Tipos (CECT), Facultad de Biología, Universidad de Valencia, Espanha. Os bioensaios foram realizados pela medida da inibição do crescimento radial em meio Agar em uma placa de Petri. Os compostos teste foram dissolvidos em DMSO de forma a obter soluções com concentrações de 1mM.

Estas soluções contendo o composto teste foram adicionadas a meio Malt Agar (glicose-malt-peptona-agar, 61 g/L, pH 6,5-7,0) para o ensaio com *B. cinerea*. Para o ensaio

com *Colletotrichum gloeosporioides* as soluções foram adicionadas a meio PDA (Potato-Dextrose-Agar). A concentração final de DMSO foi idêntica tanto no controle quanto nas culturas tratadas. O meio foi vertido em placas de Petri de plástico estéreis (6 cm de diâmetro) e um disco micelar de 6mm de diâmetro do fungo fitopatígeno, retirado de uma cultura em crescimento ativo, foi posicionado no centro da placa teste.

A inibição do crescimento radial foi medida por 8 dias. A inibição do crescimento foi calculada como a porcentagem de inibição do crescimento radial relativo ao controle através seguinte equação: $I = 100 \times (C - T) / C$, onde I = percentual de inibição do crescimento, C = diâmetro da colônia no controle menos o diâmetro do cilindro implantado, T = diâmetro da colônia no tratamento menos o diâmetro do cilindro implantado.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como médias de três replicatas do diâmetro das colônias ($\pm DP$).

2.4.2. Resultados e discussão

Os resultados para a avaliação preliminar da atividade dos compostos na concentração de 1mM contra as cepas de *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Porcentagem de inibição do crescimento radial de colônias de *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* em relação ao controle. Todos compostos foram empregados na concentração de 1mM.

Composto	<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
	% de inibição em 72h	% de inibição em 144h	% de inibição em 72h	% de inibição em 144h
LaSOM 60	62	72	81	79
LaSOM 61	33	55	27	-
LaSOM 62	78	78	88	86
LaSOM 63	71	72	63	62
LaSOM 64	74	69	73	74
LaSOM 65	19	-	30	-
LaSOM 68	35	58	32	-
LaSOM 70	11	-	3	-
LaSOM 71	38	56	23	-
LaSOM 75	48	53	63	64
LaSOM 90	15	-	7	-
LaSOM 88	78	74	71	73
LaSOM 89	33	63	48	52
LaSOM 91	48	51	22	-
LaSOM 92	31	-	25	-
LaSOM 93	42	55	44	52
LaSOM 94	22	45	-5	-
LaSOM 95	43	48	70	75
LaSOM 96	20	41	-9	-
LaSOM 97	72	70	67	65

Em geral os compostos que apresentaram inibição de *B. cynerea* também apresentaram inibição para *C. gloeosporioides*, sugerindo um mecanismo de ação comum a ambas as culturas. Dentre as 20 DHPMs testadas, os compostos mais ativos LaSOM 60, LaSOM 62, LaSOM 63, LaSOM 64, LaSOM 88, LaSOM 97 apresentaram inibição do crescimento de ambos os fungos maior que 60%, em ambos tempos verificados (72 e 144h). Dentre estes, o LaSOM 62 foi o que apresentou maiores valores de inibição do crescimento das culturas de fitopatógenos, inibindo o crescimento de *Botrytis cinerea* em 78%, e de *Colletotrichum gloeosporioides* em 88% (72h). O LaSOM 75 e o LaSOM 95 apresentaram uma boa atividade sobre o crescimento, porém menor que os compostos mais ativos. Os compostos LaSOM 94 e LaSOM 96 parecem promover o crescimento do *C. gloeosporioides* em 72h de tratamento.

Pode-se observar que as DHPMs com enxofre em C2 são muito mais ativas que seus oxo-análogos, conforme pode ser exemplificado quando se comparam as atividades de LaSOM 60 e LaSOM 70, ambos substituídos com o grupamento fenila na posição 4. O LaSOM 60 inibiu em 62% o crescimento de *B. cinérea*, e em 81% o crescimento de *C. gloeosporioides*, enquanto o LaSOM 70 inibiu o crescimento de ambos os fungos em valores menores que 12% nas mesmas 72h. O único composto contendo oxigênio na posição 2 que demonstrou atividade apreciável para ambos os fungos foi o LaSOM 89, substituído com uma metoxila em *para* no anel aromático, o qual apresentou um efeito tempo dependente na inibição de *B. cinérea*, chegando a inibir em 63% seu crescimento em 144h de tratamento, e inibiu o crescimento de *C. gloeosporioides* cerca de 50% para ambos tempos investigados. Mesmo assim, seu análogo contendo enxofre na posição 2 (LaSOM 88) foi mais ativo em ambos os fungos, exibindo inibição maior que 70% em todos os tempos investigados.

Dentre as DHPMs que formam a quimioteca testada encontram-se compostos substituídos nas posições *para*, *meta* ou em ambas as posições do anel aromático. Os compostos mais ativos foram aqueles apresentando substituinte em *para*, não importando a natureza do substituinte. A única exceção é o LaSOM 97, substituído com uma metoxila em *meta*, o qual também apresentou boa atividade, com inibição superior a 60% sobre ambos os fungos em ambos os tempos avaliados (72h e 144h).

Na série dos compostos substituídos com grupamentos oxigenados no anel aromático, quando se compara os compostos LaSOM 61 e LaSOM 97, e LaSOM 88 e LaSOM 91, pode-se perceber que o grupamento hidroxila livre no anel aromático desfavorece a atividade antifúngica comparado ao grupamento protegido metoxila. Também pode ser notado que o grupamento metoxila tanto em *meta* (LaSOM 97), quanto em *para* (LaSOM 88) apresenta boa atividade com inibições igual e superior a 65% e igual e superior

a 71% respectivamente. Porém o composto contendo ambos os substituintes (LaSOM 93) apresenta uma atividade inferior a estes com inibição igual ou inferior a 55%. A união de ambos os oxigênios através de uma unidade metilênica (LaSOM 64, inibição $\geq 69\%$) causa um aumento na atividade quando comparado àquele com as metoxilas separadas (LaSOM 93 inibição $\leq 55\%$).

2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Para os ensaios de avaliação farmacológica abordados neste capítulo foram selecionados 24 entre os compostos cuja síntese foi apresentada e discutida no Capítulo 1. A seleção dos compostos foi baseada em resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa e dados da literatura, conforme apresentado ao longo deste manuscrito.

Os compostos sintetizados que foram submetidos à avaliação farmacológica foram codificados como LaSOM, seguido de um número previamente determinado. Esta será a nomenclatura adotada neste capítulo do manuscrito. A relação entre a codificação LaSOM e a numeração utilizada ao longo deste manuscrito está apresentada na Tabela 13 abaixo. As estruturas dos compostos LaSOM são apresentadas no item referente aos materiais e métodos de cada ensaio farmacológico.

Tabela 13. Numeração e códigos dos compostos avaliados farmacologicamente nesse capítulo

LaSOM	Composto	LaSOM	Composto
60	<u>167</u>	66	<u>213</u>
61	<u>209</u>	77	<u>214</u>
62	<u>173</u>	68	<u>190</u>
63	<u>184</u>	69	<u>195</u>
64	<u>191</u>	70	<u>181</u>
65	<u>210</u>	71	<u>194</u>
72	<u>211</u>	89	<u>189</u>
75	<u>182</u>	90	<u>183</u>
88	<u>172</u>	92	<u>198</u>
91	<u>199</u>	94	<u>187</u>
93	<u>197</u>	96	<u>217</u>
95	<u>171</u>	98	<u>216</u>
97	<u>212</u>	99	<u>215</u>

2.5.1. Avaliação da citotoxicidade sobre linhagens celulares de Glioma

Dando continuidade aos estudos do nosso grupo de pesquisa na avaliação da citotoxicidade do Monastrol (LaSOM 61) e análogos em diferentes linhagens de células tumorais,²² decidiu-se investigar a atividade citotóxica de duas séries de DHPMs sobre linhagens de glioma. 14 moléculas foram separadas em dois grupos análogos, contendo o mesmo padrão de substituição na porção aromática e variando o substituinte na posição 2, sendo uma série composta por 7 tio-análogos e a outra por 7 oxo-análogos. Além destas duas séries, uma diidropirimidina modificada com o grupamento etila no átomo de enxofre também foi investigada. As linhagens tumorais de glioma avaliadas foram a linhagem C6-murina e a linhagem U118-MG humana.

Os ensaios para verificação da citotoxicidade foram realizados em colaboração com a Professora Ana Maria Oliveira Battastini e com a Dr. Andressa Bernardi do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

2.5.1.1. Materiais e métodos

2.5.1.1.1. Compostos avaliados

Os compostos investigados nos ensaios de avaliação da citotoxicidade sobre linhagens de glioma são apresentados na **Figura 27**.

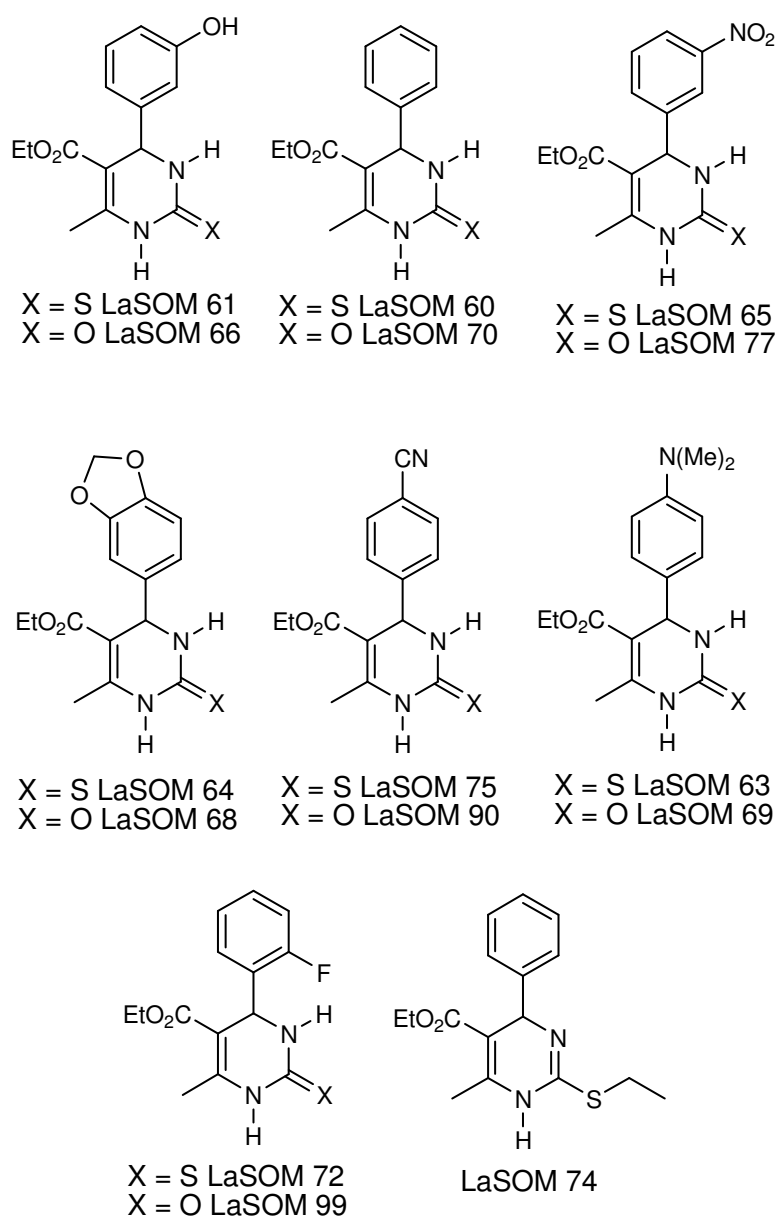


Figura 27. DHPMs sintetizadas testadas contra linhagens celulares de glioma murino C6 e humano U118-MG.

2.5.1.1.2. Ensaio de contagem celular (ensaio de proliferação celular)

As linhagens celulares de glioblastoma humano U138-MG e a linhagem celular de glioma de rato C6 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (Rockville, Maryland, USA). As células foram cultivadas em meio de cultura contendo *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 5% (C6) ou 15% (U118-MG) de soro fetal bovino. As células foram mantidas em condições padrão de cultura celular (37°C, 5% CO₂). Após atingir semi-confluência, as células de glioma foram tratadas com DMSO ou diferentes concentrações do Monastrol ou seus análogos. Após o período de tempo especificado, o meio de cultura foi removido, as células foram tripsinizadas com uma solução de 0,25% tripsina/EDTA e foram contadas imediatamente em um hemocitômetro.

2.5.1.1.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Para o ensaio do MTT, as células de glioma foram semeadas em uma placa de 96 poços e, após atingir semi-confluência, as culturas foram tratadas com os diferentes compostos (50 µg/mL). Após 48h de tratamento, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline* – PBS) e 10 µL de MTT foram adicionados a cada um dos poços. As células foram então encubadas por 3h e a solução foi removida. O formazan residual foi dissolvido em 100 µL de DMSO. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de 490 nm. A viabilidade celular foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Abs}_s / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100,$$

onde Abs_s é a absorbância das células tratadas com os diferentes compostos e Abs_{controle} é a absorbância das células controle (tratadas apenas com o meio de cultura ou com o solvente).

2.5.1.1.4. Análise Estatística

Todos resultados são apresentados como médias ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os dados foram analisados por um ANOVA seguido pelo teste de Tukey utilizando um *Instat software package* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Valores de P<0,05, P<0,01 e P<0,001 indicam diferença estatisticamente significativa.

2.5.1.2. Resultados e discussão

Objetivando realizar um screening inicial dos análogos para comparação com o protótipo LaSOM 61, inicialmente foram investigados os perfis dose-resposta deste composto através do ensaio de proliferação celular em ambas as linhagens celulares e em diferentes tempos para encontrar a melhor dose e tempo de tratamento. As linhagens C6 e U118-MG foram tratadas com LaSOM 61 nas doses de 2,5, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL durante 24, 48 ou 72h. Os resultados são apresentados nas **Figuras 28-33** a seguir.

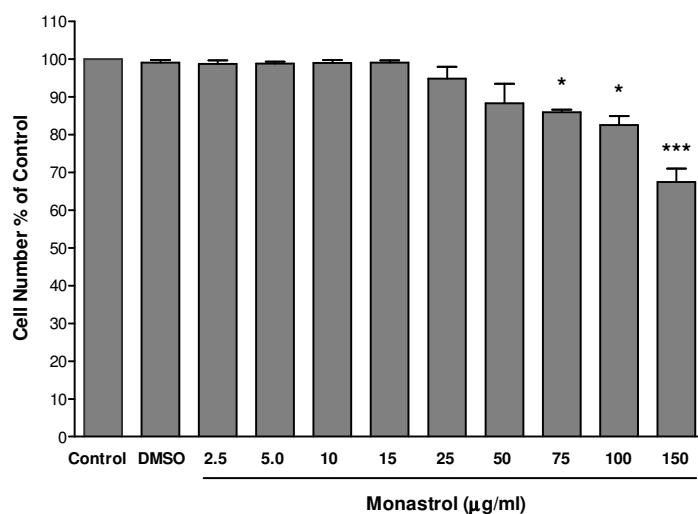


Figura 28. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma de rato C6 em 24h. * Significativamente diferente do grupo controle e do DMSO com $P < 0.05$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). *** Significativamente diferente grupo controle e do DMSO com $P < 0.001$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey).

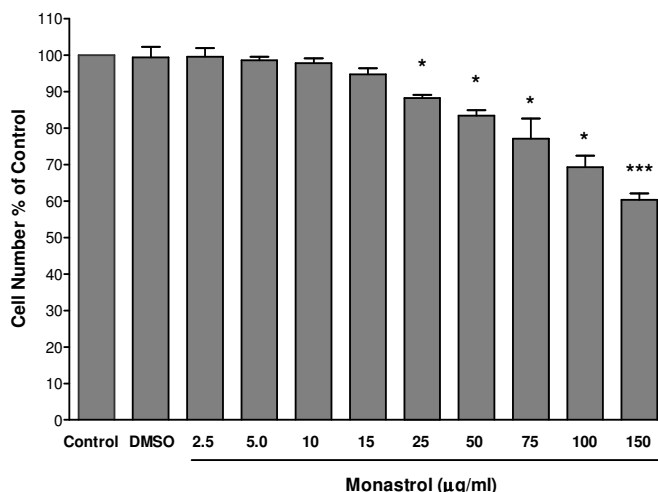


Figura 29. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma humano U118-MG em 24h. * Significativamente diferente do grupo controle e do DMSO com $P < 0.05$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). *** Significativamente diferente grupo controle e do DMSO com $P < 0.001$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey).

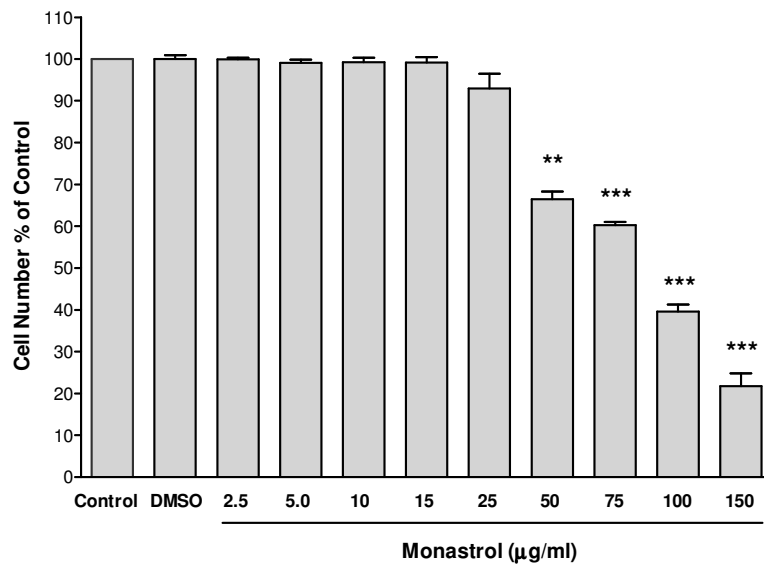


Figura 30. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma de rato C6 em 48h. ** Significativamente diferente do grupo controle e do DMSO com $P < 0.01$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). *** Significativamente diferente grupo controle e do DMSO com $P < 0.001$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey).

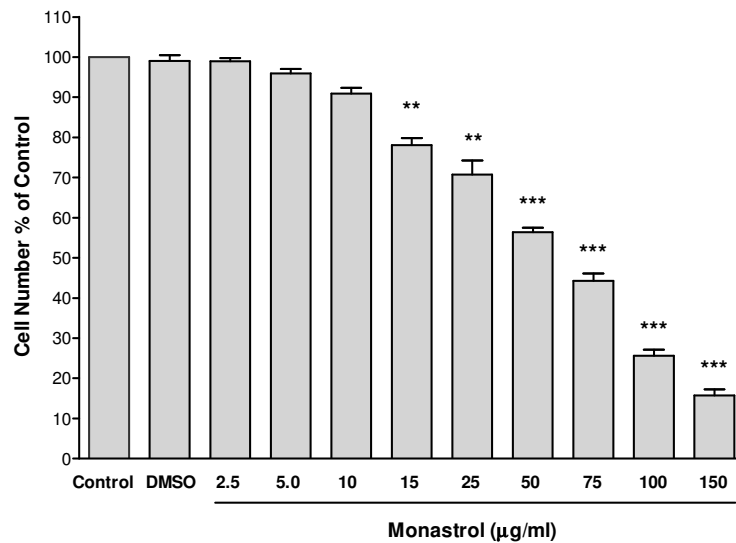


Figura 31. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma humano U138-MG em 48h. ** Significativamente diferente do grupo controle e do DMSO com $P < 0.01$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). *** Significativamente diferente grupo controle e do DMSO com $P < 0.001$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey).

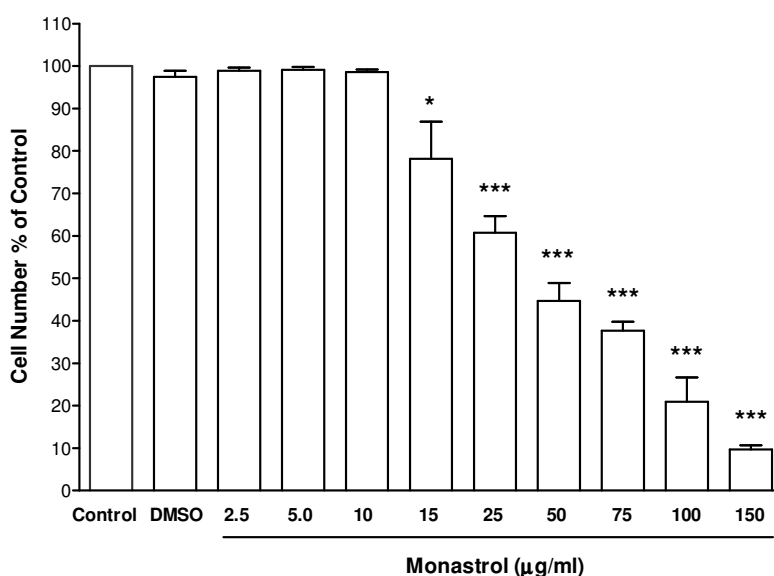


Figura 32. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma de rato C6 em 72h. * Significativamente diferente do grupo controle e do DMSO com $P < 0.05$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). * Significativamente diferente grupo controle e do DMSO com $P < 0.001$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey).**

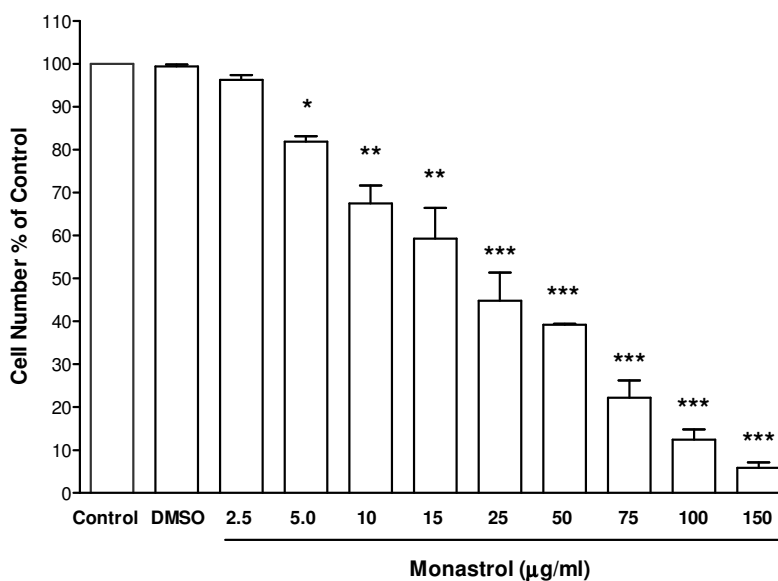


Figura 33. Efeito do LaSOM 61 sobre a proliferação de células de glioma humano U138-MG em 72h. * Significativamente diferente do grupo controle e do DMSO com $P < 0.05$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). ** Significativamente diferente do grupo controle e do DMSO com $P < 0.01$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). * Significativamente diferente grupo controle e do DMSO com $P < 0.001$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey).**

Conforme pode ser visto comparando as **Figuras 28, 30 e 32** (C6) e as **Figuras 29, 31 e 33** (U138-MG) o tratamento com LaSOM 61 resultou numa diminuição significativa do número de células em ambas as linhagens celulares ao longo do tempo, exercendo assim

um efeito tempo-dependente acentuado na proliferação celular. O LaSOM 61 também apresentou um efeito concentração-dependente em ambas as linhagens. Em 24h de tratamento foi observado efeito estatisticamente significativo na proliferação celular a partir da concentração de 75 µg/mL para a linhagem C6 e 25 µg/mL para a linhagem U138-MG; em 48h de tratamento foi observado efeito a partir da concentração de 50 µg/mL para a linhagem C6 e 15 µg/mL para a linhagem U138-MG; e, em 72h de tratamento foi observado efeito a partir da concentração de 15 µg/mL para a linhagem C6 e 5 µg/mL para a linhagem U138-MG. No geral, o efeito foi mais pronunciado sobre a linhagem de glioma humano U138-MG do que sobre a linhagem murina C6.

A condição escolhida para comparação do efeito do LaSOM 61 com seus análogos foi o tratamento conduzido na concentração de 50 µg/mL durante 48h. Desta maneira todos os compostos sintetizados puderam ser avaliados nos ensaios de *screening*.

As culturas celulares de glioma murino C6 e humano U118-MG foram tratadas com 15 diferentes compostos. A concentração utilizada foi a previamente otimizada para o LaSOM 61 (50 µg/mL, durante 48h). A Tabela 13 mostra os valores de concentração molar equivalentes à dosagem de 50 µg/mL utilizada no *screening*.

Tabela 14. Valores de concentração (mM e µM) dos compostos utilizados no *screening*

LaSOM	MM* (g/mol)	µM
60	276.35	181
63	319.42	156
64	320.36	156
65	321.35	156
66	276.29	181
72	294.34	170
75	301.36	166
69	303.36	165
67	305.29	164
74	304.41	164

*MM: massa molar

A **Figura 34** mostra os resultados do ensaio de proliferação celular obtidos no tratamento das linhagens de glioma humano e murino com as DHPMs selecionadas na concentração de 50 µg/mL. Conforme pode ser observado, todos os compostos testados apresentaram atividade antiproliferativa significativa sobre as linhagens de glioma quando

comparados aos grupos controle. Os compostos LaSOM 63, LaSOM 65 e LaSOM 77 foram significativamente mais ativos que o LaSOM 61 na redução do número de células em ambas as linhagens celulares. Na linhagem tumoral humana, LaSOM 74 e LaSOM 75 também apresentaram-se significativamente mais ativos que o LaSOM 61.

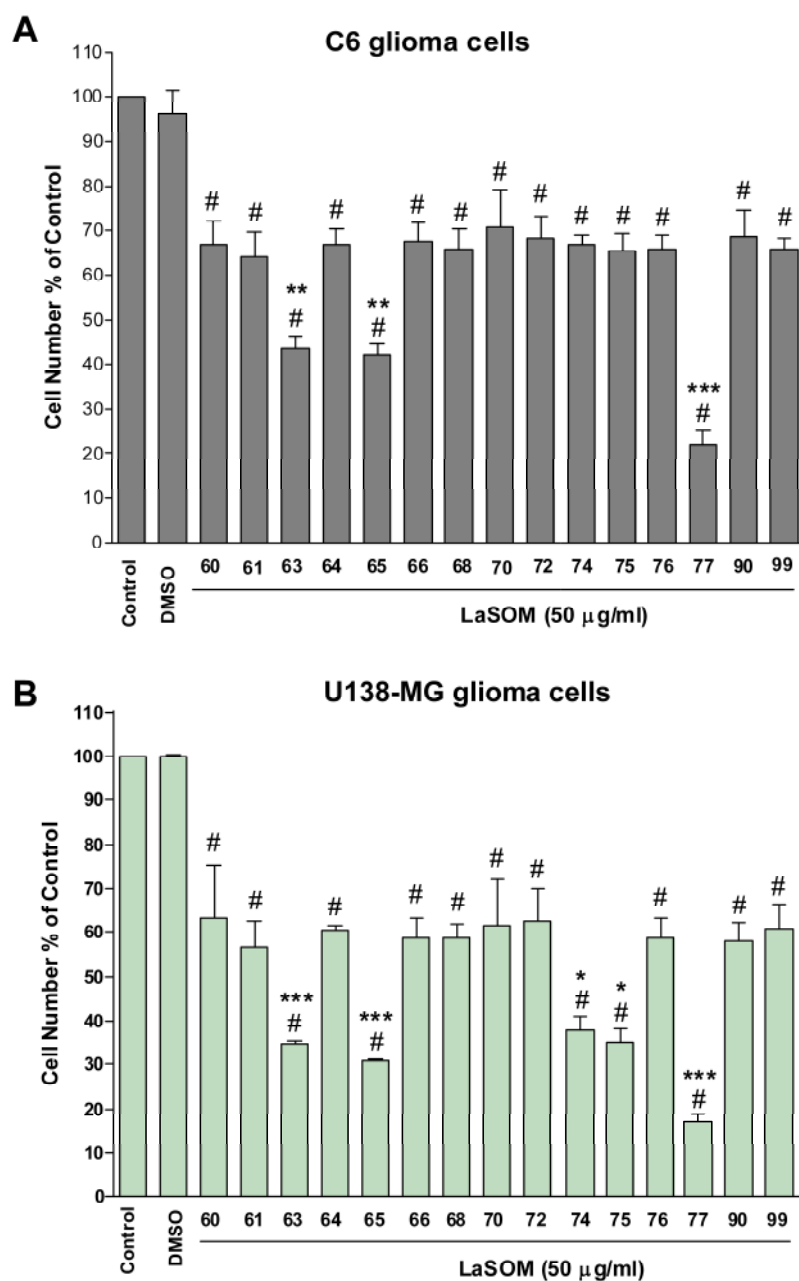


Figura 34. Efeito do LaSOM 61 e análogos na proliferação de células de glioma murino C6 (A) e humano U138-MG (B) na concentração de 50 µg/mL. #Significativamente diferente dos grupos controle e DMSO com $P < 0,01$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). *Significativamente diferente do grupo tratado com LaSOM 61, $P < 0,05$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey). *** Significativamente diferente do grupo tratado com LaSOM 61, $P < 0,001$ (ANOVA seguido do Teste de Tukey)

Através do ensaio de viabilidade celular, ou ensaio do MTT, obtêm-se uma medida quantitativa do número de células com mitocôndrias metabolicamente ativas. O ensaio é baseado na redução pela mitocôndria do brometo de tetrazolium, MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium, a um cromóforo, o formazan, cuja absorvância pode ser determinada através de medida espectrométrica. A medida de absorvância indicada é linearmente proporcional ao número de células vivas cujas mitocôndrias encontram-se ativas. Para confirmar os resultados dos ensaios de contagem celular foi verificado o efeito das mesmas moléculas utilizadas no ensaio de proliferação celular, na mesma concentração e tempo através do ensaio de viabilidade celular (**Figura 35**).

Conforme se pode observar na Figura 31, os efeitos citotóxicos das DHPMs sintetizadas foram confirmados através deste ensaio, em concordância com aqueles observados por contagem celular. Novamente, todos os compostos apresentaram atividade antiproliferativa em relação ao grupo controle. Os análogos LaSOM 63, LaSOM 65 e LaSOM 77 demonstraram atividade significativamente superior ao LaSOM 61 em ambas as linhagens celulares, sendo LaSOM 74 e LaSOM 75 também mais ativos que o LaSOM 61 na linhagem humana nesta concentração.

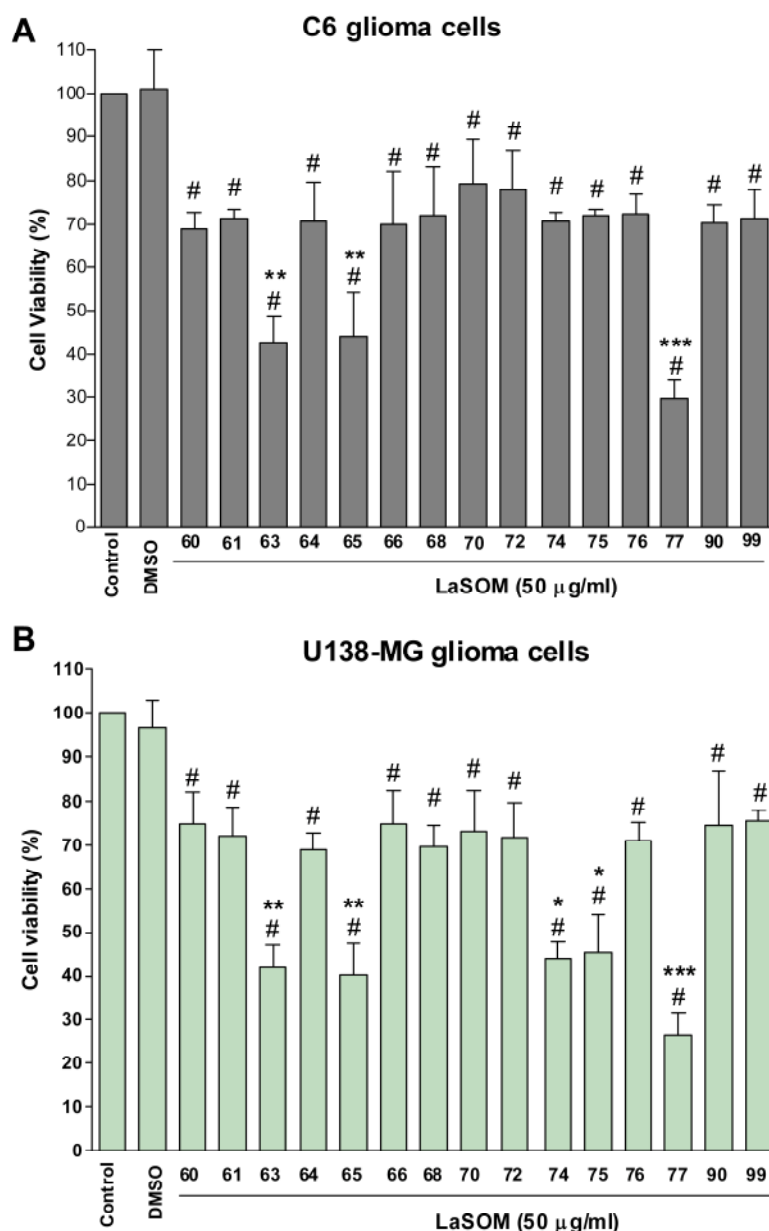


Figura 35. Efeito do LaSOM 61 e análogos na viabilidade celular de células de glioma murino C6 (A) e humano U138-MG (B) na concentração de 50 µg/mL. #Significativamente diferente dos grupos controle e DMSO, P<0,05 (ANOVA seguido do Teste de Tukey). *Significativamente diferente do grupo tratado com LaSOM 61, P<0,05 (ANOVA seguido do Teste de Tukey). * Significativamente diferente do grupo tratado com LaSOM 61, P<0,001 (ANOVA seguido do Teste de Tukey).**

A **Figura 36** mostra imagens representativas das células U118-MG controle, tratadas somente com DMSO e tratadas com 50µg/mL do LaSOM 61, LaSOM 63, LaSOM 65, LaSOM 74, LaSOM 75 e LaSOM 77 por 48h. Nota-se a diminuição do número total de células no tratamento com o LaSOM 61 quando comparado ao DMSO e controle. Como pode ser observado, quando as células são tratadas com os compostos LaSOM 63, LaSOM 65, LaSOM 74, LaSOM 75 e LaSOM 77, esta redução é mais evidente, confirmando os resultados dos ensaios de proliferação celular.

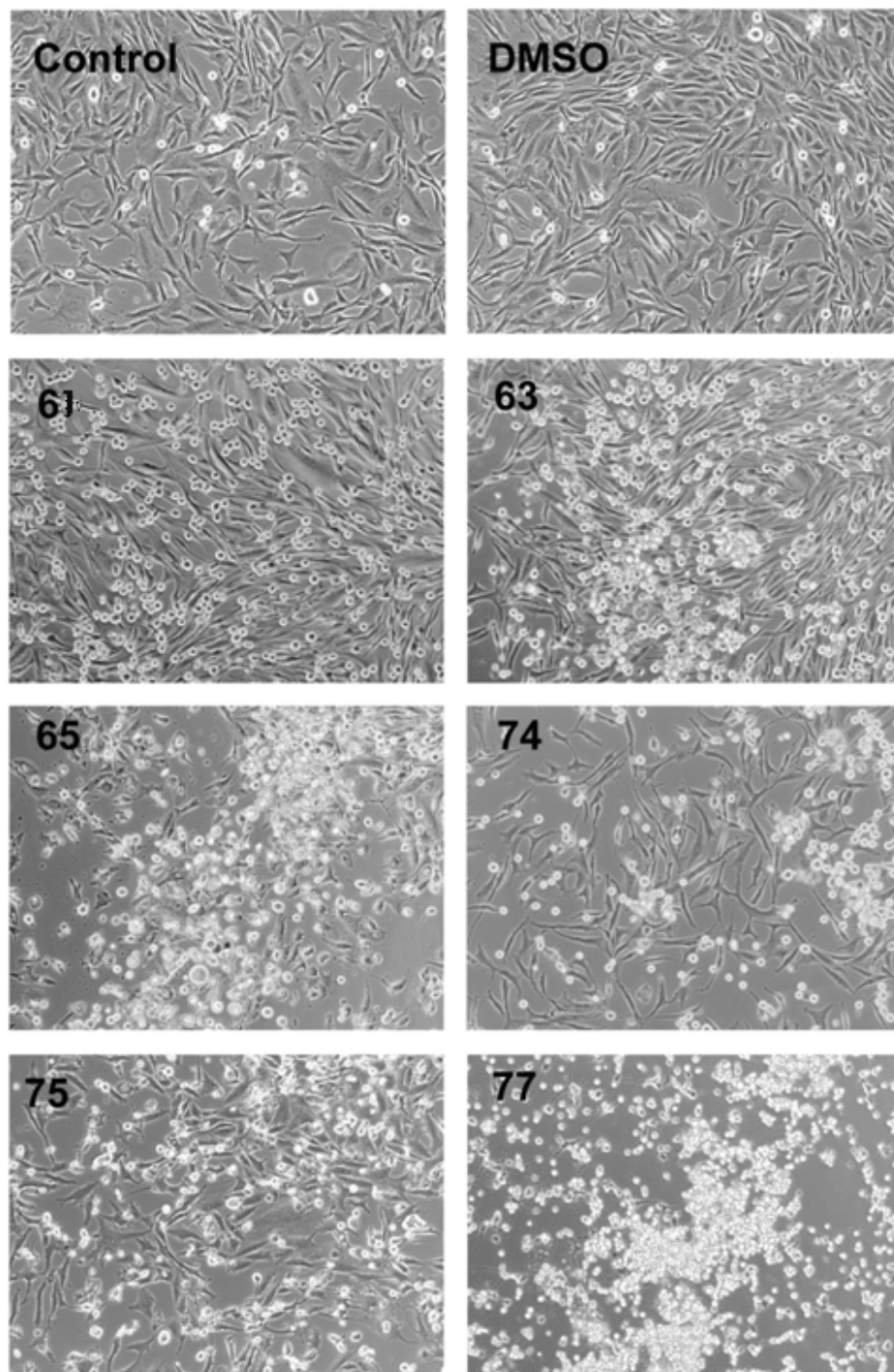


Figura 36. Imagens representativas de culturas de células de glioma humano U118-MG tratadas com os compostos LaSOM 61, LaSOM 63, LaSOM 65, LaSOM 74, LaSOM 75 e LaSOM 77 na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, assim como das células do grupo Controle e DMSO. As células foram visualizadas utilizando um microscópio invertido Nikon e as imagens correspondem à fotomicrografias de contraste. As imagens são representativas de três experimentos diferentes.

Uma constatação que fica evidente através da análise dos resultados é que os compostos contendo enxofre na posição 2 apresentaram maior efeito antiproliferativo sobre as linhagens tumorais testadas que aqueles contendo oxigênio nesta posição. Um resultado interessante foi a identificação do LaSOM 77, substituído com oxigênio na posição 2, como

o mais ativo que o LaSOM 61 na concentração testada. Conforme dados da literatura,²³ oxo-DHPMs não apresentam boa capacidade de se ligar à cinesina Eg5, o que reitera a hipótese de estas moléculas exercerem seu efeito citotóxico sobre as células tumorais através de mais de um mecanismo de ação. Entre os compostos que apresentaram redução no número de células significativamente superior que a causada pelo LaSOM 61, encontram-se tio análogos substituídos no anel aromático com diferentes padrões de substituição e grupos funcionais. O composto LaSOM 74 apresentou atividade significativamente superior ao seu análogo LaSOM 60, sugerindo que a alquilação no enxofre pode melhorar a atividade destes compostos.

2.5.2. Investigação do mecanismo de ação antitumoral sobre a Telomerase

Telômeros (do grego *telos*, final e *meros*, parte) são porções de DNA repetitivo que constituem as extremidades dos cromossomas (**Figura 37**). Sua principal função é manter a estabilidade estrutural dos cromossomas. Telômeros estão associados ao envelhecimento celular e do organismo como um todo.⁵⁰ A cada divisão celular, uma parte dos telômeros é perdida, levando ao encurtamento destas estruturas ao longo do tempo. Este processo de encurtamento leva as células a perderem sua capacidade de divisão celular levando à quiescência e ao envelhecimento celular. Um exemplo que demonstrou claramente este fato foi a polêmica clonagem da ovelha Dolly,⁵¹ que acabou envelhecendo e morrendo rapidamente. Devido ao clone ter sido gerado pela transferência nuclear do material genético de uma ovelha adulta, com os telômeros bastante encurtados, a ovelha Dolly ao ser gerada apresentava a mesma idade biológica da ovelha que a originou.

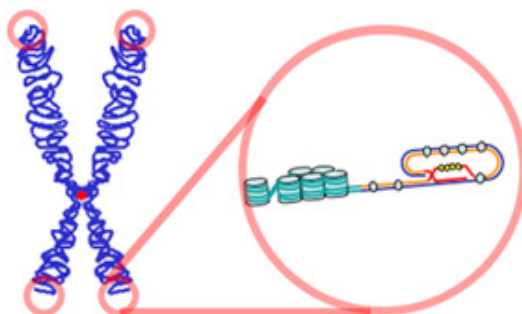


Figura 37. Cromossomo, com telômero em destaque

Células tumorais apresentam uma taxa mitótica muito alta e seria de se esperar que estas envelhecessem rapidamente através do processo de encurtamento dos telômeros. Porém estas células apresentam alta expressão da enzima telomerase, a qual repara os

telômeros ao longo das divisões celulares levando às células à imortalidade.⁵² Foi demonstrado que aproximadamente 90% dos tipos de câncer prevalentes em humanos apresentam maior expressão esta enzima, quando comparado à maior parte das células somáticas.⁵⁴ Desta maneira a telomerase foi indicada como um novo alvo para o planejamento de fármacos antitumorais, apresentando grande potencial em termos de seletividade da sua ação citotóxica.⁵⁴

Sequências de DNA ricas em guanidinas, como as presentes nos telômeros, podem se agrupar em uma conformação conhecida como *DNA quadruplex* (**Figura 38**). Quando os telômeros estão agrupados desta maneira, a telomerase não consegue exercer sua ação de reparo dos telômeros encurtados, assim não sendo capaz de promover a imortalidade das células tumorais.⁵⁵ Desta maneira vêm sendo demonstrado que moléculas capazes de ligarem-se seletivamente e estabilizar estes fragmentos de DNA quadruplex apresentam grande potencial como agentes antitumorais.⁵⁶

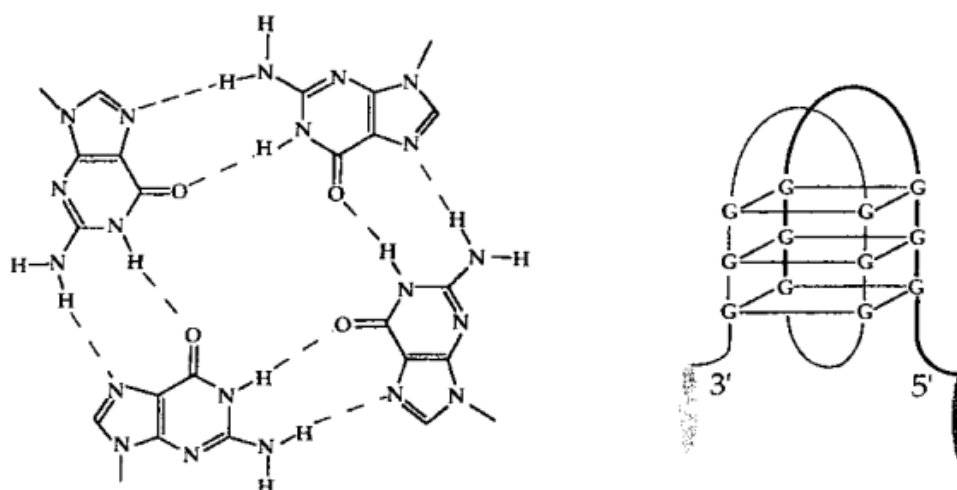


Figura 38. Arranjo G-quadruplex entre as bases guanidina e estrutura tridimensional adotada nas regiões de DNA quadruplex

2.5.2.1. Materiais e métodos

Doze DHPMs sintetizadas foram testadas quanto à estabilização do DNA quadruplex. Estes ensaios foram realizados pelo pesquisador Dr. Khondaker M. Rahman em trabalho de colaboração com o grupo de pesquisa liderado pelo Professor David E. Thurson, *Gene Targeted Drug Design Research Group, School of Pharmacy, University of London* em Londres, Inglaterra.

Os compostos foram testados utilizando um ensaio de fusão de DNA - *Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) based DNA melting assay* - otimizado pelo grupo do Dr. Thurson.⁵⁶ Este ensaio leva em conta a temperatura de fusão do DNA (T_m) e a diferença das temperaturas de fusão dos DNAs tratados com os compostos, em relação ao DNA tratado somente com o veículo (dT_m). A interpretação dos resultados está baseada no fato de que compostos que interagem com a seqüência quadruplex estabilizando-a levam a um aumento no T_m observado. Portanto, quanto maior o dT_m , maior a capacidade de estabilizar a seqüência quadruplex do composto. O ensaio para DNA duplex avalia a seletividade dos compostos para as seqüências quadruplex em relação a dupla hélice de DNA.

2.5.2.1.1. Compostos avaliados

Os compostos investigados nos ensaios de avaliação da capacidade estabilizante de DNA quadruplex são apresentados na **Figura 39**.

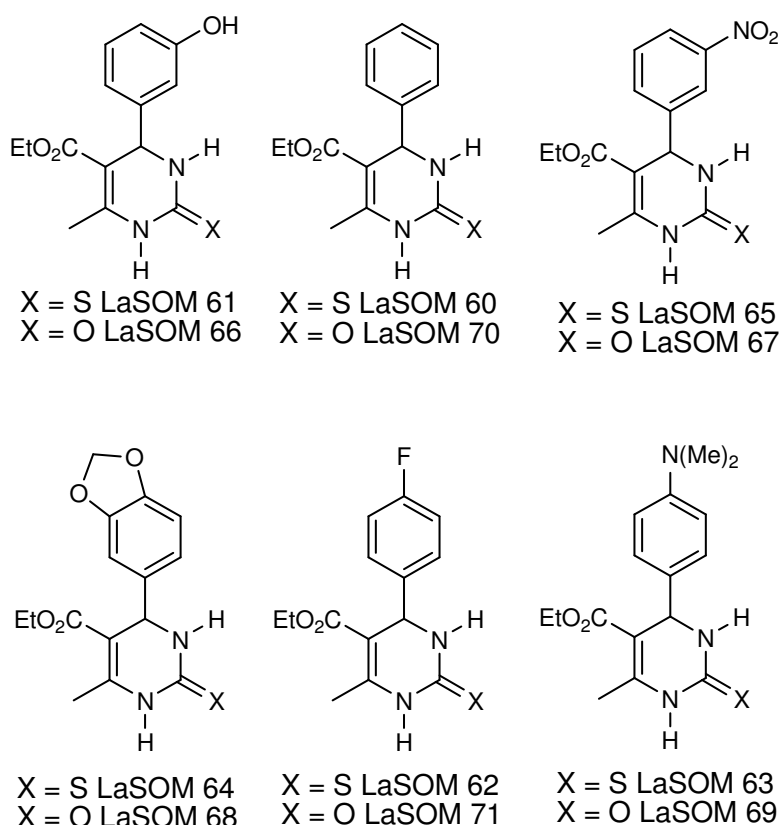


Figura 39. DHPMs avaliadas quanto à ação estabilizante sobre seqüências de DNA quadruplex

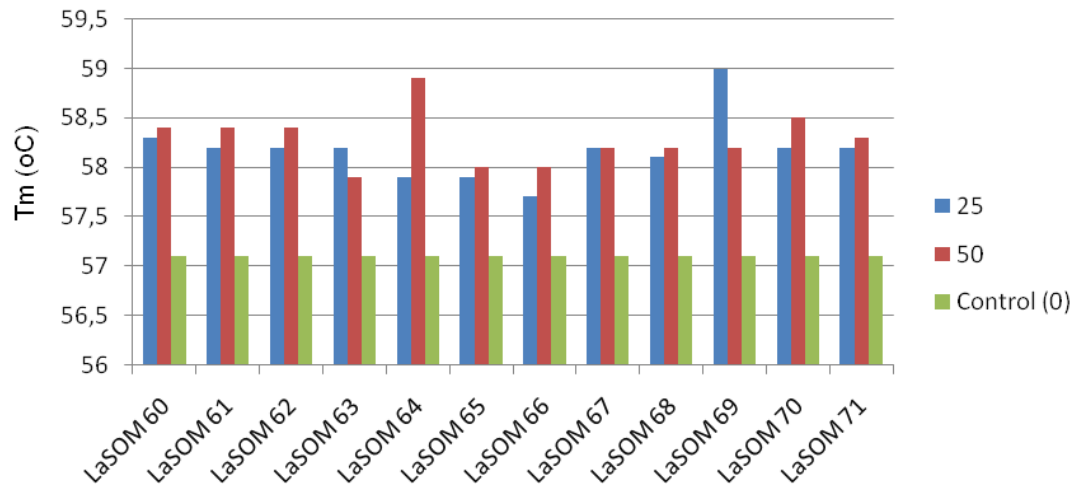
2.5.2.2. Resultados e Discussão

As DHPMs apresentadas na **Figura 39** foram avaliadas nas concentrações de 50 μM e 25 μM contra 3 diferentes sequências de Quadruplex (F21T, CKit1 e CKit2), e também contra uma sequência de DNA duplex.

As **Figuras 40-43** apresentam os resultados obtidos para as DHPMs sintetizadas. Os resultados mostram que todos os compostos sintetizados estabilizam fracamente as sequências Quadruplex (**Figuras 40-42**) e de DNA duplex (**Figura 43**). O aumento das concentrações apresenta apenas um pequeno efeito sobre o grau de estabilização. As moléculas são ligantes fracos, mas não podem ser classificados como não ligantes, uma vez que em todos os casos elas apresentaram alguma propriedade estabilizante de Quadruplex e DNA duplex quando comparado ao controle.

Todos os análogos comportaram-se de maneira semelhante contra as sequências de DNA e nenhum deles parece ter um perfil de atividade excepcional. Desta maneira pode-se observar que tanto a variação da posição 2 entre oxigênio e enxofre, quanto a variação no padrão de substituição no anel aromático não causam efeitos significativos na interação das DHPMs com as fitas de DNA.

F21T results Tm



F21T results dTm

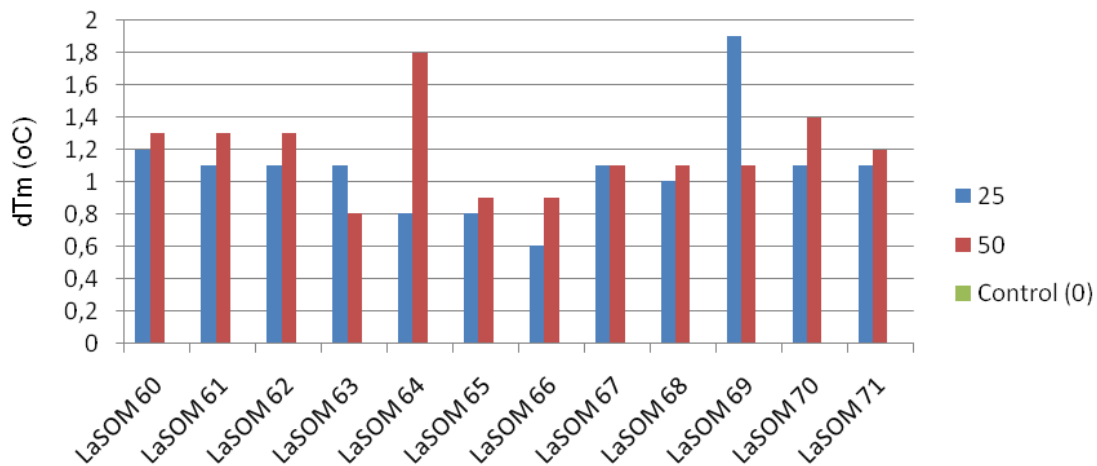


Figura 40. Avaliação dos compostos sintetizados nas concentrações de 25 e 50 µM quanto à estabilização da sequência de DNA quadruplex F21T. Tm (temperatura de fusão), dTm (diferença de Tm em relação ao controle).

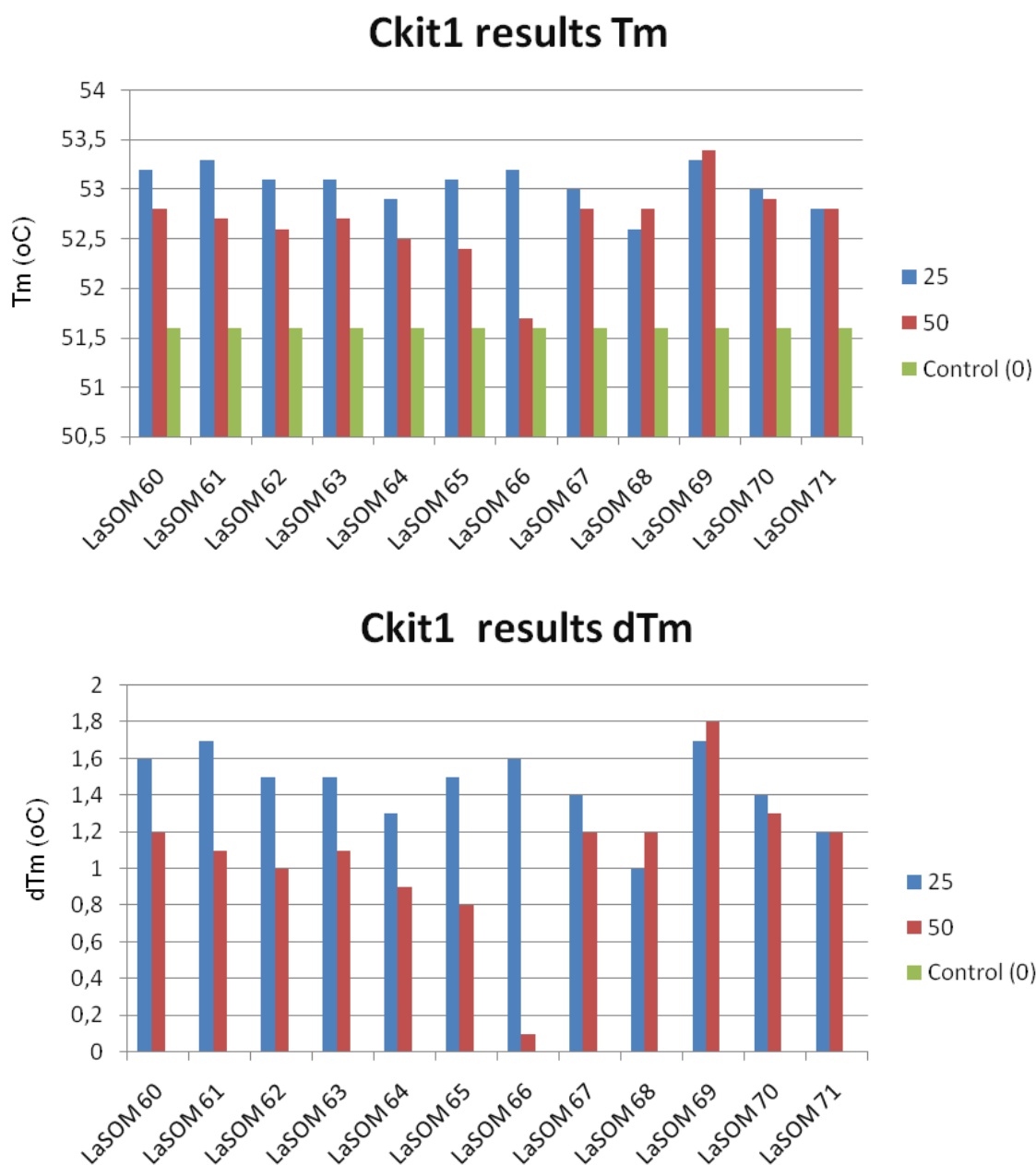


Figura 41. Avaliação dos compostos sintetizados nas concentrações de 25 e 50 μ M quanto à estabilização da seqüência de DNA quadruplex CKit1. Tm (temperatura de fusão), dTm (diferença de Tm em relação ao controle).

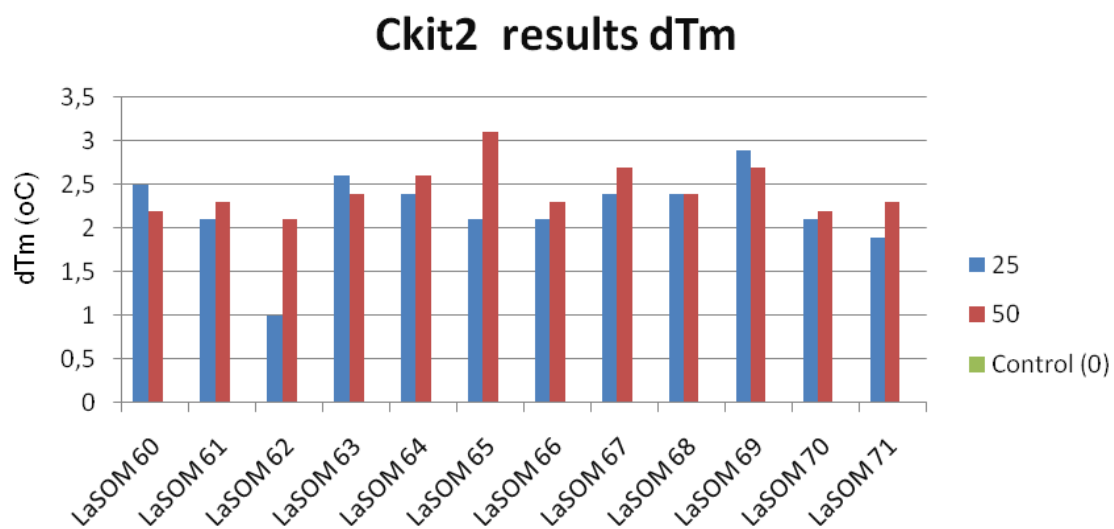
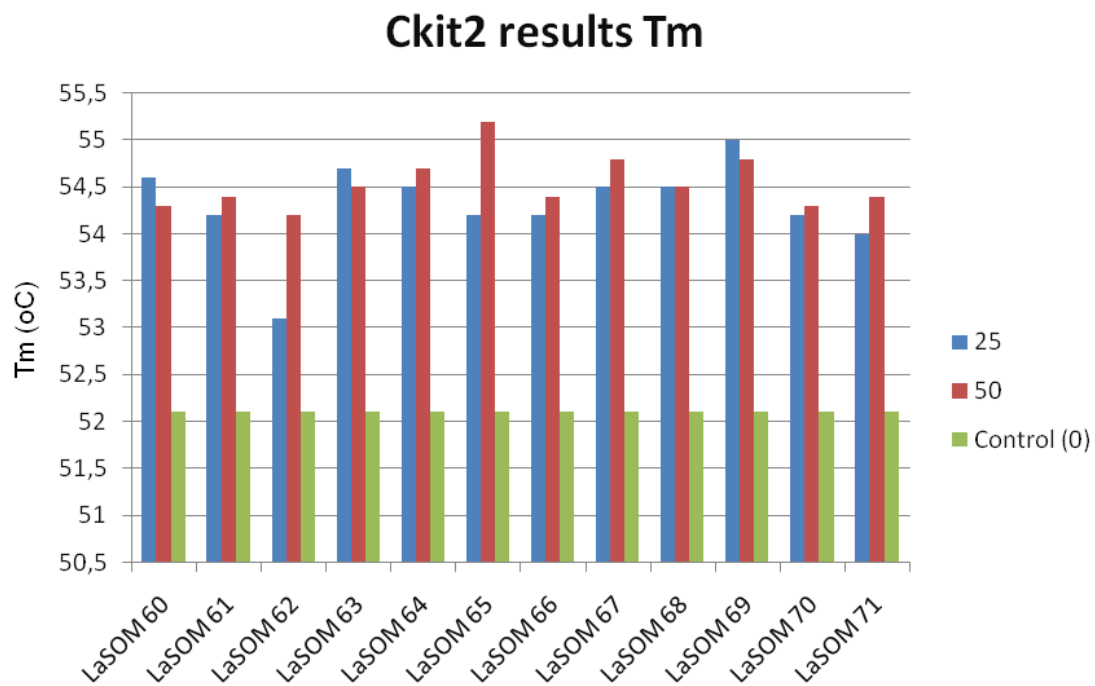


Figura 42. Avaliação dos compostos sintetizados nas concentrações de 25 e 50 μ M quanto à estabilização da seqüência de DNA quadruplex CKit2. Tm (temperatura de fusão), dTm (diferença de Tm em relação ao controle).

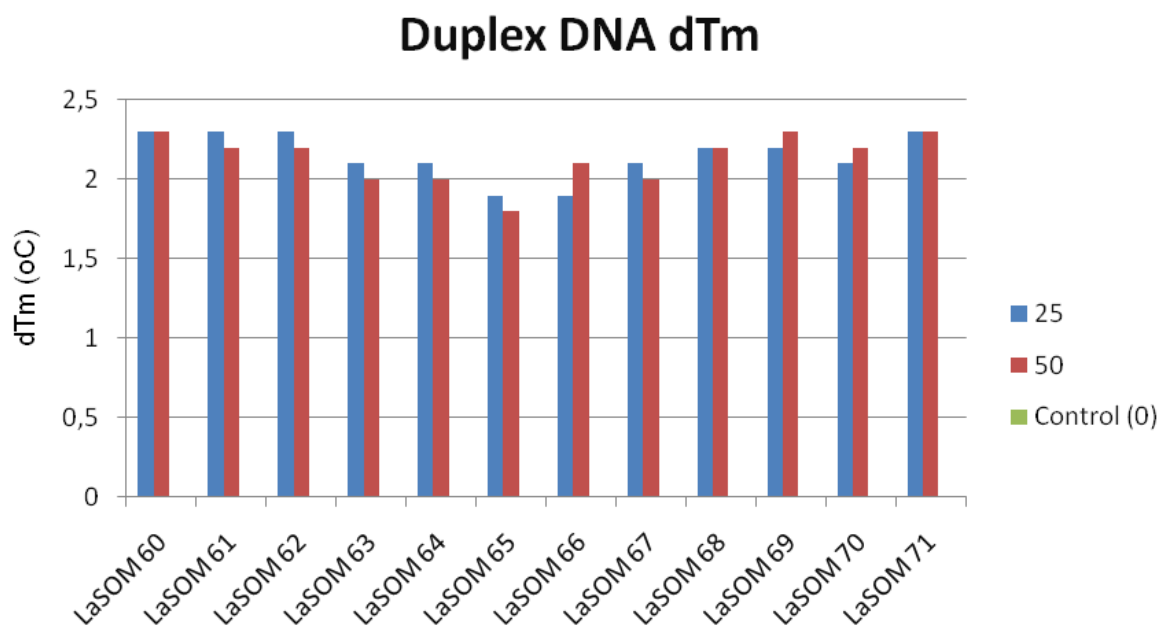
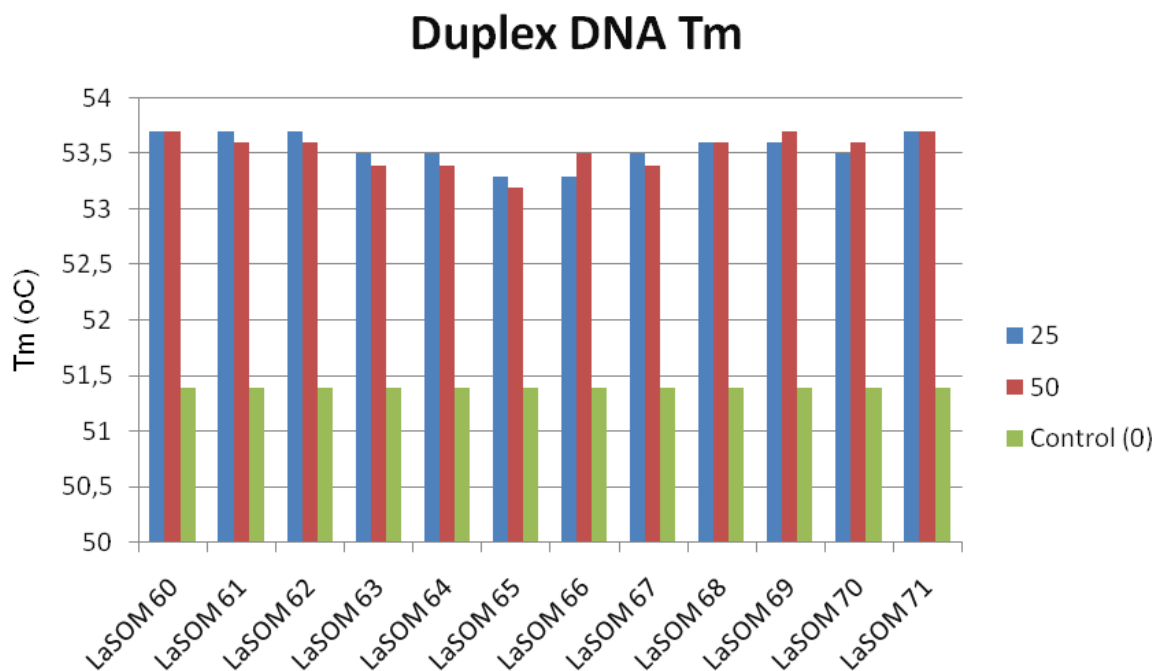


Figura 43. Avaliação dos compostos sintetizados nas concentrações de 25 e 50 µM quanto à estabilização da seqüência de DNA duplex. Tm (temperatura de fusão), dTm (diferença de Tm em relação ao controle).

2.5.3. Investigação do efeito antitumoral *in vivo*

Os ensaios iniciais para verificação da atividade antitumoral *in vivo* foram realizados em colaboração com a professora Dra Teresinha Gonçalves da Silva no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2.5.3.1. Materiais e métodos

2.5.3.1.1. Animais

Foram utilizados um total de 48 camundongos Swiss machos (25-30 g), obtidos do biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (8/grupo). Os animais foram mantidos em gaiolas com acesso livre à água e comida. Todos os animais foram mantidos em ciclos claro-escuro 12h:12h, com as luzes sendo acesas às 6:00 a.m. Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A comissão de estudos animais da Universidade Federal de Pernambuco aprovou os protocolos experimentais (protocolo número 116/07). As células tumorais de Sarcoma 180 foram mantidas na cavidade intraperitoneal dos camundongos Swiss no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cancerologia da Universidade Federal de Pernambuco.

2.5.3.1.2. Ensaios de atividade antitumoral

Células tumorais ascíticas de Sarcoma 180 com 10 dias (5×10^6 céls/200 μ L) foram impladas pela via subcutânea na região da axila direita dos camundongos experimentais. Um dia após a inoculação, os compostos LaSOM 61, 63, 64, 65 (90 mg/kg) ou a Doxorrubicina (2 mg/Kg) foram dissolvidos em solução salina contendo 10% de etanol e administrados pela via intraperitoneal durante 7 dias. Ao controle negativo foi administrado somente o veículo. No 8º dia, os camundongos foram sacrificados e os tumores foram excisados, pesados e fixados com formaldeído 10%. A taxa de inibição (%) foi calculada através da seguinte fórmula: taxa de inibição (%) = $[(A-B)/A] \times 100$, onde A é a massa média dos tumores do controle negativo, e B é o peso do tumor do grupo tratado.

2.5.3.1.3. Compostos avaliados

Os compostos avaliados quanto à sua ação antitumoral no modelo de Sarcoma-180 são apresentados na **Figura 44**.

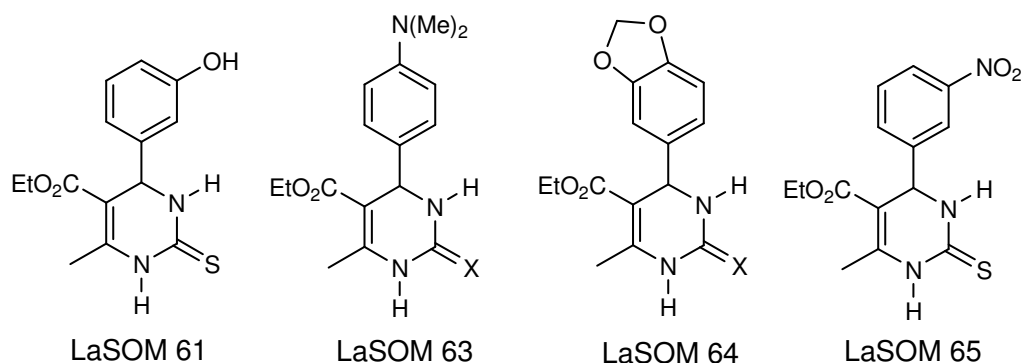


Figura 44. DHPMs avaliados quanto à sua ação antitumoral no modelo de Sarcoma-180 em camundongos

2.5.3.2. Resultados e Discussão

Para os testes *in vivo* foram selecionados os compostos LaSOM 61, LaSOM 63, LaSOM 64 e LaSOM 65. Estas DHPMs foram selecionadas em função das atividades encontradas *in vitro* na literatura para o LaSOM61 e o LaSOM 64, e também nos ensaios de glioma expostos neste capítulo. LaSOM 63 e LaSOM 65 foram selecionados em função de terem apresentado os melhores níveis de atividade frente aos testes realizados com glioma apresentados anteriormente neste trabalho. Os resultados dos ensaios antitumorais *in vivo* realizados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Efeito das DHPMs sintetizadas em ratos transplantados com o tumor sarcoma 180. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão de 8 animais.

Composto	Dose (mg/kg)	Peso do tumor (g)	Inibição (%)
Controle		2,40 \pm 0,31	
LaSOM61	90	1,12 \pm 0,14	53,0
LaSOM 63	90	1,24 \pm 0,09	48,4
LaSOM 64	90	0,67 \pm 0,15	72,0
LaSOM 65	90	0,58 \pm 0,13	76,0
Doxorrubicina	2	0,71 \pm 0,12	61,1

Conforme pode-se analisar na Tabela 15, as 4 DHPMs testadas apresentaram efeito antitumoral na dose de 90mg/kg pela via ip. Os compostos mais ativos nesta dose foram o

LaSOM 64 e o LaSOM 65, os quais inibiram o crescimento do tumor em mais de 70% do seu peso em relação ao controle não tratado. Contudo, os resultados não podem ser comparados com o obtido com o padrão doxorrubicina devido à grande diferença de dose entre estes. Para que possa ser feita a comparação entre estes compostos deve-se fazer uma curva dose-resposta e calcular os valores de EC50.

Esses mesmos compostos também foram avaliados quanto à sua toxicidade hematológica, uma vez que muitos agentes antitumorais podem causar anemia e leucopenia devido à sua ação inespecífica sobre as células tumorais. Os resultados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Avaliação da toxicidade hematológica das DHPMs sintetizadas em camundongos saudáveis e transplantados com o tumor sarcoma 180. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão de 8 animais.

	Dose (mg/kg)	Hemoglobina (g/dl)	Leucócitos Totais (10^3 cell/ μ L)	Contagem diferencial de leucócitos (%)		
				Granulocitos	Monocitos	Linfocitos
Camundongo sadio		15,5 \pm 0.5	12.1 \pm 1.6	15.7 \pm 2.8	5.3 \pm 1.1	65.9 \pm 10
Camundongo com S-180		7.3 \pm 1.3	15.8 \pm 2.4	28.2 \pm 8.2	18.3 \pm 3.7	53.5 \pm 7.9
LASOM 61	90	7.0 \pm 0.7	10 \pm 1.9	16.3 \pm 3.9	19.8 \pm 2.5	63.9 \pm 4.2
LASOM 63	90	9.7 \pm 0.6	10.7 \pm 1.5	36.5 \pm 2.4	18.0 \pm 1.5	45.5 \pm 2.8
LASOM 64	90	7.8 \pm 0.5	9.9 \pm 0.9	28.3 \pm 5.5	22.6 \pm 2.4	49.1 \pm 5.4
LASOM 65	90	7.8 \pm 0.5	10.5 \pm 0.9	30.0 \pm 3.2	19.9 \pm 3.0	50.1 \pm 2.9

Conforme podemos ver na Tabela 16, o camundongo portador do Sarcoma 180, quando comparado ao animal sadio, apresenta uma queda nos níveis de hemoglobina sanguínea, o que é normal na doença crônica, acompanhado de um aumento do número total de leucócitos, principalmente granulócitos e monócitos. Este aumento de células de defesa pode estar relacionado ao neoplasma (reação paraneoplásica). Nota-se que todos os grupos tratados também sofreram queda de hemoglobina, assim como o grupo não tratado, parecendo, assim, que os compostos não influenciam neste parâmetro. O grupo tratado com o LaSOM 63 apresentou menor nível de anemia que o animal não tratado, porém ainda assim apresenta-se mais anêmico que os animais saudáveis. Os ratos sem tratamento aumentaram o número de glóbulos brancos em relação ao animal sadio, enquanto os grupos tratados diminuíram o número total de glóbulos brancos, o que pode indicar efeito dos compostos na produção medular destes glóbulos. As diferenças no leucograma podem ser devido ao mecanismo de morte celular promovida pelos compostos, uma vez que tipos

celulares como os monócitos apresentam elevação quando há intensa morte celular, pois estes se transformam em macrófagos e englobam restos celulares.

2.6. Avaliação Farmacocinética do LaSOM 65

Os resultados dos ensaios *in vivo* previamente realizados com o LASOM 65, tornaram-no um composto de interesse e o avanço nas etapas do desenvolvimento desta molécula é relevante face a real possibilidade de avançar para fase clínica de avaliação como agentes antitumoral. O desenvolvimento de fármacos anticancerígenos é diferenciado em relação ao desenvolvimento de outros agentes terapêuticos, pois, por serem agentes extremamente tóxicos, as fases clínicas não são realizadas em voluntários sadios, sendo seu primeiro uso em humanos realizado em pacientes que não são responsivos a outros tratamentos com agentes antitumorais tóxicos. Dessa forma, o risco de óbito desses pacientes se torna muito alto, pois já estão debilitados pela doença e pelos tratamentos anteriores testados.⁷³

Nesse contexto, os candidatos a agentes antitumorais devem ter dados pré-clínicos que predigam com a máxima precisão os efeitos esperados em humanos. Na fase pré-clínica do desenvolvimento desses fármacos é considerada essencial a realização de estudos farmacodinâmicos, visando identificar o mecanismo de ação, estudos farmacocinéticos para avaliar a disposição corporal da droga e estudos toxicológicos, visando determinar a dose máxima tolerada, tanto em modelos animais com roedores e com não-roedores.⁷⁴

Considerando o exposto, a avaliação do potencial de aplicação clínico do LASOM 65 exige que sejam realizados estudos farmacocinéticos pré-clínicos em roedores tendo como objetivo completar as informações necessárias para que se iniciem os estudos clínicos em humanos deste promissor agente terapêutico.

O composto LaSOM 65 não apresenta estudos detalhados de farmacocinética na literatura. Na década de 90, Atwal e colaboradores,⁷⁵ trabalhando no desenvolvimento de fármacos anti-hipertensivos pela então recém formada *Bristol-Myers Squibb Company*, descreveram este composto como o metabólito inativo da substância anti-hipertensiva que estava em desenvolvimento. Foi demonstrado que o composto em desenvolvimento, que consistia em um análogo ao LaSOM 65 contendo um grupamento etil carbamato como

substituinte na posição N3, sofre rápida metabolização de primeira passagem quando administrado pela via oral em ratos. Seu metabólito, inativo na hipertensão, o LaSOM 65, apresenta uma concentração plasmática média de 4000 ng/mL 1 h após a administração oral de 53 mg/kg do seu “pró-fármaco” a ratos. A informação mostrada na **Figura 45** é uma das poucas, senão a única informação referente à farmacocinética deste composto encontrada na literatura.

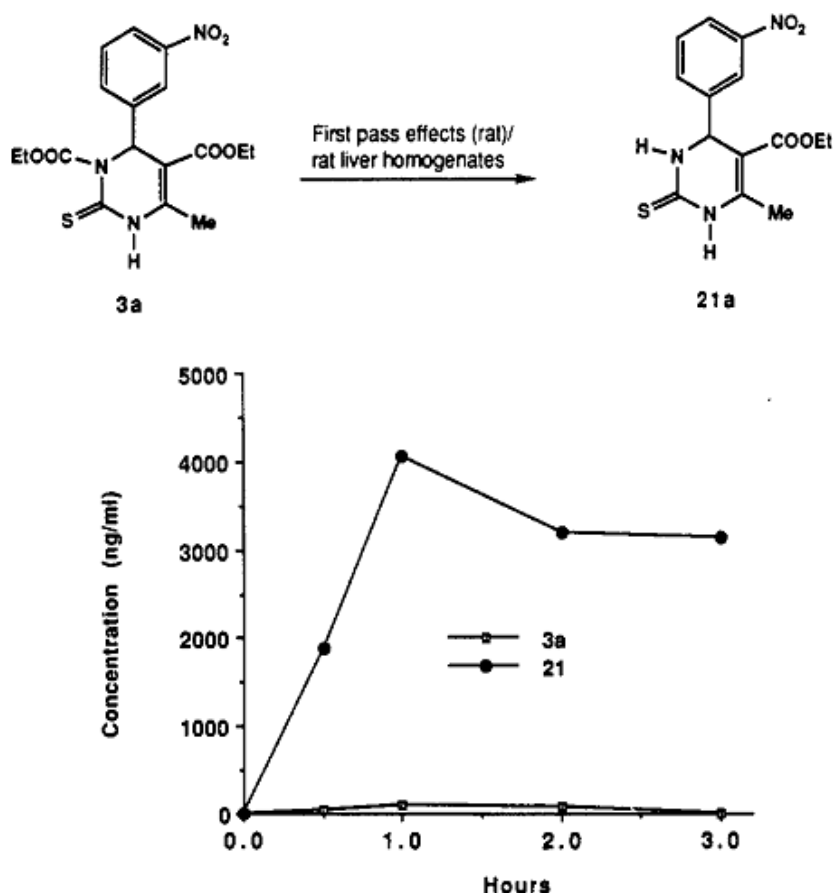


Figura 45. Perfil plasmático do LaSOM 65 (21a) após administração oral de 53 mg/kg de seu “pró-fármaco” (3a) . Adaptado de Atwal et al⁷⁵

2.6.1. Materiais e Métodos

2.6.1.1. Metodologia analítica para a quantificação do LaSOM 65

O desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação do LaSOM 65 foi realizado acordo com as normas especificadas para validação de métodos bioanalíticos⁷⁶ através do uso de HPLC-UV (metodologia previamente estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa).

2.6.1.2. Considerações éticas em relação aos animais experimentais

Essa etapa do projeto foi realizado no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Protocolo 2008196).

Os animais (ratos Wistar) foram procedentes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e permaneceram no biotério da Faculdade de Farmácia até o momento de sua utilização, que não foi superior a 30 dias após seu recebimento. O biotério possui condições ambientais controladas como temperatura, ventilação, umidade, sanitização e iluminação (ciclo claro-escuro) adequada para roedores.

Os animais receberam ração padronizada (Nuvital[®]) em quantidade e qualidade para a manutenção de sua saúde, tendo livre acesso à água potável

Foi assegurado aos animais a ingestão de água e alimentos quando as coletas de sangue foram prolongadas. Como a farmacocinética do derivado LASOM 65 não era conhecida até o momento, não foi administrada outra substância durante os experimentos, o que poderia interferir com as medidas.

Após a experimentação, todos os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. As carcaças foram acondicionadas e depositadas em freezer especial da Faculdade de Farmácia, sendo coletados pela empresa Aborgama do Brasil.

2.6.1.3. Avaliação Farmacocinética do LaSOM 65

Os ensaios de avaliação farmacocinética do LaSOM 65 foram realizados em colaboração com a Professora Teresa Dalla Costa e com a Dra. Flávia Uchôa da Faculdade de Farmácia/UFRGS.

Para a avaliação do perfil farmacocinético do LASOM 65 foram utilizados ratos Wistar machos adultos (n = 4 a 8/grupo), com massa corporal variando entre 200 e 300 g, de acordo com a técnica descrita por Tasso e colaboradores.⁷⁷ Os animais receberam a substância nas doses de 20, 10 e 1 mg/kg i.v. *bolus*, e 30 e 90 mg/kg via intraperitoneal. A escolha das doses foi feita em relação aos estudos *in vivo* apresentados neste capítulo no item (3.3).

O LaSOM 65 foi formulado na forma de solução (1 mg/mL) ou suspensão (> 10 mg/mL) aquosa. A formulação empregada para a administração do LaSOM 65 pela via intravenosa (iv) (1 mg/mL) consistia de 3% DMSO + 3% Tween[®] 80 + solução glicosada (5%) e para administração intraperitoneal (ip) (10 mg/mL) consistia de 5% DMSO + 5% Tween[®] 80 + solução glicosada (5%).

A administração iv foi realizada na veia caudal lateral dos animais imobilizados em caixas de contenção. Após a administração do LASSOM 65, foram coletadas, em tempos pré-determinados (pré-dose, 5, 15, 20, 30, 60, 90, 180, 270 e 360 min) amostras de sangue da veia caudal lateral dos animais. As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação (6800 g, 10 min, 4 °C). O plasma foi separado e congelado (-80 °C) até o momento de sua análise por HPLC-UV. Após administração ip as coletas foram feitas também pela veia lateral caudal nos tempos 15, 30, 45, 90, 180, 270, 360, 480 e 720 min e o sangue foi processado e armazenado do mesmo modo.

2.6.1.4. Avaliação do perfil de concentração plasmática versus tempo do LaSOM 65

Os perfis farmacocinéticos plasmáticos da substância foram analisados por abordagem não-compartimental utilizando modelos descritos por Gibaldi e Perrier (1982),⁷⁸ com auxílio do programa Excel[®] 2002 (Microsoft[®]).

A partir do perfil de concentração plasmática do LASOM 65 versus tempo foram determinados os parâmetros farmacocinéticos: constante de velocidade de eliminação, tempo de meia-vida, área sob a curva de concentração plasmática por tempo, depuração total (*clearance*), biodisponibilidade, volume de distribuição no *steady state*, tempo de residência médio no plasma utilizando as equações listadas a seguir. Além disso, foram determinados a concentração plasmática máxima e o tempo necessário para obtê-la após a administração intraperitoneal, através de inspeção visual dos perfis.

A constante de velocidade de eliminação (λ) foi calculada pela inclinação da fase terminal da curva log-linear dos perfis de concentração por tempo de cada animal, empregando-se os últimos 3 ou 4 pontos dos perfis. A partir do valor de λ determinado, foi calculado o tempo de meia-vida da substância pela equação (1) a seguir:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (1)$$

A área sob a curva de concentração plasmática (ASC) é um indicativo de extensão de absorção. Esta foi calculada pelo método trapezoidal dos tempos 0 a t (ASC_{0-t}), onde t é o último tempo de coleta. Essa área foi acrescida da área sob a curva extrapolada (ASC_{ext}) resultando na área sob a curva total ($ASC_{0-\infty}$), conforme as equações 2 e 3:

$$ASC_{0-t} = \frac{(C_0+C_1)}{2} (t_1 - t_0) + \frac{(C_1+C_2)}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{(C_{t-1}+C_t)}{2} (t_t - t_{t-1}) \quad (2)$$

$$ASC_{ext} = \frac{C_t}{\lambda} \quad (3)$$

onde C_t é concentração plasmática no último tempo de coleta e C_{t-1} é a concentração plasmática no penúltimo tempo de coleta.

O *clearance* total foi estimado pela equação 4, onde D é a dose administrada e f (equação 5) é a biodisponibilidade da via em relação à via iv. Os valores de $t_{m\acute{a}x}$ e $C_{m\acute{a}x}$ foram estimados diretamente a partir do gráfico do perfil individual de concentração por tempo.

$$Cl_{tot} = \frac{f * D}{ASC_{0-\infty}} \quad (4)$$

$$f = \frac{ASC_{0-\infty} LaSOM_{\text{es}} * D LaSOM_{\text{es iv}}}{ASC_{0-\infty} LaSOM_{\text{es iv}} * D LaSOM_{\text{es}}} \quad (5)$$

A área sob a curva de primeiro momento ($ASMC_{0-\infty}$) foi determinada pelo método trapezoidal (equações 6 e 7) somando-se o valor obtido até o tempo t com o valor de $ASMC_{ext}$.

$$ASMC_{0-t} = \left(\frac{(C_0 * t_0) + (C_1 * t_1)}{2} \right) (t_1 - t_0) + \dots + \left(\frac{(C_{t-1} * t_{t-1}) + (C_t * t)}{2} \right) \quad (6)$$

$$ASMC_{ext} = \left(\frac{C_t * t}{\lambda} \right) + \left(\frac{C_t}{\lambda^2} \right) \quad (7)$$

Para os dados de administração iv, foi calculado o tempo de residência médio (MRT) a partir dos valores de $ASC_{0-\infty}$ e $ASMC_{0-\infty}$ (equação 8). Também para os dados de administração iv, foi determinado o Vd_{SS} pela equação 9.

$$MRT_{iv} = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad (8)$$

$$Vd_{SS} = MRT_{iv} * Cl_{tot} \quad (9)$$

2.6.2. Resultados e Discussão

2.6.2.1. Avaliação Farmacocinética do LaSOM 65

A administração do LaSOM 65 pela via intravenosa nas doses de 20 mg/kg e 10mg/kg não pôde ser analisada quanto ao seu perfil farmacocinético pois essas doses foram letais. Desta maneira a dose foi reduzida para 1 mg/kg. O perfil plasmático médio obtido após administração desta dose está apresentado na **Figura 46**.

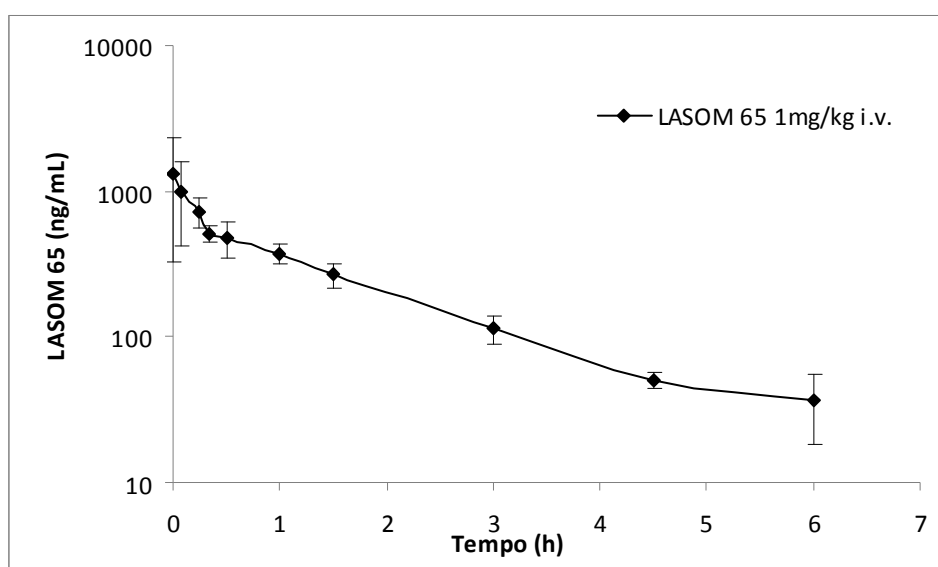


Figura 46. Perfil de concentração plasmática médio do LaSOM 65 após administração intravenosa *bolus* da dose 1 mg/kg ratos Wistar machos (n = 8) (média \pm DP)

Os perfis individuais permitiram a determinação dos parâmetros farmacocinéticos médios por abordagem não-compartimental conforme apresentados na Tabela 18. O pré-requisito para a análise farmacocinética dos perfis plasmáticos é a realização de coletas por um tempo que corresponda a, pelo menos, 80% da $ASC_{0-\infty}$ calculada com base neste perfil. Para garantir o cumprimento deste pré-requisito foram realizadas coletas até 6 h após a administração do fármaco assegurando a confiabilidade no cálculo dos parâmetros, principalmente aqueles relacionados com a fase de eliminação das substâncias. Como se determinou um tempo de meia-vida de 1,7 h, as coletas corresponderam a pelo menos três $t_{1/2}$ da substância, e a $ASC_{extrapolada}$ variou de 3 a 14,5%, assegurando o cumprimento do critério.

Tabela 18. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por análise não-compartimental dos perfis plasmáticos individuais após administração iv *bolus* do LaSOM 65 na dose de 1 mg/kg (n = 8).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± DP
ke (h ⁻¹)	0,427 ± 0,103
t _{1/2} (h)	1,7 ± 0,4
ASC _{0-∞} (ng*h/mL)	1240 ± 187
CL (L/h/kg)	0,82 ± 0,12
Vd (L/kg)	1,76 ± 0,33
MRT (h)	2,2 0,4

Pode-se observar que o tempo de meia-vida foi curto ($0,427 \pm 0,103 \text{ h}^{-1}$), o *clearance* foi elevado ($0,82 \pm 0,12 \text{ L/h/kg}$) e o volume de distribuição ($1,76 \pm 0,33 \text{ L/kg}$) indicou uma boa penetração tecidual.

A **Figura 47** mostra o perfil plasmático médio do LaSOM 65 após a administração intraperitoneal da dose de 30 mg/kg. Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da análise não-compartimental estão apresentados na Tabela 19.

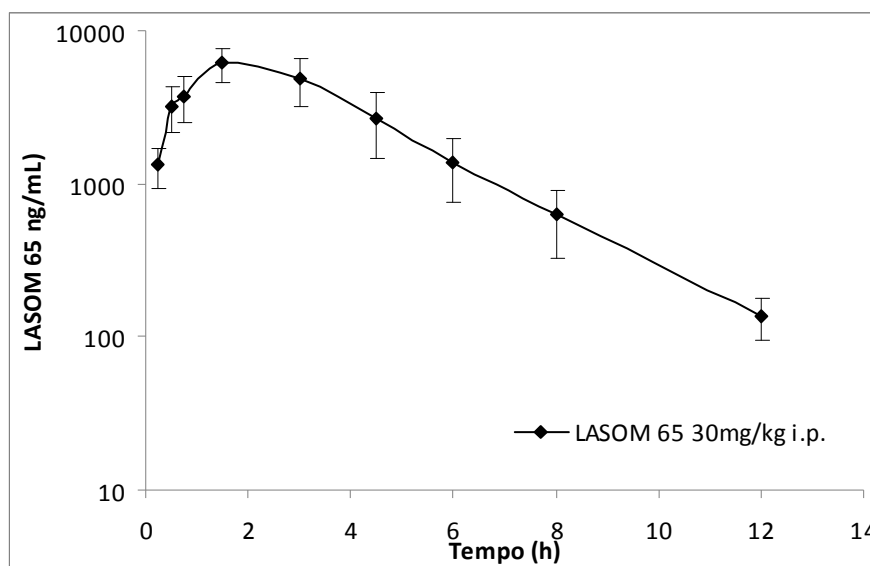


Figura 47. Perfil plasmático médio do LaSOM 65 após uma dose única ip de 30 mg/kg a ratos Wistar machos (n = 7) (média ± DP).

A **Figura 48** mostra o perfil plasmático médio do LaSOM 65 após a administração intraperitoneal da dose de 90 mg/kg. Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da análise não-compartimental estão apresentados na Tabela 19.

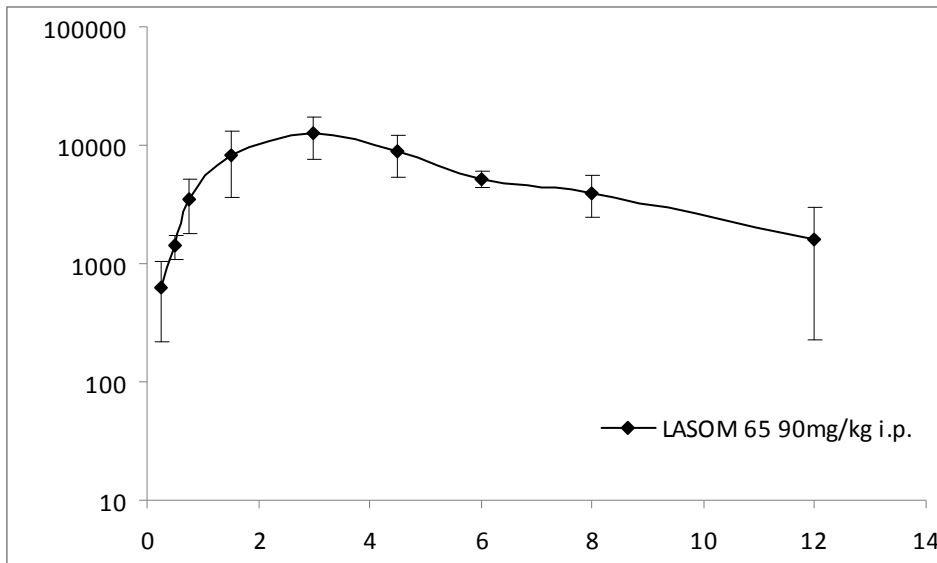


Figura 48. Perfil plasmático médio do LaSOM 65 após uma dose única ip de 90 mg/kg a ratos Wistar machos (n = 4) (média ± DP).

A **Figura 49** mostra a comparação do perfil plasmático médio do LaSOM 65 após a administração intraperitoneal das doses de 30 e 90 mg/kg.

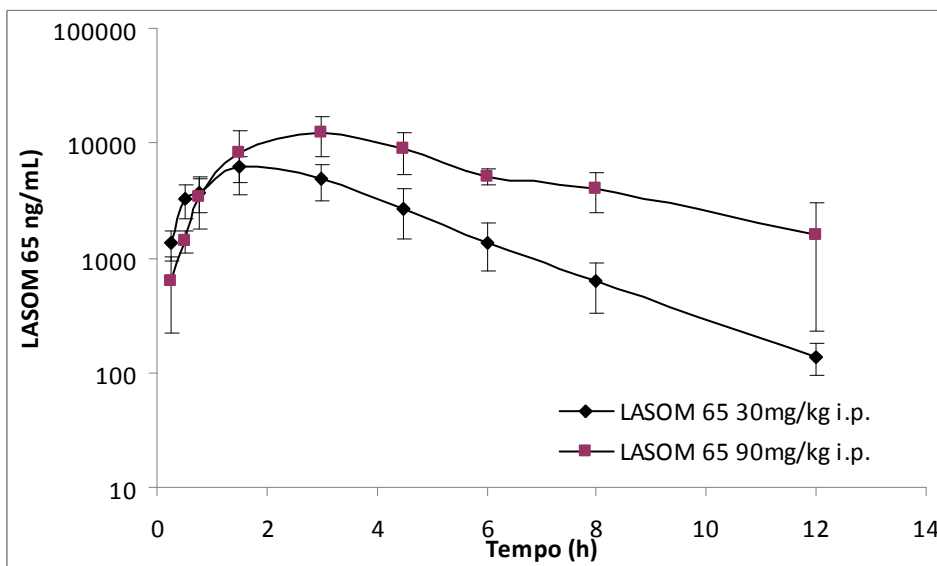


Figura 49. Comparação do perfil plasmático médio do LaSOM 65 após a administração intraperitoneal a ratos Wistar das doses de 30 e 90 mg/kg (n = 7 e 4, respectivamente).

A Tabela 19 mostra os parâmetros farmacocinéticos médios determinados por abordagem não-compartimental a partir da avaliação dos perfis individuais dos animais após administração ip nas doses de 30 e 90 mg/kg.

Tabela 19. Parâmetros farmacocinéticos obtidos por abordagem não-compartimental após administração ip nas doses de 30 e 90 mg/kg.

Parâmetros Farmacocinéticos	30 mg/kg (Média ± DP) (n = 7)	90 mg/kg (Média ± DP) (n = 4)
ke (h ⁻¹)	0,372 ± 0,090	0,281 ± 0,090
t _{1/2} (h)	2,0 ± 0,5	2,7 ± 1,0
ASC _{0-∞} (ng*h/mL)	26200 ± 7687	79020 ± 34,7*
CL (L/h/kg)	0,87 ± 0,27	0,90 ± 0,34
Vd (L/Kg)	2,64 ± 1,47	3,30 ± 1,00
Tmax (h)	1,7 ± 0,6	3,4 ± 0,8*
Cmax (ng/mL)	6177,0 ± 1477,9	13358,0 ± 4213,5*
Biodisponibilidade (%)	70,4	70,8

*diferença estatística ($\alpha = 0,05$)

A constante de velocidade de eliminação assim como o tempo de meia-vida, o volume de distribuição e o *clearance* total do LASOM 65 não apresentaram diferença estatisticamente significativa após a administração das duas doses ip ($\alpha = 0,05$). A ausência de diferença entre estes parâmetros indica a manutenção da magnitude do metabolismo e da eliminação do LaSOM 65 em diferentes doses pela mesma via de administração. Houve aumento proporcional entre a dose e as áreas sob a curva indicando farmacocinética linear na faixa de 30 a 90 mg/kg. A biodisponibilidade também foi constante para essa faixa de doses, indicando ausência de saturação.

Quando se comparou o pico de concentração plasmática pode-se observar que não houve proporcionalidade em relação ao aumento de dose. Do mesmo modo, o Tmax não foi semelhante para as duas doses, sendo maior para a maior dose. Esses dois fatores juntos indicam que a velocidade de absorção do LASOM 65 é menor na dose de 90 mg/kg, levando a um pico de concentração menor do que o esperado e um tempo para pico maior. Essa alteração, no entanto, não afeta a extensão de absorção, pois a biodisponibilidade não foi alterada. A hipótese mais plausível para essa alteração diz respeito a solubilidade da droga, uma vez que foi necessária utilização de DMSO e Tween[®] 80 para possibilitar a formação de uma suspensão passível de administração.

A comparação dos parâmetros farmacocinéticos após doses iv (1 mg/kg) e ip (30 mg/kg) indicou diferença significativa apenas para ASC_{0-∞}, o que era esperado. A comparação da dose iv com a dose ip de 90 mg/kg mostrou diferença significativa para

todos os parâmetros (k_e , V_d , $t_{1/2}$ e $ASC_{0-\infty}$) exceto *clearance* total ($\alpha = 0,05$). Para confirmar se essa diferença é real, há necessidade do aumento do tamanho amostral do grupo de 90 mg/kg ip.

2.7. CONCLUSÕES

As moléculas sintetizadas nesse trabalho foram testadas para câncer em diversos ensaios farmacológicos, a saber: ensaios de citotoxicidade *in vitro* sobre linhagens tumorais de glioma murino C6 e humano U138-MG, ensaios de *binding* no DNA, e ensaio *in vivo* no modelo de Sarcoma 180 em camundongos. Os testes de glioma são inéditos para a maioria das DHPMs sintetizados, enquanto que não existem relatos na literatura da realização dos demais ensaios com as diidropirimidinonas.

Os resultados apresentados destes testes revelam que várias diidropirimidinonas apresentaram resultados promissores, constituindo-se em valiosos *hits* para a modulação química objetivando a atividade antitumoral. De fato, todos os compostos apresentaram atividade antiproliferativa em relação ao grupo controle e, dos 15 compostos avaliados quanto à sua citotoxicidade *in vitro* sobre linhagens tumorais de glioma, 3 (LaSOM 63, LaSOM 65 e LaSOM 77) demonstraram atividade significativamente superior ao protótipo LaSOM 61 na linhagem de glioma murino C6 e 5 apresentaram melhor ação que este na linhagem de glioma humano U187M-MG (LaSOM 63, LaSOM 65, LaSOM 74, LaSOM 75 e LaSOM 77).

Pode ser observado que compostos contendo enxofre na posição 2 apresentaram maior efeito antiproliferativo sobre as linhagens tumorais testadas que aqueles contendo oxigênio nesta posição. Um resultado interessante foi a identificação do LaSOM 77, substituído com oxigênio na posição 2, como mais ativo que o LaSOM 61 na concentração testada. O composto LaSOM 74 apresentou atividade significativamente superior ao seu análogo LaSOM 60, sugerindo que a alquilação no enxofre pode melhorar a atividade destes compostos.

Objetivando estudar o mecanismo de ação e uma possível interação com o DNA, 12 diidropirimidinonas foram avaliadas de forma inédita quanto à sua atividade como estabilizantes de seqüências de DNA quadruplex. Contudo, neste caso, nenhum composto apresentou atividade nestes ensaios. Todos os análogos comportaram-se de maneira semelhante contra as seqüências de DNA e nenhum deles parece ter um perfil de atividade excepcional. Desta maneira pode-se observar que tanto a variação da posição 2 entre oxigênio e enxofre, quanto a variação no padrão de substituição no anel aromático não causam efeitos significativos na interação das DHPMs com as fitas de DNA, sugerindo que não há interação com este alvo biológico e que o efeito antitumoral observado não ocorre devido a este mecanismo de ação.

Os testes *in vivo* realizados, de forma inédita, com 4 diidropirimidinonas confirmam os resultados promissores obtidos *in vitro* para esta classe. Nestes testes todos os 4 compostos testados mostraram inibição do crescimento do tumor em camundongos entre 48 – 76% na dose de 90mg/kg pela via ip. Os compostos mais ativos nesta dose foram o LaSOM 64 e o LaSOM 65, os quais inibiram o crescimento do tumor em mais de 70% do seu peso em relação ao controle não tratado.

Além disso, todos os compostos apresentaram baixa toxicidade no esquema de tratamento adotado (90mg/kg por 7 dias). Este resultado é bastante interessante, pois os efeitos tóxicos apresentados pelos animais tratados foram muito pequenos quando comparados aos efeitos causados por agentes antitumorais comumente empregados, como a doxorubicina, mesmo nas doses muito maiores utilizadas. Desta forma os compostos sintetizados neste trabalho apresentam grande potencial para o desenvolvimento de agentes antitumorais e novas doses deverão ser verificadas para desvendar o potencial destes compostos.

Não há como estabelecer uma relação estrutura-atividade entre os compostos testados, pois primeiramente o mecanismo de ação pelo qual os compostos estão atuando deve ser estabelecido. Não há como comparar as atividades entre as moléculas sem, *a priori*, o conhecimento do alvo celular. Contudo, pode-se dizer, conforme observado nos testes *in vitro* em glioma, que os compostos LaSOM 63, LaSOM 65, LaSOM 74, LaSOM 75 e LaSOM 77 causam um maior decréscimo no número total de células tumorais (U138-MG) do que o LaSOM 61. Porém estes compostos podem estar exercendo seu efeito citotóxico de maneira diferente da qual o LaSOM 61 exerce seu efeito.

Conforme discutido na introdução deste capítulo, esta classe de moléculas apresenta potencial para agir sobre diferentes alvos terapêuticos, e uma análise mais abrangente de possíveis mecanismos de ação (além da cinesina Eg5) deve ser realizada. A investigação do(s) mecanismo(s) de ação pelo(s) qual(is) estes compostos mais ativos atuam se faz necessária e nosso grupo de pesquisa está trabalhando para desvendá-lo.

Embora os resultados apresentados neste trabalho estejam na sua fase inicial, pode ser observado que o composto mais ativo nos ensaios *in vivo* foi o análogo de enxofre codificado como LaSOM 65 e que este também apresentou um dos melhores resultados nos ensaios de glioma frente às duas linhagens celulares testadas. Este fato elege o LaSOM 65 como o protótipo do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal para as futuras modulações, visando a descoberta de um protótipo antitumoral.

Neste trabalho foram avaliados de forma inédita o perfil farmacocinéticos de DHPMs e estes, realizados com o LaSOM 65 mostram que o composto apresenta farmacocinética linear quando administrado em doses na faixa de 30 e 90 mg/kg pela via ip. O LaSOM 65 apresenta alta biodisponibilidade e tempo de meia-vida curto quando administrado pela via ip.

Além dos testes antitumorais, foram realizados ensaios *in vitro* de inibição de crescimento de duas espécies de fungos fitopatógenos: *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Estes testes foram realizados de forma inédita e os resultados novamente confirmam o potencial dessa classe de compostos. Do grupo de 20 substâncias, 9 apresentaram boa atividade na inibição em ambos os fitopatógenos, e os mais ativos foram: LaSOM 60, LaSOM 62, LaSOM 63, LaSOM 64, LaSOM 88, LaSOM 95 e LaSOM 97. Estes serão avaliados em diferentes concentrações para determinação do valor de EC₅₀ contra *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Para finalizar, 8 DHPMs foram avaliadas para verificação do potencial para uma atividade ovicida e larvicida de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*, metodologia otimizado em nosso grupo de pesquisa. Entretanto, nenhum dos compostos testados apresentou eficácia para o desenvolvimento de substâncias carrapaticidas.

2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO, World Health Organization, Cancer Report. <http://www.who.int/topics/cancer/en/> acessado em: 14/01/2008
2. Baguley, B. C.; Brief history of cancer chemotherapy in Baguley, B. C; Kerr, D. J.; Anticancer drug development; C. 1; San Diego: Academic Press, **2002**
3. Goodman and Gilman's; Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10th Ed., McGraw-Hill, **2003**
4. Yilidiz, A.; Selvin, P. R. *Trends Cell Biol.* **2005**, 15, 112
5. Hirokawa, N.; Takemura, R. *Exp. Cell Res.* **2004**, 301, 50
6. Wittmann, T.; Hyman, A.; Desai, A. *Nat. Cell. Biol.* **2001**, 3, E28
7. Zhu, C.; Zhao, J.; Bibikova, M.; Levenson, J. D.; Bossy-Wetzell, E.; Fan, J.-B.; Abraham, R. T.; Jiang, W. *Mol. Biol. Cell* **2005**, 16, 3187
8. Sarli, V.; Giannis, A. *ChemMedChem* **2006**, 1, 293
9. Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J.; King, R. W.; Schreiber, S. L.; Mitchinson, T. J. *Science* **1999**, 286, 971
10. Maliga, Z.; Kapoor, T. M.; Mitchinson, T. J. *Chem. Biol.* **2002**, 9, 989
11. DeBonis, S.; Simorre, J. P.; Crevel, I.; LeBeau, L.; Skoufias, D. A.; Blangy, A.; Ebel, C.; Gans, P.; Cross, R.; Hackney, D. D.; Wade, R. H.; Kozielski, F. *Biochemistry* **2003**, 42, 338
12. Yan, Y.; Sardana, V.; Xu, B.; Homnick, C.; Halczenko, W.; Buser, C. A.; Schaber, M.; Hartman, G. D.; Huber, H. E.; Kuo, L. C. *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 547
13. Gartner, M.; Plassmann, N. S.; Seiler, J.; Utz, M.; Vernos, I.; Surrey, T.; Giannis, A. *ChemBioChem* **2005**, 6, 1173
14. Sarli, V.; Huemer, S.; Plassmann, N. S.; Mayer, T. U.; Giannis, A. *ChemBioChem* **2005**, 6, 2005
15. Nakazawa, J.; Yajima, J.; Usui, T.; Ueki, M.; Takatsuki, A.; Iomoto, M.; Toyoshima, J. J.; Osada, H. *Chem Biol.* **2003**, 10, 131
16. Sarcowicz, R.; Finer, J. T.; Beraud, C.; Crompton, A.; Lewis, E.; Fritsch, A.; Lee, Y.; Mak, J.; Moody, R.; Turincio, R.; Chabala, J. C.; Gonzales, P.; Roth, S.; Weitman, S.; Wood, K. W. *Cancer Res.* **2004**, 64, 3276
17. Johnson, R. K.; McCabe, F. L.; Cauder, E.; Innlow, L.; Whitacre, M.; Winkler, J. D.; Bergnes, G.; Feng, B.; Smith, W. W.; Morgans, D.; Wood, K.; Jackson, J. R. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **2002**, 43, 269
18. Skoufias, D. A.; Debonis, S.; Lebeau, L.; Lopez, R.; Robin, G.; Margolis, R. L.; Wade, R. H.; Kozielski, F. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, 3, 1079
19. Brier, S.; Lemaire, D.; DeBonis, S.; Forest, E.; Kozielski, F. *Biochemistry* **2004**, 43, 13072
20. Hotha, S.; Yarrow, J. C.; Yang, J. G.; Garret, S.; Renduchintala, K. V.; Mayer, T. U.; Kapoor, T. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2379
21. Tao, W.; South, V. J.; Zhang, Y.; Davide, J. P.; Farell, L.; Kohl, N. E.; Sepp-Lorenzino, L.; Lobell, R. B. *Cancer Lett.* **2005**, 8, 49

22. Russowsky, D.; Canto, R. F. S.; Sanches, S. A. A.; D'oca, M. G. M.; Fátima, A.; Pilli, R. A.; Kohn, L. K.; Antônio, M. A.; Carvalho, J. E. *Bioorg Chem* **2006**, 34
23. Gartner, M.; Plassmann, N. S.; Seiler, J.; Utz, M.; Vernos, I.; Surrey, T.; Giannis, A. *ChemBioChem* **2005**, 6, 1173; Maliga, Z.; Mitchison, T. J. *BMC Chem. Biol.* **2006**, 6, 2
24. Luo, L.; Carson, J. D.; Dhanak, D.; Jackson, J. R.; Huang, P. S.; Lee, Y.; Sakowicz, R.; Copeland, R. A. *Biochemistry* **2004**, 43, 15258
25. Kappe, C. O. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 1043; DeSimone, R. W.; Currie, K. S.; Mitchell, S. A.; Darrow, J. W.; Pippin, D. A. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, 7, 473
26. Fewell, S. W.; Smith, C. M.; Lyon, M. A.; Dumitrescu, T. P.; Wipf, P.; Day, B. W.; Brodsky, J. L. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 51131
27. Wisen, S.; Androsavich, J.; Evans, C. G.; Chang, L.; Gestwicki, J. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 60
28. Barrow, J. C.; Nantermet, P. G.; Selnick, H. G.; Glass, K. L.; Rittle, K. E.; Gilbert, K. F.; Steele, T. G.; Homnick, C. F.; Freidinger, R. M.; Ransom, R. W.; Kling, P.; Reiss, D.; Broten, T. P.; Schorn, T. W.; Chang, R. S. L.; O'Malley, S. S.; Olah, T. V.; Ellis, J. D.; Barrish, A.; Kassahun, K.; Leppert, P.; Nagarathnam, D.; Forray, C. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2703
29. Saudi, M. N. S.; Gaafar, M. R.; El-Azzouni, M. Z.; Ibrahim, M. A.; Eissa, M. M. *Med. Chem. Res.* **2008**, 17, 541
30. Csermelin, P.; Agoston, V.; Pongo, S. *Trends in Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 4
31. Zimmermann, G. R.; Lehar, J.; Keith, C. T. *Drug Disc. Today* **2007**, 12
32. Morphy, R.; Rankovic, Z. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 21
33. Schwartzbaum, J. A.; Fisher, J. L.; Aldape, K. D.; Wrensch M. *Nature* **2006**, 2, 494
34. Holland, E. C. *Nature* **2001**, 2, 120
35. DeAngelis, B. M. *Engl. J. Med.* **2001**, 344, 114
36. Stupp, R.; Mason, W. P.; VanDenBent, M. J.; Weller, M.; Fischer, B. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2002**, 23:1
37. Katz, A.; Barrios, C. H.; Abramoff, R.; Simon, S. D.; Gansl, R. C.; Tabacof, J.; Viola, F. *Einstein* **2008**, 6, 115
38. Müller, C.; Gross, D.; Sarli, V.; Gartner, M.; Giannis, A.; Bernhardt, G.; Buschauer, A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, 59, 157
39. Kurashige, S.; Mitsuhashi, S. *Gann* **1982**, 73, 85
40. Ashok, M.; Holla, B. S.; Kumari, N. S. *Eur J Med Chem* **2007**, 42, 380
41. Hurst, E. W.; Hull, R. *J. Med. Pharm. Chem.* **1961**, 3, 215
42. Bahekar, S. S.; Shinde, D. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1733
43. Magerramov, A. M.; Kurbanova, M. M.; Abdinbekova, R. T.; Rzaeval, A.; Farzaliev, V. M.; Allakhverdiev, M. A. *Russ. J. Appl. Chem.* **2006**, 79, 787
44. Atwal, K. S.; Swanson, B. N.; Unger, S. E.; Floyd, D. M.; Moreland, S.; Hedberg, A.; O'Reilly, B. C. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 806

45. Sujatha, K.; Shanmugam, P.; Perumal, P. T.; Muralidharan, D.; Rajendran, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4893
46. Rovnyak, G. C.; Kimball, S. D.; Beyer, B.; Cucinotta, G.; DiMarco, J. D.; Gougoutas, J.; Hedberg, A.; Malley, M.; McCarthy, J. P. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 119
47. Pfizer Ltd. PCT Int. Appl. WO 11281, **1990**
48. Wichmann, J.; Adam, G.; Kolczewski, S.; Mutel, V.; Woltering, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1573
49. Bristol-Myers Squibb Company PCT WO 9833791A1, **1998**
50. Disponível em http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/press.html, acessado em novembro/2009
51. Kind, A. J.; Campbell, K. H. S.; Wilmut, I.; Waddington, D.; Colman, A.; Schnieke, A. E. *Cloning* **1999**, 1, 119
52. Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2113
53. Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L. C.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science* **1994**, 266, 2011
54. Parkinson, E. K. *Br.J. Cancer* **1996**, 73, 1
55. J.-L. Mergny, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P.B. Arimondo, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, J.-F. Riou, T. Garestier, C. Hélène *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, 98, 3062
56. Rahman, K. M.; Reszka, A. P.; Gunaratnam, M.; Haider, S. M.; Howard, P. W.; Fox, K. R.; Neidle, S.; Thurston, D. E. *Chem. Commun.* **2009**, 4097
57. Choquer, M.; Fournier, E.; Kunz, C.; Levis, C.; Pradier, J. M.; Simon, A.; Viaud, M. *FEMS Microbiol Lett.* **2007**, 277, 1
58. Morandi, M. A. B.; Maffia, L. A.; Sutton, J. C. *Phytoparasitica* **2001**, 29, 103
59. McNicol, R. J.; Williamson, B.; Young, K. *Acta Horticulturae* **1989**, 262, 209
60. Wilson, M. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.* **1997**, 19, 188
61. Leroux, P.; Champeland, F.; Desbrosses, D. *Crop Protection* **1999**, 18, 687
62. Latorre, B. A.; Flores, V.; Sara, A. *Plant disease* **1994**, 78, 990
63. Silva, K. S.; Rebouças, T. N. H.; Lemos, O. L.; Bomfim, M. P.; Bomfim, A. A.; Esquivel, G. L.; Barreto, A. P. P.; São José, A. R.; Dias, N. O.; Tavares, G. M. *Rev. Bras. Fruticultura* **2006**, 28, 131
64. Mello, A. F. S.; Machado, A. C. Z.; Bedendo, I. P. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* **2004**, 61, 542
65. Haddad, F.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G. *Fitopatol. Bras.* **2003**, 28, 435
66. Singh, O. M.; Singh, S. J.; Devi, M. B.; Devi, L. N.; Singh, N. I.; Lee, S.-G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 6462
67. Ashok, M.; Holla, B. S.; Kumari, N. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 380

68. Duguay, D. R.; Zamora, M. T.; Blacquiere, J. M.; Appoh, F. E.; Vogels, C. M.; Wheaton, S. L. ; Baerlocher, F. J.; Decken, A.; Westcott, S. A. *Central Eur. J. Chem.* **2008**, 6, 562
69. Gholap, A. R.; Toti, K. S.; Shirazi, F.; Deshpande, M. V.; Srinivasan, K. V. *Tetrahedron* **2008**, 64, 10214
70. Abdel-Gawad, S. M.; El-Gaby, M. S. A.; Ghorab, M. M. *Il fármaco* **2000**, 55, 287
71. Ladani, N. K.; Patel, M. P.; Patel, R. G. *Arkivoc* **2009**, 292
72. Duarte, M. O.; Ferrarini, S. R.; Pazinato, M.; Oliveira, E. R.; Rolim, V.; Eifler-Lima, V. L.; Ribeiro, V. L. S.; vonPoser, G. *Parasitol. Res.* **2008**, 103, 723
73. Tomaszewski, J. E.; Smith, A. C.; Covey, J. M.; Donohues, J.; Rhie, J. K.; Schweikart, K. M.; Relevance of preclinical pharmacology and toxicology to phase I trial extrapolation techniques: relevance of animal toxicology in Baguley, B. C.; Kerr, D.J.; Anticancer drug development; C. 1; San Diego: Academic Press, 2002
74. Newhouse, J. P.; Mendelsohn, J.; Gelband, H.; Herdman, R.; Federal Agency Roles in Cancer Drug Development from Preclinical Research to New Drug Approval: The National Cancer Institute and the Food and Drug Administration Washington: National Academic Press, 2005
75. Atwal, K. S.; Rovnyak, G. C.; Kimball, S. D.; Floyd, D. M.; Moreland, S.; Swanson, B. N.; Gougoutas, J. Z.; Schwartz, J.; Smillie, K. M.; Malley, M. F. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 2629
76. FDA. Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation*. May 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064964.htm>. Acesso em dez/2009
77. Tasso, L.; Neves, G.; Menegatti, R.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Eifler-Lima, V. L.; Rates, S. M. K., Dalla Costa, T. *J. Pharm. Biomed. Analysis* **2003**, 33, 1127
78. Gibaldi, M.; Perrier, D. Pharmacokinetics. 2. ed. New York: Marcel Dekker, **1982**

3. CONCLUSÕES GERAIS

Foi realizada a síntese em solução de 26 DHPMs com sucesso e em bons rendimentos empregando diversos protocolos. Foi demonstrada a grande aceleração promovida pela utilização de energia de microondas na reação de Biginelli promovida por cloreto de estanho. Foi desenvolvido e otimizado um novo protocolo de síntese destes compostos a partir da utilização do agente desidratante trietilortoformato (TEOF) utilizando energia de microondas, e também através da utilização de TEOF juntamente com ácidos orgânicos fracos (ácido cítrico e oxálico) utilizando aquecimento convencional. O sistema ácido cítrico/TEOF, a 100°C, durante 1-2h apresentou melhores rendimentos, que variaram entre 71-96%. Foi demonstrada a aplicação do TEOF em métodos com aquecimento convencional com e sem a presença dos ácidos e métodos promovidos por microondas, o que possibilitou sugerir a maneira pela qual este composto promove a reação de Biginelli. Os protocolos empregados permitiram a obtenção de variedade estrutural em todos os três componentes da reação, obtendo-se DHPMs contendo anéis aromáticos com diversos padrões de substituição na posição 4, enxofre ou oxigênio na posição 2 e um derivado bicíclico a partir da variação do componente dicarbonílico.

A reatividade das DHPMs foi investigada em diversos pontos do heterocíclico. As reações de S-alkilação possibilitaram a obtenção de 3 compostos regioseletivamente alquilados na posição 2 em rendimentos de moderados a bons (58-92%), assim como a obtenção de um derivado bis-alkilado inédito em 99% de rendimento. Através da reação com anidrido acético, foi obtida uma DHPM regioseletivamente acetilada no N3 em 35% de rendimento. As reações de guanilação sobre o ciclo DHPM possibilitaram a demonstração de um novo protocolo para a síntese de 1 exemplo inédito de 2-alkilamino-diidropirimidina em 51% de rendimento. A reação de hidrólise foi otimizada possibilitando a obtenção de uma DHPM contendo o grupo ácido carboxílico na posição 5 em 95% de rendimento, e problemas de degradação observados foram contornados.

A aplicação sintética deste ácido foi demonstrada na síntese de uma amida derivada da n-propilamina em 62% de rendimento utilizando síntese em solução, e também foi aplicada no desenvolvimento de uma rota convergente inédita de síntese em fase sólida de 5 DHPMs contendo diaminas como substituintes na posição 5. A construção dos linkers carbamato contendo 4 diferentes diaminas e o acoplamento do ácido derivado das DHPMs foram realizados com sucesso. A etapa de clivagem da resina necessita de maior otimização

A diversidade química obtida com a síntese no total de 35 compostos pode ser aplicada na síntese de novos análogos. Também pode ser aproveitada em uma futura

investigação da relação estrutura-atividade destes compostos ou na otimização dos seus parâmetros farmacocinéticos, desta maneira permitindo a otimização de possíveis candidatos à protótipos de fármaco.

As moléculas sintetizadas nesse trabalho foram testadas para câncer em diversos ensaios farmacológicos, a saber: ensaios de citotoxicidade *in vitro* sobre linhagens tumorais de glioma murino C6 e humano U138-MG, ensaios de *binding* no DNA, e ensaio *in vivo* no modelo de Sarcoma 180 em camundongos. Os testes de glioma são inéditos para a maioria das DHPMs sintetizados, enquanto que não existem relatos na literatura da realização dos demais ensaios com as diidropirimidinonas.

Os resultados apresentados destes testes revelam que várias diidropirimidinonas apresentaram resultados promissores, constituindo-se em valiosos *hits* para a modulação química objetivando a atividade antitumoral. De fato, todos os compostos apresentaram atividade antiproliferativa em relação ao grupo controle e, dos 15 compostos avaliados quanto à sua citotoxicidade *in vitro* sobre linhagens tumorais de glioma, 3 (LaSOM 63, LaSOM 65 e LaSOM 77) demonstraram atividade significativamente superior ao protótipo LaSOM 61 na linhagem de glioma murino C6 e 5 apresentaram melhor ação que este na linhagem de glioma humano U187M-MG (LaSOM 63, LaSOM 65, LaSOM 74, LaSOM 75 e LaSOM 77).

Pode ser observado que compostos contendo enxofre na posição 2 apresentaram maior efeito antiproliferativo sobre as linhagens tumorais testadas que aqueles contendo oxigênio nesta posição. Um resultado interessante foi a identificação do LaSOM 77, substituído com oxigênio na posição 2, como mais ativo que o LaSOM 61 na concentração testada. O composto LaSOM 74 apresentou atividade significativamente superior ao seu análogo LaSOM 60, sugerindo que a alquilação no enxofre pode melhorar a atividade destes compostos.

Objetivando estudar o mecanismo de ação e uma possível interação com o DNA, 12 diidropirimidinonas foram avaliadas de forma inédita quanto à sua atividade como estabilizantes de sequências de DNA quadruplex. Contudo, neste caso, nenhum composto apresentou atividade nestes ensaios. Todos os análogos comportaram-se de maneira semelhante contra as seqüências de DNA e nenhum deles parece ter um perfil de atividade excepcional. Desta maneira pode-se observar que tanto a variação da posição 2 entre oxigênio e enxofre, quanto a variação no padrão de substituição no anel aromático não causam efeitos significativos na interação das DHPMs com as fitas de DNA, sugerindo que não há interação com este alvo biológico e que o efeito antitumoral observado não ocorre devido a este mecanismo de ação.

Os testes *in vivo* realizados, de forma inédita, com 4 diidropirimidinonas confirmam os resultados promissores obtidos *in vitro* para esta classe. Nestes testes todos os 4 compostos testados mostraram inibição do crescimento do tumor em camundongos entre 48 – 76% na dose de 90mg/kg pela via ip. Os compostos mais ativos nesta dose foram o LaSOM 64 e o LaSOM 65, os quais inibiram o crescimento do tumor em mais de 70% do seu peso em relação ao controle não tratado.

Além disso, todos os compostos apresentaram baixa toxicidade no esquema de tratamento adotado (90mg/kg por 7 dias). Este resultado é bastante interessante, pois os efeitos tóxicos apresentados pelos animais tratados foram muito pequenos quando comparados aos efeitos causados por agentes antitumorais comumente empregados, como a doxorubicina, mesmo nas doses muito maiores utilizadas. Desta forma os compostos sintetizados neste trabalho apresentam grande potencial para o desenvolvimento de agentes antitumorais e novas doses deverão ser verificadas para desvendar o potencial destes compostos.

Não há como estabelecer uma relação estrutura-atividade entre os compostos testados, pois primeiramente o mecanismo de ação pelo qual os compostos estão atuando deve ser estabelecido. Não há como comparar as atividades entre as moléculas sem, *a priori*, o conhecimento do alvo celular. Contudo, pode-se dizer, conforme observado nos testes *in vitro* em glioma, que os compostos LaSOM 63, LaSOM 65, LaSOM 74, LaSOM 75 e LaSOM 77 causam um maior decréscimo no número total de células tumorais (U138-MG) do que o LaSOM 61. Porém estes compostos podem estar exercendo seu efeito citotóxico de maneira diferente da qual o LaSOM 61 exerce seu efeito.

Conforme discutido na introdução deste capítulo, esta classe de moléculas apresenta potencial para agir sobre diferentes alvos terapêuticos, e uma análise mais abrangente de possíveis mecanismos de ação (além da cinesina Eg5) deve ser realizada. A investigação do(s) mecanismo(s) de ação pelo(s) qual(is) estes compostos mais ativos atuam se faz necessária e nosso grupo de pesquisa está trabalhando para desvendá-lo.

Embora os resultados apresentados neste trabalho estejam na sua fase inicial, pode ser observado que o composto mais ativo nos ensaios *in vivo* foi o análogo de enxofre codificado como LaSOM 65 e que este também apresentou um dos melhores resultados nos ensaios de glioma frente às duas linhagens celulares testadas. Este fato elege o LaSOM 65 como o protótipo do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal para as futuras modulações, visando a descoberta de um protótipo antitumoral.

Neste trabalho foram avaliados de forma inédita o perfil farmacocinéticos de DHPMs e estes, realizados com o LaSOM 65 mostram que o composto apresenta farmacocinética linear quando administrado em doses na faixa de 30 e 90 mg/kg pela via ip. O LaSOM 65 apresenta alta biodisponibilidade e tempo de meia-vida curto quando administrado pela via ip.

Além dos testes antitumorais, foram realizados ensaios *in vitro* de inibição de crescimento de duas espécies de fungos fitopatógenos: *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Estes testes foram realizados de forma inédita e os resultados novamente confirmam o potencial dessa classe de compostos. Do grupo de 20 substâncias, 9 apresentaram boa atividade na inibição em ambos os fitopatógenos, e os mais ativos foram: LaSOM 60, LaSOM 62, LaSOM 63, LaSOM 64, LaSOM 88, LaSOM 95 e LaSOM 97. Estes serão avaliados em diferentes concentrações para determinação do valor de EC₅₀ contra *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Para finalizar, 8 DHPMs foram avaliadas para verificação do potencial para uma atividade ovicida e larvicida de carrapatos da espécie *Ripicephalus (Boophilus) Microplus*, metodologia otimizado em nosso grupo de pesquisa. Entretanto, nenhum dos compostos testados apresentou eficácia para o desenvolvimento de substâncias carrapaticidas.

4. PERSPECTIVAS

- Aplicação das condições otimizadas para modificações em torno do heterociclo sobre o composto mais ativo nos resultados biológicos de maneira a verificar sua relação estrutura atividade e otimização dos parâmetros farmacocinéticos;
- Otimização da etapa de clivagem nas reações de síntese orgânica em fase sólida;
- Realização das curvas dose-resposta nos ensaios antiproliferativos *in vitro* com os compostos mais ativos para determinação dos valores de IC₅₀;
- Investigação do mecanismo de ação antitumoral dos compostos;
- Investigação *in vivo* de maior número de doses, determinação de EC₅₀, ensaios de toxicidade;
- determinação do IC₅₀ dos compostos mais ativos nos ensaios antifúngicos;
- Em relação à farmacocinética do LaSOM 65 realizar aumento do tamanho amostral do grupo de 90 mg/kg ip.; modelagem compartimental dos perfis individuais de todos os grupos; avaliação da distribuição tecidual após dose iv.; determinação de parâmetros para a via oral

ANEXOS

ANEXO I



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro*pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2008196

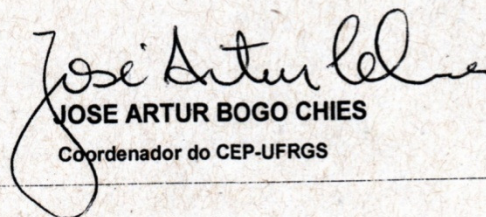
Título : Avaliação Farmacocinética Pré-clínica do Candidato a Fármaco Antitumoral LASOM 65

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA	PESQ RESPONSÁVEL	dalla.costa@ufrgs.br	33085218
FLAVIA DE TONI UCHÔA	PESQUISADOR	flaviadetoni@yahoo.com.br	
VERA LUCIA EIFLER LIMA	PESQUISADOR	eifler@farmacia.ufrgs.br	33085108

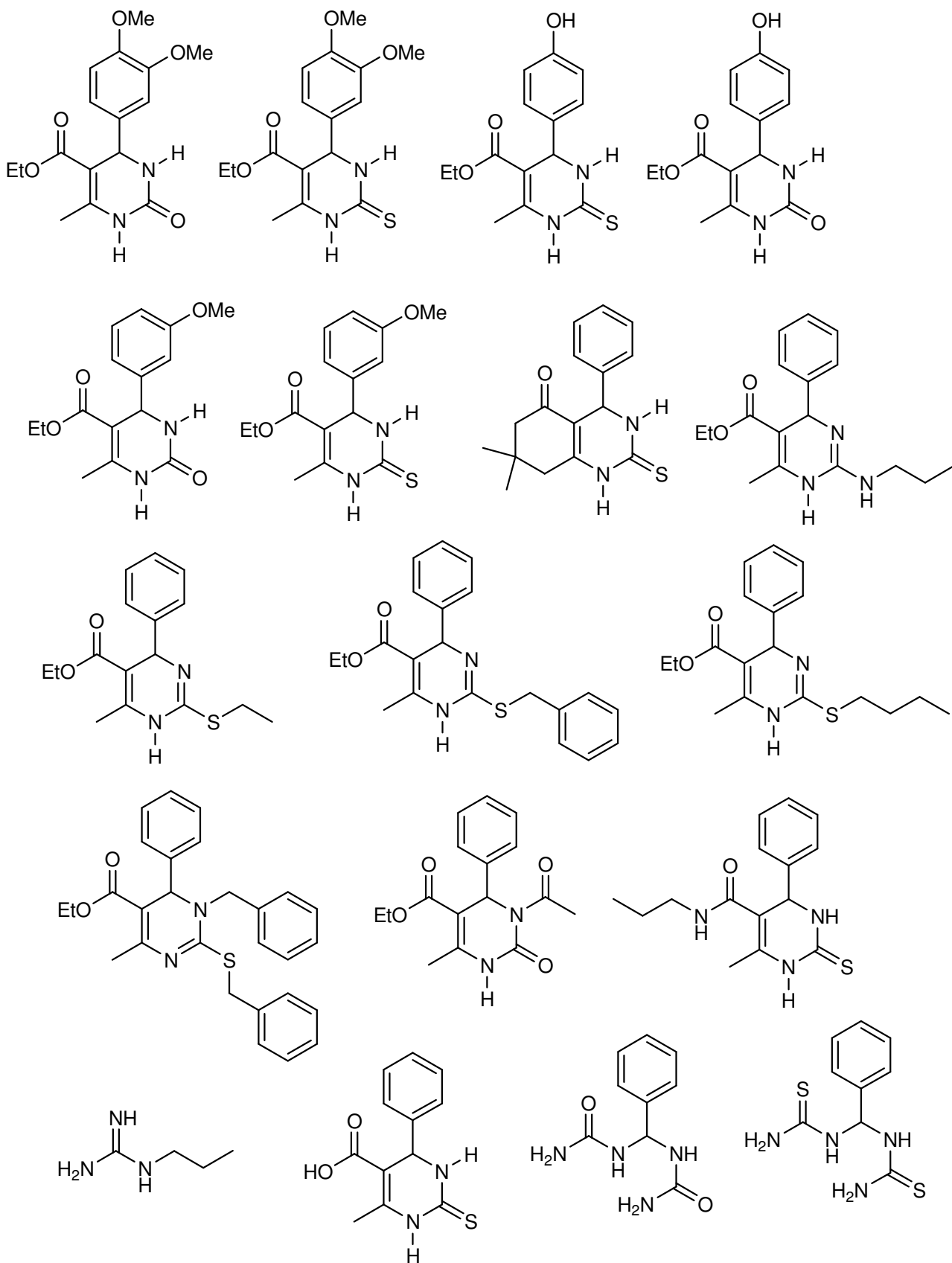
O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 61 , ata nº 141 , de 3/12/2009 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

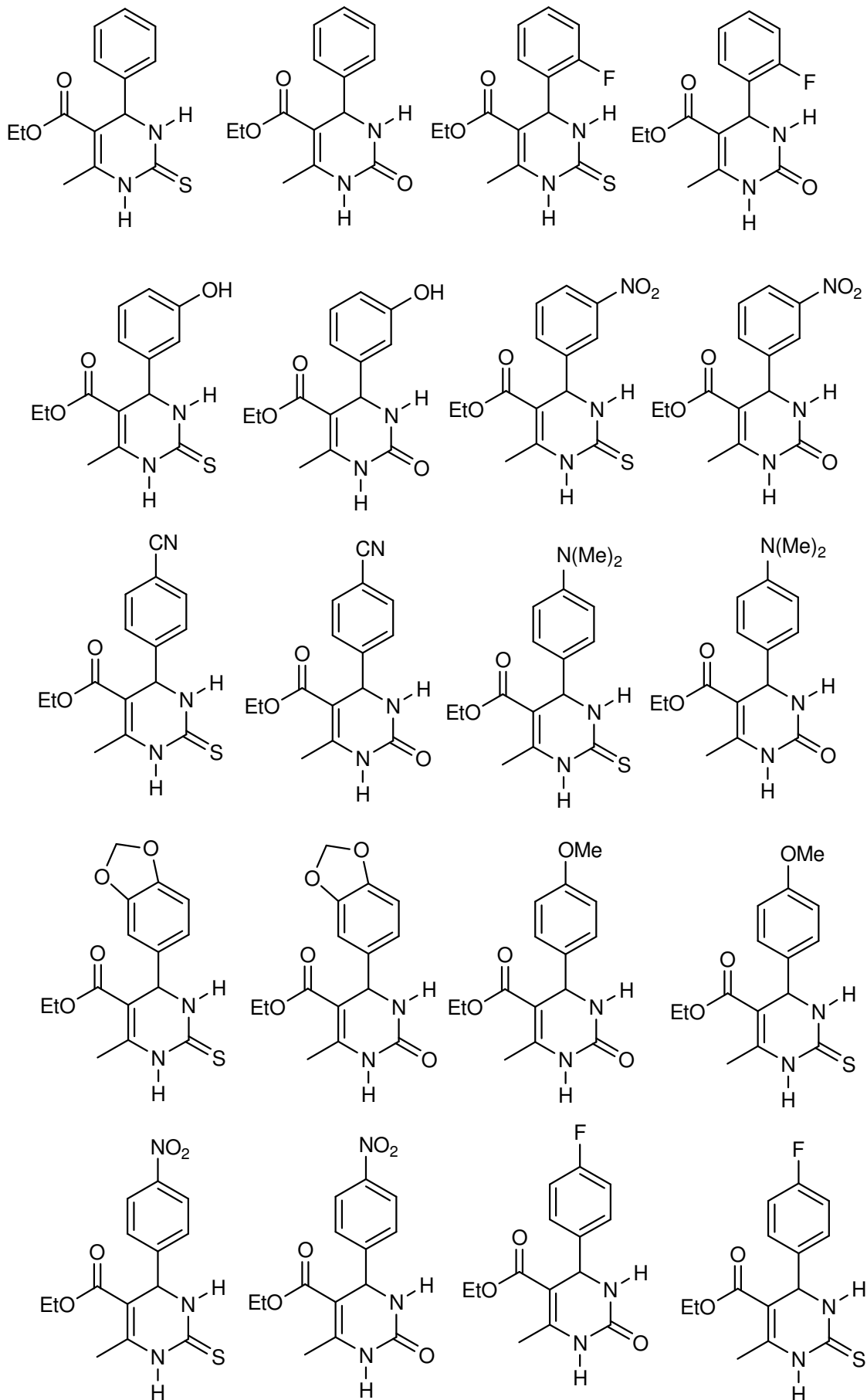
Porto Alegre, sexta-feira, 4 de dezembro de 2009


JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador do CEP-UFRGS

ANEXO II

Compostos sintetizados





ANEXO III

Manuscrito submetido ao *European Journal of Medicinal Chemistry*

Synthesis of Dihydropyrimidin-2-ones/thiones using TEOF as reaction promoter and their cytotoxicity against glioma cells.

Rômulo F. S. Canto,^a Andressa Bernardi,^b Ana Maria O. Battastini,^b Dennis Russowsky^{c*} and Vera Lucia Eifler-Lima^{a*}

^a*Laboratório de Síntese Orgânica Medicina/LaSOM, Faculdade de Farmácia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Av. Ipiranga 2752, (90610-00), Porto Alegre/RS, Brazil.*

^b*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2660 (90035-003), Porto Alegre/RS, Brazil.*

^c*Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, (91501-970), Porto Alegre/RS, Brazil.*

Abstract— Two series of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones and thio analogues, including Monastrol **1a**, have been synthesized by an environment-friendly chemical methodology with high yields. The library was evaluated as inhibitor of cell proliferation on glioma cell lines. Compounds in the thio series (exemplified by **1f** and **1d**) were more cytotoxic than Monastrol, while in the oxo series compound **2d** presented the largest activity. The library represents an interesting class of potential anticancer agents with some of compounds presenting a relevant antiproliferative effect against two glioma cell lines.

Keywords: dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones, Biginelli reaction, multicomponent reaction, triethylorthoformate, TEOF, Monastrol, cancer, glioma

* Corresponding author. Tel.: 55 51 33085517; fax: 55 51 33085437.

E-mail address: eifler@farmacia.ufrgs.br (V. L. Eifler-Lima) & dennis@iq.ufrgs.br (D. Russowsky)

1. Introduction

The 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones (DHPMs - **2**) are a class of heterocyclic compounds firstly synthesized over 100 years ago by the Italian chemist Pietro Biginelli[1]. The original three component reaction consisted of a simple one-pot condensation of benzaldehyde (**4b**), ethyl acetoacetate (**5**) and urea (**6a**), catalyzed by few drops of hydrochloric acid under refluxing ethanol. However, these original Biginelli conditions suffer of poor yields despite the long reaction times and harsh conditions, and cannot also be applied when acid sensitive reactants are required.

Nowadays, there are several reports of catalytic methods to improve the yield and scope of the Biginelli reaction. The majority is based on protic [2] or Lewis acid catalyzed reactions [3], with methods based on metal salts with non-nucleophilic anions having pronounced catalytic activity. The most effective ones involve reagents which have dehydrating properties in conjunction with protic or Lewis acidic behavior (*e.g.* ethyl polyphosphate [4], TMSCl [5], propane phosphonic acid anhydride [6] and TMSCl/NaI [7]). However, some of these methods have been reported with unsatisfactory yields and expensive catalysts.

The multicomponent Biginelli reaction has a great potential for application inside of “green methods” context due to its intrinsic characteristics such as: a) high atom economy [8], with all mass of reactants being converted “into” product with only loss of two moles of water by mol of formed product; b) One-pot three-steps synthesis, lacking the necessity of protection/deprotection steps; c) feasibility of room

temperature protocols; and d) easy isolation of the DHPMs formed requiring just a treatment with water.

Several techniques employing “neat reaction” techniques with different acids have recently been reported to promote the DHPM ring formation [9]. Among them are the use of chloroacetic acid [9a], formic acid [9b], NH₄Cl [9c-d], H₃PW₁₂O₄₀ [9e-f], Y(NO₃)₃.6H₂O [9g], CuBF₄ [9h], BiNO₃ [9i], TaBr₅ [9j], HBF₄ [9k], ZrCl₄ and ZrOC₁₂ [9l], [Fe(CF₃CO₂)₃] and [Fe(CF₃SO₃)₃] [9m], Sr(OTf)₂ [9n], CeCl₃.7H₂O [9o], Yb(OTf)₃ [9p], CuI [9q] and InBr₃ [9r].

Gliomas are the main primary central nervous system (CNS) tumors in humans, accounting for almost 80% of brain malignancies [10]. Glioblastoma multiforme (GBM), classified with a grade 4, represents the most aggressive of these tumors. Despite considerable progress in research regarding the molecular aspects of malignant gliomas, the prognosis of these tumors continues to be dismal [11]. Multimodal combinations of target agents with radiation and chemotherapy may enhance treatment efficacy [12], but despite these treatments, gliomas recur early due to their high proliferation, infiltrative and invasive behaviours [10]. DHPMs have demonstrated a vast range of therapeutic and pharmacologic properties [13]. The scope of this chemical scaffold has been further extended by the identification of the 4-(3-hydroxyphenyl)-2-thione derivative Monastrol **1a**, which is considered a potential novel antiproliferative agent for the treatment of malignant tumours [14]. The antitumoral activity of Monastrol has been attributed to its ability to reversibly interact with kinesin Eg5, a motor protein required for spindle bipolarity. Recently, Muller *et al.* [15] have also observed that Monastrol **1a**, enastron **3a** and dimethylenastron **3b** (Figure 1) exhibited antiproliferative activity against human glioblastoma cells. Their investigations revealed that the cyclic analogues presented higher antiproliferative efficacy compared to Monastrol, and, in contrast to the antimicrotubular agent paclitaxel, none of the tested Eg5 inhibitors had a cytotoxic effect on resting cells. This is an important result because it shows that these compounds should be less neurotoxic than classical tubulin inhibitors.

Figure 1

Our research group has recently published the synthesis of a small library of DHPM, including Monastrol (**1a**), using Lewis acids as catalysts [16]. In these studies, Monastrol and its analogues were evaluated against seven human cancer cell lines. The results showed that the oxo-Monastrol analogue (**2a**) just shows cytostatic activity, while Monastrol was cytotoxic against the seven cancer cell lines. We have also found that the 3,4-methylenedioxy derivative (Piperastrol - **1c**) was approximately 30 times more potent than Monastrol against five of the seven tested cancer cell lines, and it was also more potent than the control doxorubicine against 3 of the tested cell lines.

These results have encouraged us to carry out new studies in order to investigate the *in vitro* effect of a focused DHPM library of Monastrol analogues against the proliferation of glioma cell lines. Most of the investigations aiming to treat proliferative diseases through Eg5 inhibition are dedicated to classes of compounds other than DHPM, and there is still much to investigate about the structure activity relationship of this privileged heterocyclic structure in order to find a better hit than the prototype Monastrol.

The aim of the current study was to develop two series of DHPMs analogues employing an economical and environment-friendly methodology in a rapid and efficient approach and to evaluate their cytotoxic effect against the human glioma cell line U138-MG and the rat glioma cell line C6. Compounds in one series are substituted with a 2-oxo group and the other one with a 2-thio group.

2. Results and discussion

To continue our investigations regarding the antiproliferative activities of the DHPM analogues of Monastrol, we developed an alternative method to prepare DHPMs in a fast, good yielding and straightforward manner, without the use of metal salts due to the risk of trace contamination for

biological assays. We decided to investigate the dehydrating agent TEOF as promoter of the Biginelli reaction. Orthoesters have been described as mild, non-toxic, nonpollutant, inexpensive, and effective dehydrating agents in the imine synthesis protocols [17]. Since the proposed mechanism for the Biginelli reaction [18] proceeds through an initially formed N-acylimine intermediate and a second elimination of water through imine-enamine formation, we considered TEOF as an adjuvant reagent in the dehydration steps during the DHPM formation.

Initial investigation (scheme 1) of the reaction between benzaldehyde **4b**, ethyl acetoacetate (**5**), and excess thiourea (**6b**, 2 eq.), at 100°C in the presence of TEOF did not lead to any product. We think that this may be due to the necessity of acidic media to promote formation of the active dehydrating form of TEOF [19]. To achieve this, we investigated two inexpensive, non-toxic and readily available weak Brønsted acids, citric and oxalic acid, as promoters of TEOF degradation. To make sure that the acids do not promote the reaction by themselves, we carried the Biginelli reaction without solvent, with benzaldehyde **4b**, ethyl acetoacetate (**5**), and excess thiourea (**6b**, 2 eq.) in the presence of citric or oxalic acid. These reactions provided low yields. With prolonged times or higher temperatures, the observed yields were always low. So, TEOF could be investigated together with these two acids in the same reaction conditions, and the corresponding DHPM could be obtained in high yields.

While this work was in its final state, citric and oxalic acid were published as promoters of the Biginelli reaction [20, 21]. Although their results are excellent, we were not able to reproduce it in our laboratory. We think that our synthetic methodology does not lose its importance because it demonstrated that the Biginelli reaction can be promoted with TEOF, with the acids being used as auxiliaries to trigger TEOF dehydrating action.

We could observe that TEOF plays an important role on the efficiency of the process. In fact, the straight-forward work-up protocol allows the isolation of compounds with high purity degrees, as indicated by NMR analyses. We believe that the enhancements of the reaction yields are due to the dehydrating properties of triethyl orthoformate. Probably, TEOF is important for loosing of water in the imine intermediate formation at weak acidic pH conditions [22]. Additionally, the higher yields with 2 equivalents of TEOF can indicate their association with a second equivalent of water that was loosed in the last step of the DHPM formation.

In the light of these results we chose to extend the best condition highlighted above to the reactions of ethyl acetoacetate (**5**) with a series of aromatic aldehydes (**4a-g**) and urea or thiourea (**6a-b**) to afford the respective dihydropyrimidin-2-thiones (**1a-g**) and dihydropyrimidin-2-ones (**2a-g**) (Scheme 1). The results are presented in Table 1. The ¹H NMR and ¹³C NMR data of compounds **1a-g** and **2a-g** were compatible with the proposed structures as well as the melting points were in accordance with those reported in the literature.

Scheme 1

Table 1

According to the Table 1, the aromatic aldehydes bearing electron-donating (**4a**, **4c**, **4f**) or electron withdrawing groups (**4d**, **4e**, **4g**) at the *ortho*, *meta* or *para* positions readily undergo reaction, with both urea and thiourea giving good-to-high yields of the corresponding DHPMs (**1/2a-g**) with times varying from 1 to 2 hours.

The yields are somewhat higher with the citric acid/TEOF system than with oxalic acid/TEOF system. This can be exemplified by the Monastrol yields which are 88% with citric acid/TEOF system and 69% with oxalic acid/TEOF system (Entry 1).

3. Biology

To investigate the potential antiproliferative of Monastrol and its oxo and sulfur analogues, initially we used the cell counting assay in glioma cell lines. Thus, the glioma cells were treated with several concentrations of Monastrol **1a** (2.5, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 or 150 µg/ml) for 24, 48 or 72h. The time-course experiments revealed a significant decrease in the cell number of C6 and U138-MG treated with Monastrol, which shows also concentration-dependent effect (data not shown). Thus, we choose the condition of 50 µg/ml for 48h to compare the effect of Monastrol to its analogues. The cultures were treated with all compounds at 50 µg/ml for 48h (Figure 2). The analogues **1d**, **1f** and **2d** were significantly more potent to reduce the number of cells in both cell lines in comparison to Monastrol (Figure 2A and 2B).

Figure 2

The compound **1e** also exert a similar antiproliferative effect on U138-MG cell line (Figure 2B). The cytotoxic effect of Monastrol and its analogues were confirmed by MTT assay where, in agreement to cell counting results, the same compounds exhibited higher cytotoxicity in comparison to Monastrol (Figure 2C and 2D). Figure 2 shows representative pictures of U138-MG glioma cells treated with 50 µg/ml of Monastrol **1a** and its analogues **1d**, **1e**, **1f** and **2d** for 48 h.

Note the decrease of total number of cells with Monastrol treatment when compared to DMSO (control cultures). As observed in figure 3, when the cells were treated with compounds **1d**, **1e**, **1f** and **2d**, this reduction is more evident, confirming the results with cell counting assay.

Figure 3

As previously disclosed by our co-workers [16], the introduction of electron donor methylenedioxi group (**1c**) at benzene ring of Monastrol led to discover that **1c** possesses larger activity against several cell lines as the template and doxorubicin.

Two series of analogues, the thio series **2a-2g** and the oxo series **1a-1g**, were synthesized to explore the variation of activity in function of the substitutions at benzene ring. Figure 1 presents the inhibition of compounds for both C6 and U138-MG on glioma cell proliferation. It was showed that all tested compounds were active in the described panels, including Monastrol **1a** (35.9% and 43.5%), although their activities in U138-MG cells were more pronounced.

For both cell lines the three compounds **1d**, **1f** and **2d** displayed high inhibition of proliferation, with **2d** proved to be the most effective compound. Monastrol **1a** presents an effect in a range of 35-44% of inhibition for both cell lines, while compound **1e** showed higher antiproliferative effect against human U138-MG cells than C6 glioma cells (34.3% and 64.9%, respectively).

For the thio series, the removal of the *ortho*-OH phenyl group of Monastrol **1a** generating **1b** with no loss on activity indicates that this functional group is not essential for the cytotoxic activity. On the other hand, the introduction of substituents at *meta* and *para* positions improves this cytotoxicity. In comparison with Monastrol, the replacement of *meta*-OH by a *meta*-nitro group (compound **1d**) results in a marked increase of antiproliferative effect in U138-MG glioma cells. This effect is also observed when the *meta*-OH is substituted either by a *para*-N(CH₃)₂ or by a *para*-CN group. The replacement of *meta*-OH by *ortho*-F leads to reduction of activity. These results presumably reflect the importance of substitution at *ortho* and *para* positions of benzene ring, as well as its relative position in space. This is corroborated with the *ortho*-F compound **1g** which presents low activity (41.4%) and by compound **1b** (36.9%), which have no substitution at phenyl.

The compound 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one **2d** has twofold higher activity against both the C6 and U138-MG glioma cells compared to its analogue Monastrol **1a**. In this oxo series, other substitutions such as *meta*-OH, *para*-N(CH₃)₂ or *para*-CN, *ortho*-F, 3,4-OCH₂O- or even no substitution at the benzene nucleus results in compounds with low

activity, similar or lower than **1a**. Besides, the oxo analogue **2d** is more active than its thio counterpart **1d**, the most active in the thio series

Among the fourteen DHPMs synthesized, the three more active were **2d** (oxo, *meta*-NO₂), **1d** (thio, *meta*-NO₂) and **1f** (thio, *para*-N(CH₃)₂) against both cells lines. This results show that replacing the OH group in Monastrol by a NO₂ and by (CH₃)₂N- at *meta* and *para* positions respectively provides analogues with better activity profile. While the substitution by either *meta*-NO₂ or oxygen led to compound with even better antiproliferative profile.

4. Conclusions

The synthetic studies showed that Triethylorthoformate (TEOF), associated with Citric or Oxalic acid, acts as an efficient promoter of the Biginelli reaction between urea/thiourea, ethyl acetoacetate and aromatic aldehydes, yielding dihydropyrimidinones in good-to-high yields in 1 – 2 hours. The use of TEOF enhances drastically the yields obtained when weak acids, otherwise poor promoters of the reaction, are employed. This method offers a simple, inexpensive, versatile and environmental-friendly approach to synthesize a small library dihydropyrimidinones/thiones including the Monastrol in a straightforward approach for the biological assays.

Taken together, the results of the pharmacological assays in U138-MG and C6 gliomas cells showed that Monastrol presents cytotoxicity against both cell lines. In addition, four other analogues (**1f**, **1d**, **1e** and **2d**) presented higher cytotoxic effect on the same cell lines, where compound **2d** was the most effective (twofold higher than Monastrol). The overall profile of **2d** makes it suitable candidate to extend the pharmacological investigations. Studies are currently underway aiming to investigate the possible action mechanisms of cytotoxicity found here and the findings will be reported elsewhere.

5. Experimental Part

5.1 General

All chemicals were of research grade and were used as obtained. ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained in an INOVA-300 spectrophotometer with standard pulse sequences operating at 300 MHz in ¹H NMR and 75 MHz in ¹³C NMR or at 400 and 100MHz respectively, using a Bruker Avance NMR spectrometer, using D₆-DMSO as solvent. Chemical shifts are reported as σ values (ppm) relative to TMS (0.0 ppm). The NMR multiplicities br s, s, d, t, q, and m stand for broad singlet, singlet, doublet, triplet, quartet and multiplet, respectively. TLC analyses were performed on Merck's silica plates 60 F254. Melting-points (mp) were determined on a System Kofler type WME apparatus and were uncorrected. The term room temperature means 20-30°C. Products were identified by comparison of melting-points and spectroscopic data with those reported.

5.2. Experimental Procedures

5.2.1 Synthesis of compounds 1a-n acids/TEOF system

A mixture of ethyl acetoacetate (2.5 mmol, 325 mg), corresponding aromatic aldehyde (2.5 mmol), thiourea or urea (5.0 mmol, 2.0 equiv) and citric acid (0.25 mmol, 48 mg, 10mol%) or oxalic acid (0.25 mmol, 22.51 mg, 10mol%), together with triethylorthoformate (5.0 mmol, 741 mg, 2 equiv) was placed in a 50cm³ round bottomed flask and heated with stirring in a pre-heated oil bath (100°C) for the time indicated at table 1. Then water was added to the reaction mixture, stirred for the appropriate time and cooled in an ice-bath. The precipitate was filtered off, washed with cold water and dried under vacuum to afford the desired product.

5.2.1.1 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thione (1b). Mp 204-207°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [23] δ 1.09 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), 4.00 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 5.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, CH), 7.23-7.37 (m, 5H, arom.), 9.65 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H,

NH), 10.34 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [23] δ 14.1, 17.2, 54.1, 59.9, 100.7, 126.4, 127.7, 128.6, 143.5, 145.1, 165.1, 174.2. IR (neat) 3324.4, 3170.4, 2980.2, 1665.9, 1572.4, 1463.8, 1370.1, 1326.4, 1282.9, 1192.5, 1175.1, 1116.5, 1027.6, 1002.1, 757.8, 722.2, 691.8, 651.5 cm⁻¹.

5.2.1.2 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-one (2b). Mp 210-212°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [23] δ 1.09 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 3.98 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂), 5.15 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, CH), 7.22-7.32 (m, 5H, arom.), 7.74 (br s, 1H, NH), 9.20 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [23] δ 12.2, 16.0, 52.1, 57.3, 97.4, 124.4, 125.3, 126.4, 143.1, 145.2, 150.2, 163.3. IR (neat) 3236.9, 3112.9, 2974.7, 1721.7, 1697.3, 1643.5, 1454.1, 1418.8, 1312.9, 1289.9, 1217.1, 1085.9, 879.0, 772.2, 755.8, 697.1, 660.4 cm⁻¹.

5.2.1.3 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(3-hydroxyphenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thione (1a). Mp 184-187°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [24] δ 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.04 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂), 5.11 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, CH), 6.65-6.69 (m, 3H, arom.), 7.10-7.18 (m, 1H, CHarom.), 9.46 (s, 1H, OH), 9.62 (br s, 1H, NH), 10.31 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [24] δ 14.1, 17.2, 53.9, 59.6, 100.8, 113.2, 114.6, 117.0, 129.5, 144.8, 144.9, 157.5, 165.2, 174.2. IR (neat) 3298.8, 3180.4, 2983.7, 1663.8, 1572.6, 1473.6, 1445.4, 1369.9, 1281.7, 1188.2, 1153.1, 1113.4, 1024.2, 787.6, 752.4, 700.4 cm⁻¹.

5.2.1.4 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(3-hydroxyphenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-one (2a). Mp 163-166°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [25] δ 1.11 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃), 3.98 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂), 5.04 (s, 1H, CH), 6.64-7.09 (m, 4H, arom.), 7.64 (s, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, NH). IR (neat) 3512.9, 3341.3, 3236.7, 3116.4, 1723.3, 1674.7, 1633.5, 1599.6, 1452.1, 1295.6, 1218.4, 1089.3, 1025.9, 872.1, 775.4, 702.9 cm⁻¹.

5.2.1.5 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(3,4-methylenedioxyphenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thione (1c). Mp 156-159°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [26] δ 1.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃), 3.99 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 5.08 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, CH), 5.99 (s, 2H, OCH₂O), 6.64-6.72 (m, 1H, arom.), 6.87 (m, 2H, arom.), 9.61 (br s, 1H, NH), 10.33 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [26] δ 14.1, 17.2, 53.6, 59.6, 100.6, 101.0, 106.7, 108.1, 119.6, 137.4, 145.0, 146.7, 147.3, 165.0, 173.9. IR (neat) 3312.0, 3175.8, 2981.0, 1662.3, 1573.9, 1483.9, 1444.6, 1371.4, 1336.0, 1265.9, 1234.9, 1189.4, 1110.3, 1037.6, 937.8, 917.3, 815.2, 748.1, 657.5 cm⁻¹.

5.2.1.6 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(3,4-methylenedioxyphenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-one (2c). Mp 188-190°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [27] δ 1.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 3.99 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 5.08 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH), 5.98 (s, 2H, OCH₂O), 6.69-6.75 (m, 2H, arom.), 6.84-6.86 (m, 1H, arom.), 7.71 (br s, 1H, NH), 9.20 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [27] δ 14.1, 17.8, 53.7, 59.2, 99.3, 101.0, 106.7, 108.0, 119.4, 138.9, 146.4, 147.3, 148.3, 152.1, 165.4. IR (neat) 3353.8, 3221.1, 3103.8, 2965.4, 1688.0, 1637.3, 1488.3, 1446.5, 1373.0, 1295.5, 1242.0, 1222.6, 1166.6, 1089.6, 1039.3, 927.7, 810.2, 793.8, 674.2 cm⁻¹.

5.2.1.7 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thione (1d). Mp 206-209°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [28] δ 1.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂), 5.36 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH), 7.70-7.72 (m, 2H, arom.), 8.10-8.11 (m, 1H, arom.), 8.17-8.20 (m, 1H, arom.), 9.81 (br s, 1H, NH), 10.55 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [28] δ 14.0, 17.3, 53.5, 59.8, 99.8, 121.2, 122.8, 130.5, 133.0, 145.5, 146.0, 147.8, 164.9, 174.5. IR (neat) 3175.5, 2990.1, 1707.3, 1659.5, 1593.4, 1529.5, 1472.5, 1343.5, 1277.7, 1183.9, 1100.5, 892.7, 727.0, 687.9 cm⁻¹.

5.2.1.8 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-one (2d). Mp 225-227°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [28] δ 1.08 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃), 3.98 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, OCH₂), 5.29 (s, 1H, CH), 7.64-8.10 (m, 4H, arom.), 8.90 (s, 1H, NH), 9.37 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [9m] δ 14.0, 17.9, 53.6, 59.4, 98.4, 121.2, 122.3, 130.0, 133.0,

147.0, 147.8, 149.3, 151.9, 165.0. IR (neat) 3326.0, 3089.7, 2963.3, 1705.9, 1686.5, 1625.6, 1523.1, 1455.9, 1345.1, 1309.8, 1265.8, 1221.4, 1085.6, 900.4, 815.9, 794.1, 738.7, 685.5 cm⁻¹.

5.2.1.9 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(4-cyanophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thione (1e). Mp 130-133°C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [29] δ 1.09 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.00 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 5.24 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, CH), 7.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, arom.), 7.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, arom.), 9.74 (br s, 1H, NH), 10.47 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [29] δ 14.0, 17.2, 53.8, 59.8, 99.8, 127.5, 129.9, 132.7, 133.2, 138.8, 145.9, 148.5, 164.9, 174.5. IR (neat) 3299.4, 3274.2, 2983.9, 2238.9, 1650.9, 1556.6, 1456.2, 1370.5, 1319.9, 1282.4, 1198.0, 1167.1, 1108.0, 1032.1, 1002.9, 842.2, 759.7, 611.1 cm⁻¹.

5.2.1.10 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(4-cyanophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-one (2e). Mp 130-133°C; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [30] δ 1.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 3.97 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂), 5.21 (s, 1H, CH), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, arom.), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, arom.), 7.88 (s, 1H, NH), 9.33 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [30] δ 14.5, 18.3, 54.3, 59.8, 98.7, 110.5, 119.2, 127.8, 133.0, 149.8, 150.5, 152.3, 165.6. IR (neat) 3298.6, 2979.6, 2229.7, 1699.9, 1651.9, 1543.5, 1384.9, 1362.8, 1250.9, 1199.6, 1074.9, 1018.9, 934.7, 825.0, 756.1 cm⁻¹.

5.2.1.11 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(4-*N,N*-dimethylaminophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thione (1f). MP 206-208°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [9n] δ 1.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.85 (s, 6H, N(CH₃)₂), 3.97 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 5.04 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, CH), 6.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, arom.), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, arom), 9.55 (br s, 1H, NH), 10.24 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [9n] δ 14.1, 17.1, 40.1, 53.5, 59.5, 101.3, 112.2, 127.1, 131.2, 144.3, 150.0, 165.3, 173.8. IR (neat) 3322.4, 3168.7, 2981.7, 1665.8, 1575.8, 1522.9, 1461.7, 1364.3, 1327.1, 1284.4, 1182.1, 1116.0, 1023.3, 804.5, 754.7, 649.9 cm⁻¹.

5.2.1.12 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(4-*N,N*-dimethylaminophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-one (2f). Mp 257-259°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [27] δ 1.05 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.84 (s, 6H, N(CH₃)₂), 4.00 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 5.03 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, arom.), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, arom.), 7.59 (br s, 1H, NH), 9.09 (br s, 1H, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [27] δ 14.2, 17.7, 40.2, 53.3, 59.1, 99.9, 112.2, 126.9, 132.7, 147.6, 149.8, 152.3, 165.5. IR (neat) 3240.9, 3114.7, 2972.9, 1719.2, 1699.9, 1647.2, 1525.9, 1456.2, 1365.2, 1289.8, 1219.4, 1087.6, 1046.8, 879.5, 784.2, 659.0 cm⁻¹.

5.2.1.13 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(2-fluorophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thione (1g). Mp 140-143°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [31] δ 1.03 (t, 3H, *J*=7.0 Hz, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 3.93 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 5.45 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH), 7.13-7.34 (m, 4H, arom.), 9.59 (s, 1H, NH), 10.37 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [31] δ 14.5, 17.8, 49.4, 60.2, 100.0, 116.1, 116.4, 125.3, 129.9, 130.5, 131.27, 146.1, 165.5, 174.7. IR (neat) 3184.0, 3007.4, 1715.6, 1652.7, 1583.5, 1478.8, 1380.3, 1317.7, 1264.2, 1185.2, 1102.3, 846.4, 760.2, 744.4, 646.2 cm⁻¹.

5.2.1.14 - 5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(2-fluorophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-one (2g). Mp 235-237°C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) [32] δ 1.20 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 4.07 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, OCH₂), 5.62 (s, 1H, CH), 7.28-7.48 (m, 4H, arom.), 7.87 (s, 1H, NH), 9.43 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [32] δ 13.8, 17.5, 54.5, 61.1, 115.2, 122.4, 124.0, 127.8, 129.3, 135.8, 154.7, 157.2, 158.3, 160.3. IR (neat) 3228.9, 3158.2, 2973.3, 1747.4, 1699.3, 1616.2, 1538.9, 1436.5, 1384.6, 1319.2, 1228.7, 1198.6, 1143.8, 1075.3, 932.6, 754.6 cm⁻¹.

5.2.2. Cytotoxicity Assays

The human glioblastoma cell line U138-MG and the rat glioma cell line C6 obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA) were grown and maintained in DMEM containing supplemented with 5% (C6) or 15% (U138-MG) fetal bovine serum. Cells were kept at standard conditions of cell culture (37°C, 5% CO₂). After reaching semi-confluence, glioma cells were treated with different concentrations of monastrol or its analogues. The culture medium was removed,

the cells were detached with 0.25% trypsin/EDTA solution and were counted immediately in a hemocytometer. For MTT assay, the glioma cells were plated in a 96-well plate and after reaching semi-confluence, the cultures were treated with the different compounds. After 48h of treatment, each culture medium containing the drug was removed, the cells were washed twice with PBS and 10 µl of MTT were added to each of the wells. The cells were incubated for 3h and the solution was then removed. The residual formazan was dissolved in 100 mL of dimethylsulfoxide (DMSO). The absorbance was measured on a microplate reader at 490 nm.

Acknowledgments

The authors acknowledge CNPq/MCT (VLEL-Universal nº 477657/2008-7, PQ10/2008, 566201/2008 postgraduate and DR-Universal nº 484615/2007-6) for the financial support.

References

- [1] P. Bigineli Gazz. Chim. Ital., 23 (1893) 360-416.
- [2] (a) A. Debache; B. Boumoud; M. Amimour; A. Belfaitah; S. Rhouati; B. Carboni Tetrahedron Lett. 47 (2006) 5697-5699; (b) J. S. Yadav; S. P. Kumar; G. Kondaji; R. S. Rao; K. Nagaiah Chem. Lett. 33 (2004) 1168-1169; (c) S. Tu; F. Fang; C. Miao; H. Jiang; Y. Feng; D. Shi; X. Wang Tetrahedron Lett. 44 (2003) 6153-6155.
- [3] (a) D. Russowsky; F. A. Lopes; V. S. S. Silva; K. F. S. Canto; M. G. M. D'Oca; M. N. J. Godoi Braz. Chem. Soc. 15 (2004) 165-169; (b) M. N. Godoi; H. S. Costenaro; E. Kramer; P. S. Machado; M. G. M. D'Oca; D. Russowsky Quím. Nova 28 (2005) 1010-1013; (c) A. Dondoni; A. Massi; E. Minghini; S. Sabbatini; V. Bertolasi J. Org. Chem. 68 (2003) 6172-6183; (d) Y. Ma; C. Qian; L. Wang; M. Yang J. Org. Chem. 65 (2000) 3864-3868; (e) G. Maiti; P. Kundu; C. Guin Tetrahedron Lett. 44 (2003) 2757-2758; (f) N.-Y. Fu; Y.-F. Yuan; Z. Cao; S.-W. Wang; J.-T. Wang; C. Peppe Tetrahedron 58 (2002) 4801-4807; (g) A. S. Paraskar; G. K. DewKar; A. Sudalai Tetrahedron Lett. 44 (2003) 3305-3308.
- [4] C. O. Kappe; S. F. Falsone Synlett (1998) 718-720.
- [5] Y. Zhu; Y. Pan; S. Huang Synth. Comm. 34 (2004) 3167-3174.
- [6] F. L. Zumpe; M. Flüß; K. Schmitz; A. Lender Tetrahedron Lett. 48 (2007) 1421-1423.
- [7] G. Sabitha; G. S. K. K. Reddy; C. S. Reddy; J. S. Yadav Synlett (2003) 858-860.
- [8] B. Trost Science 254 (1991) 1471-1477.
- [9] (a) Y. Yu; D. Liu; C. Liu; G. Luo Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 (2007) 3508-3510; (b) C. Jiang; Q. D. You Chinese Chemical Letters 18 (2007) 647-649; (c) A. Shaabani; A. Bazgir; F. Teimouri Tetrahedron Lett. 44 (2003) 857-859; (d) H. A. Stefani; C. B. Oliveira; R. B. Almeida; C. M. P. Pereira; R. C. Braga; R. Cella; V. C. Borges; L. Savegnago; C. W. Nogueira Eur. J. Med. Chem. 41 (2006) 513-518; (e) M. M. Amini; A. Shaabani; A. Bazgir Cat. Comm. 7 (2006) 843-847. (f) B. G. Mishra; D. Kumar; V. S. Rao Cat. Comm. 7 (2006) 457-459; (g) N. S. Nandurkar; M. J. Bhanushali; M. D. Bhor; B. M. Bhanage J. Mol. Catal. A: Chem. 271 (2007) 14-17; (h) A. Kamal; T. Krishnaji; M. A. Azhar Cat. Comm. 8 (2007) 1929-1933; (i) B. K. Banik; A. T. Reddy; A. Datta; C. Mukhopadhyay Tetrahedron Lett. 48 (2007) 7392-7394; (j) N. Ahmed; J. E. VanLier Tetrahedron Lett. 48 (2007) 5407-5409; (k) W. Chen; S. Qin; J. Jin Cat. Comm. 8 (2007) 123-126; (l) J. C. R. Domínguez; D. Bernardi; G. Kirsch Tetrahedron Lett. 48 (2007) 5777-5780; (m) H. Adibi; H. A. Samimi; M. Beygzadeh Cat. Comm. 8 (2007) 2119-2124; (n) W. Su; J. Li; Z. Zheng; Y. Shen Tetrahedron Lett. 46 (2005) 6037-6040; (o) D. S. Bose; L. Fatima; H. B. Mereyala J. Org. Chem. 68 (2003) 587-590; (p) Y. Ma; C. Qian; L. Wang; M. Yang J. Org. Chem. 65 (2000) 3864-3868; (q) H. R. Kalita; P. Phukan Cat. Comm. 8 (2007) 179-182; (r) N.-Y. Fu; Y.-F. Yoan; Cao, Z.; S.-W. Wang; J.-T. Wang; C. Peppe Tetrahedron 58 (2002) 4801-4807.
- [10] J. A. Schwartzbaum; J. L. Fisher; K. D. Aldape; M. Wrensch Nature 2 (2006) 494-503.
- [11] E. C. Holland Nature 2 (2001) 120-129.

- [12] S. Sathornsumetee; D. Reardon; A. Desjardins; J. Quinn; J. J. Vredenburgh; J. N. Rich *Cancer* 110 (2007) 13-24
- [13] (a) C. O. Kappe *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 1043-1052; (b) C. O. Kappe *Tetrahedron* 49 (1993) 6937-6963.
- [14] T. U. Mayer; T. M. Kappor; S. J. Haggarty; R. W. King; S. L. Schreiber; T. J. Mitchison *Science* 286 (1999) 971-974.
- [15] C. Müller; D. Gross; V. Sarli; M. Gartner; A. Giannis; G. Bernhardt; A. Buschauer *Cancer Chemother Pharmacol* 59 (2007) 157-164.
- [16] D. Russowsky; R. F. S. Canto; S. A. A. Sanches; M. G. M. D'Oca; A. Fátima; R. A. Pilli; L. K. Kohn; M. A. Antônio; J. E. Carvalho *Bioorg. Chem.* 34 (2006) 173-182.
- [17] G. C. Look; M. M. Murphy; D. A. Campbell; M. A. Gallop *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 2937-2940.
- [18] C. O. Kappe *J. Org. Chem.* 62 (1997) 7201-7204.
- [19] R. H. DeWolfe; J. L. Jensen *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3264-3268
- [20] E. Ramu; V. Kotra; N. Bansal; R. Varala; S. R. Adapa *Rasayan J. Org. Chem.* 1 (2008) 188-194
- [21] J. N. Sanghetti; D. B. Sinde; N. D. Kokare *J. Heterocycl. Chem.* 45 (2009) 1191-1194
- [22] E. H. Cordes; W. P. Jencks *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 832-837.
- [23] D. Angeles-Beltran; L. Lomas-Romero; V. H. Lara-Corona; E. Gonzales-Zamora; G. Negron-Silva *Molecules* 11 (2006) 731-738.
- [24] Dwivedi, N.; Mishra, R. C.; Tripathi, R. P. *Lett. Org. Chem.* 2 (2005) 450-457.
- [25] K. Sujatha; P. Shanmugam; P. T. Perumal; D. Muralidharan; M. Rajendran *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 4893-4897.
- [26] S. Kolb; O. Mondesert; M. L. Goddard; D. Jullien; B. O. Villoutreix; B. Ducommun; C. Garbay; E. Braud *Chem. Med. Chem.* 4 (2009) 633-648.
- [27] R. Ghosh; S. Maiti; A. Chakraborty *J. Mol. Catal. A: Chem.* 217 (2004) 47-50.
- [28] H. N. Karade; M. Sathe; M. P. Kaushik *Molecules* 12 (2007) 1341-1351.
- [29] Y. Y. Wu; Z. Chai; X. Y. Liu; G. Zhao; S. W. Wang *Eur. J. Org. Chem.* 6 (2009) 904-908.
- [30] K. Niknam; N. Daneshvar *Heterocycles* 71 (2007) 373-378.
- [31] F. A. Attaby; M. M. Ramla; T. Harukuni *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* 183 (2008) 2956-2967.
- [32] A. R. Gholap; K. Venkatesan; T. Daniel; R. J. Lahoti; K. V. Srinivasan *Green Chem.* 6 (2004) 147-150.

Figure Captions

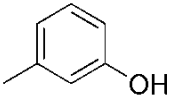
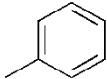
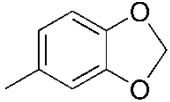
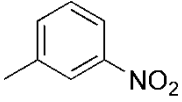
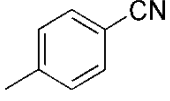
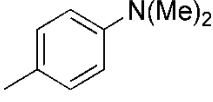
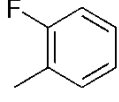
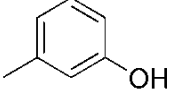

Figure 1. Antimitotic and/or antiproliferative dihydropyrimidinones

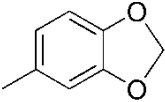
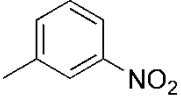
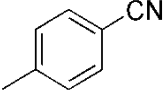
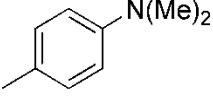
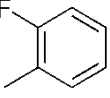
Figure 2. Effect of analogues of Monastrol on cell proliferation (A and B) and on cell viability (C and D) of glioma cell lines. Semi-confluent cultures of C6 and U138-MG glioma cells were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of oxo or sulfur analogues of Monastrol for 48h. The cell number and the cell viability were represented in relation to the respective controls. The values are represented as means \pm S.D. of three independent experiments made in duplicate. Data are analyzed by ANOVA followed by *post-hoc* comparisons (Tukey test). #Significantly different from the control and DMSO groups ($P < 0.01$); *Significantly different from the Monastrol (1a) group ($P < 0.05$); **Significantly different from the Monastrol (1a) group ($P < 0.01$); ***Significantly different from the Monastrol (1a) group ($P < 0.001$); & significantly different between the two groups ($P < 0.01$).

Figure 3. Representative pictures of U138-MG cell cultures treated with Monastrol and analogues. After 48h of treatment with DMSO (control cultures), 50 $\mu\text{g/ml}$ of Monastrol (**1a**) or analogues of Monastrol, the cells were visualized using a Nikon inverted microscope. Panels correspond to contrast phase photomicrographs. The pictures are representative of three different experiments.

Tables

Table 1 - Application of the optimized conditions to a variety of aldehydes (4a-g) towards the synthesis of DHPMs (1a-g/2a-g).

Entry	R	X	Product	Co-Promoter	Time(h)	Yield (%) ^a
1		S	1a	Citric acid	1	88
				Oxalic acid	2	69
2		S	1b	Citric acid	2	92
				Oxalic acid	2	93
3		S	1c	Citric acid	2	84
				Oxalic acid	1	73
4		S	1d	Citric acid	2	97
				Oxalic acid	2	82
5		S	1e	Citric acid	2	80
				Oxalic acid	2	78
6		S	1f	Citric acid	1.5	82
				Oxalic acid	2	68
7		S	1g	Citric acid	2	77
				Oxalic acid	2	75
8		O	2a	Citric acid	2	87
				Oxalic acid	2	77
9		O	2b	Citric acid	1	93

				Oxalic acid	1	67
10		O	2c	Citric acid	1	81
				Oxalic acid	2	84
11		O	2d	Citric acid	1.5	92
				Oxalic acid	1.5	89
12		O	2e	Citric acid	1	86
				Oxalic acid	1	68
13		O	2f	Citric acid	1.5	75
				Oxalic acid	1	66
14		O	2g	Citric acid	2	74
				Oxalic acid	2	78

^a isolated yields (purity >95%)

Figures

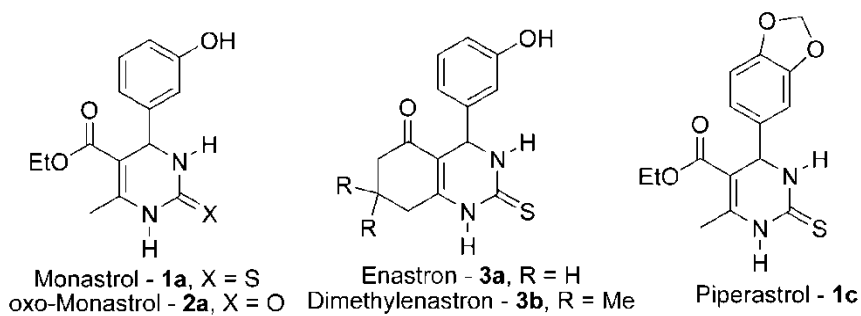


Figure 1

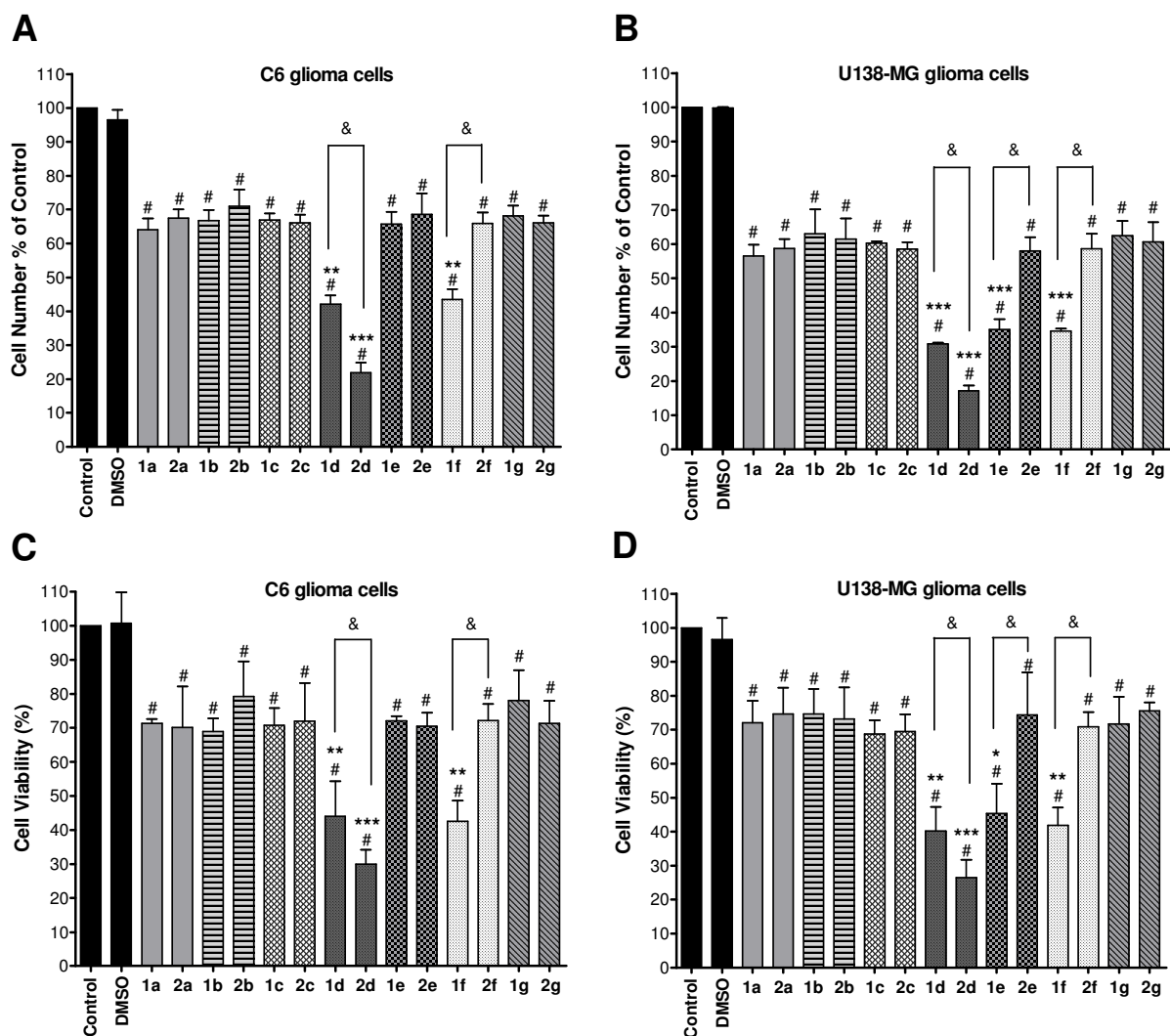


Figure 2.

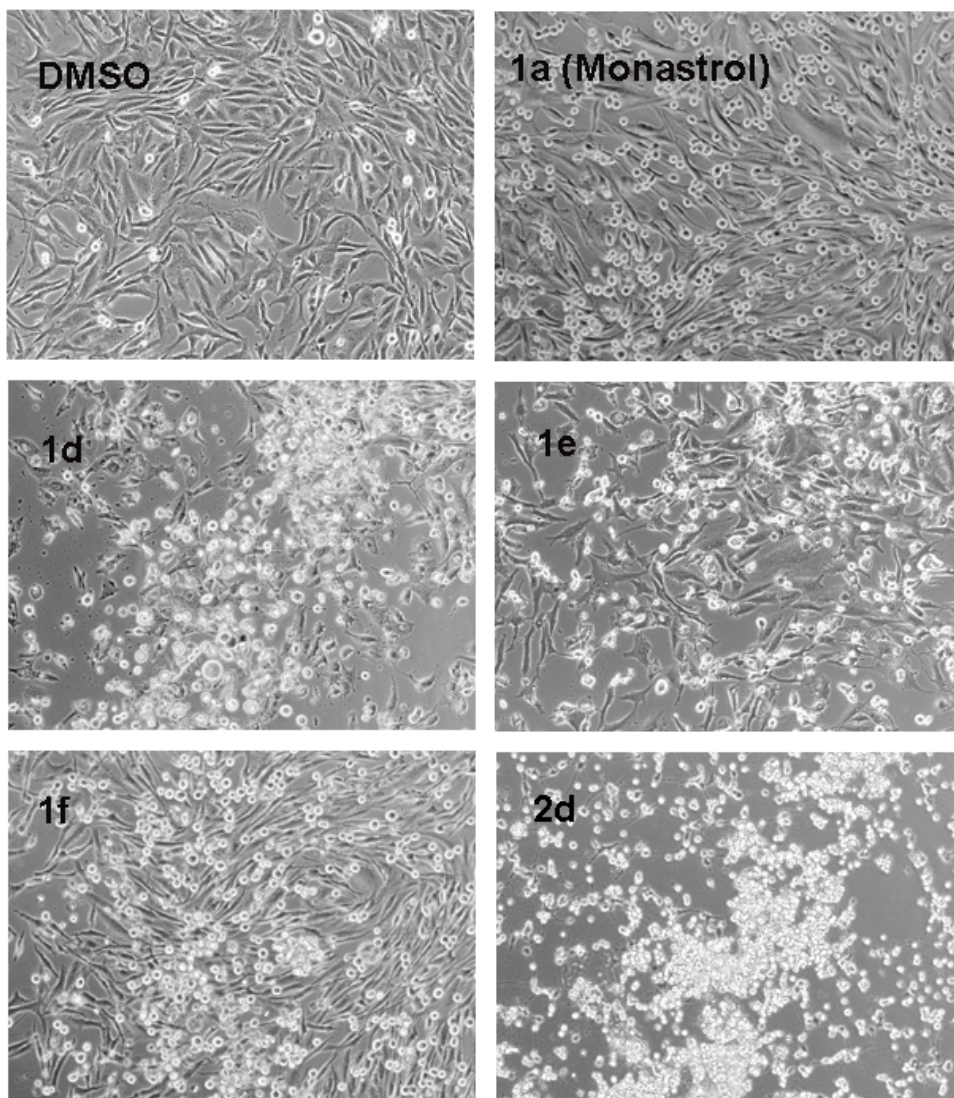
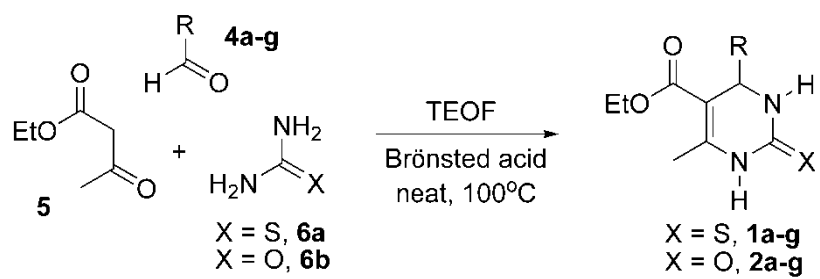


Figure 3

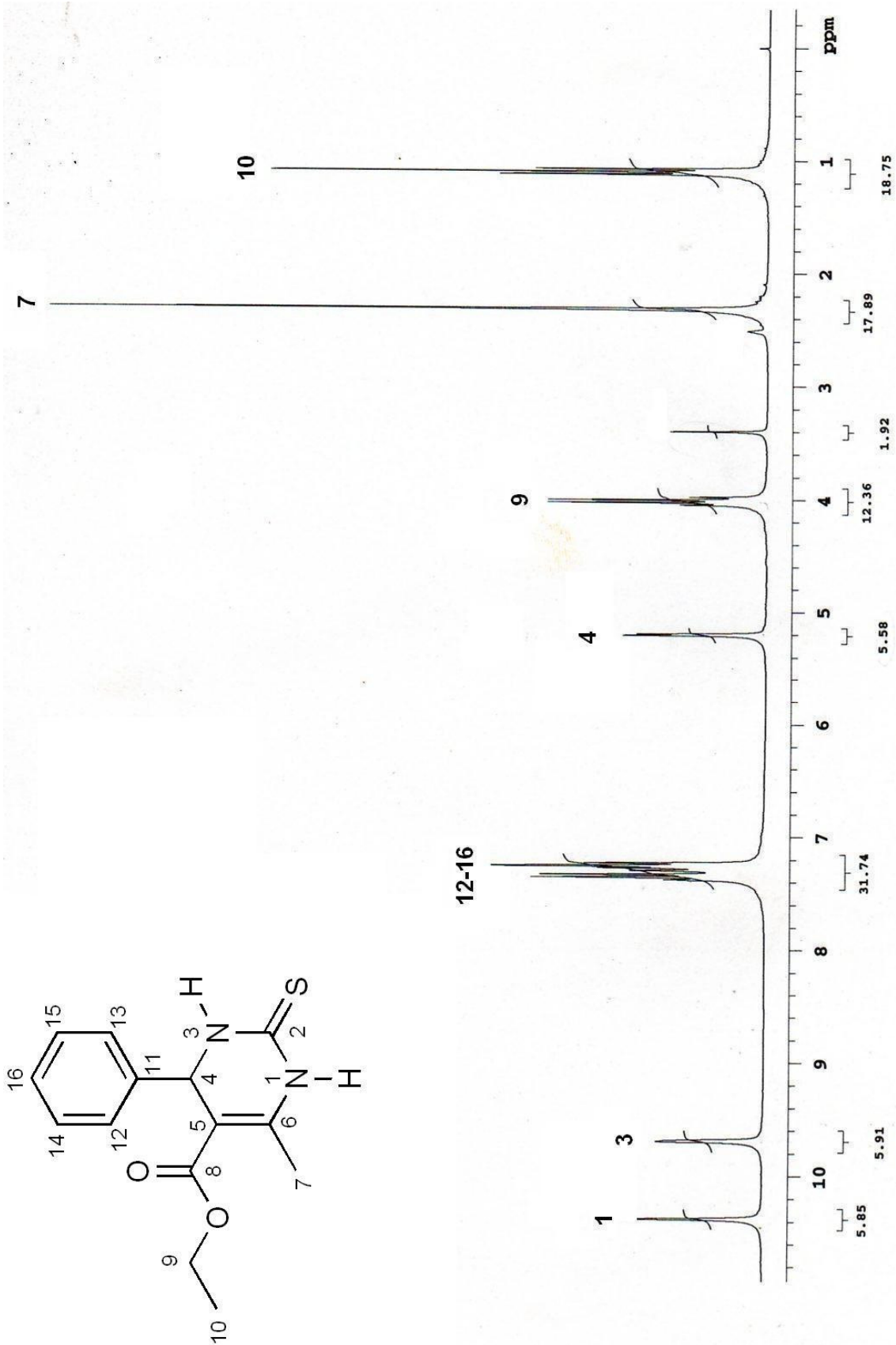
Schemes and Captions



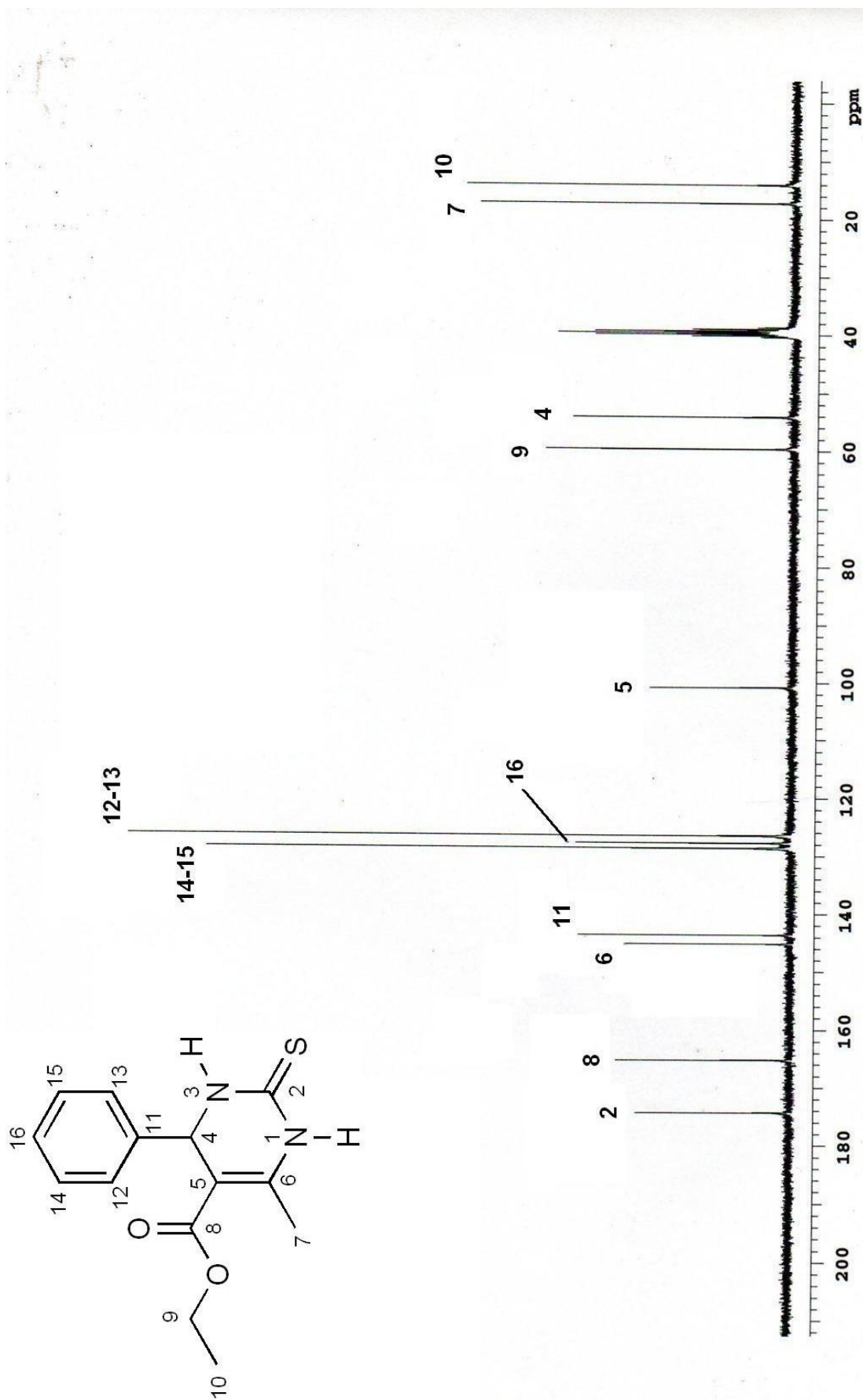
Scheme 1. Synthesis of Dihydropyrimidin-2-ones/thiones **1a-g/2a-g**.

ANEXO IV

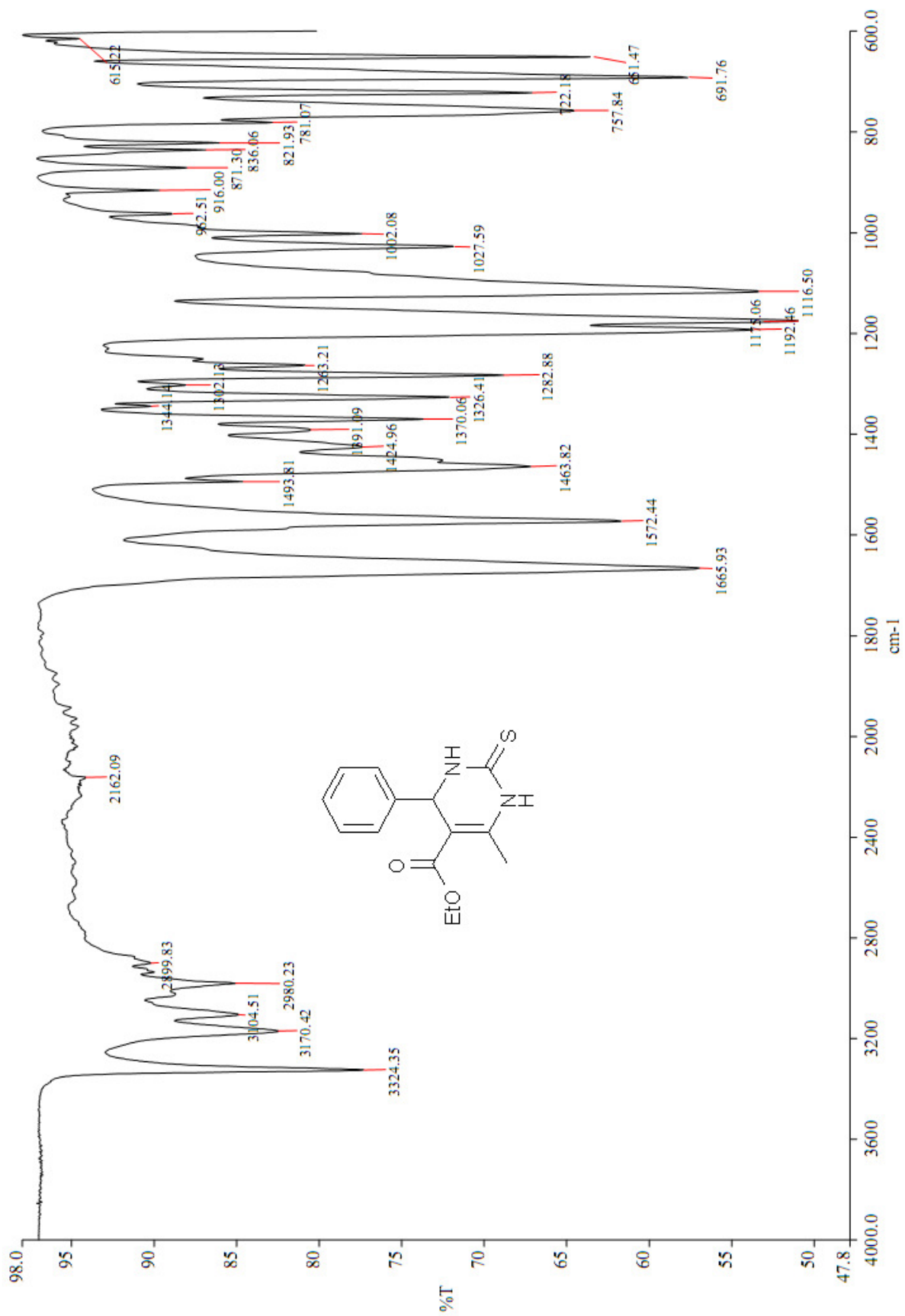
Espectros de Algumas DHPMs sintetizadas através da reação de Biginelli



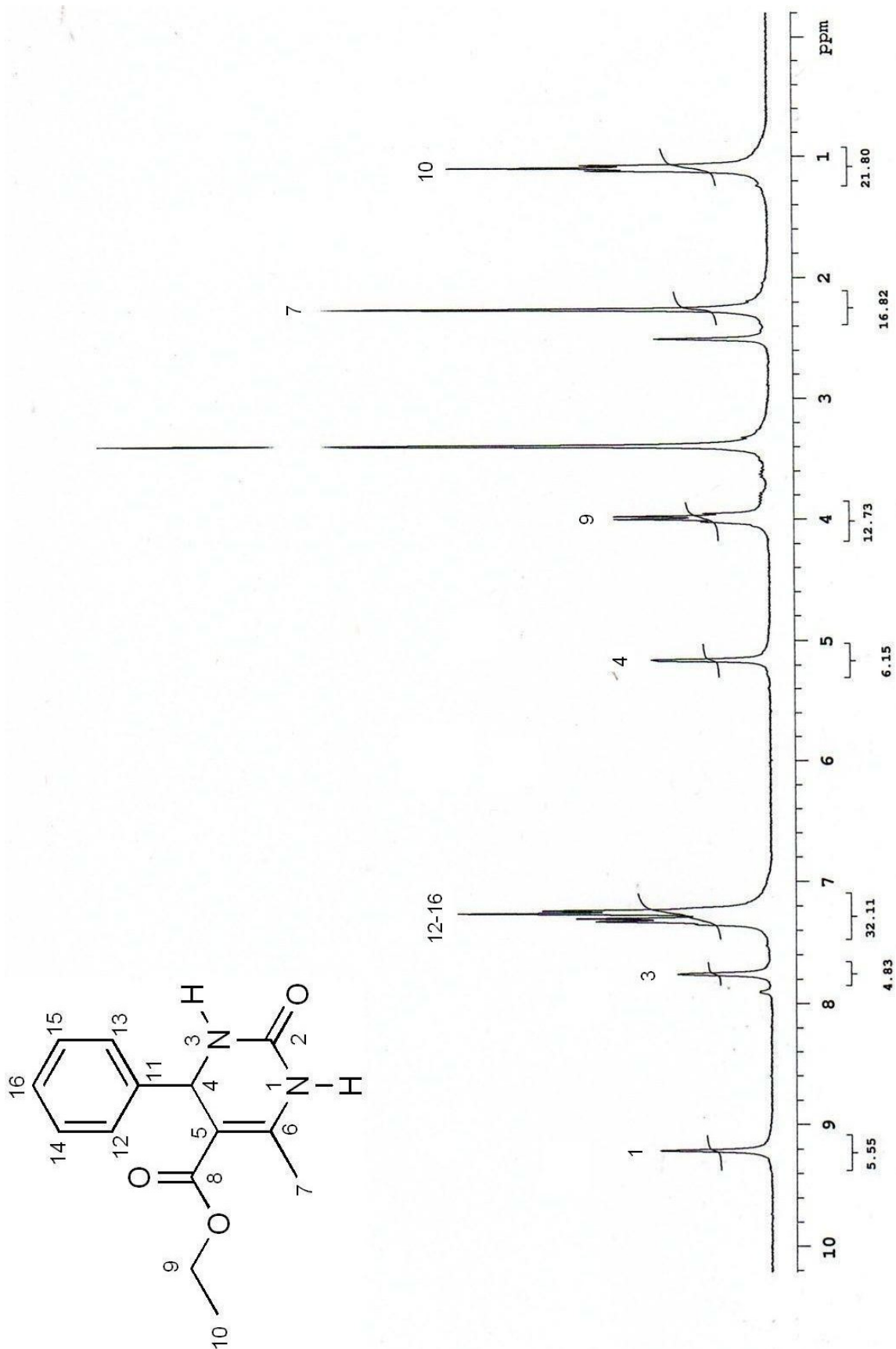
Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **167**



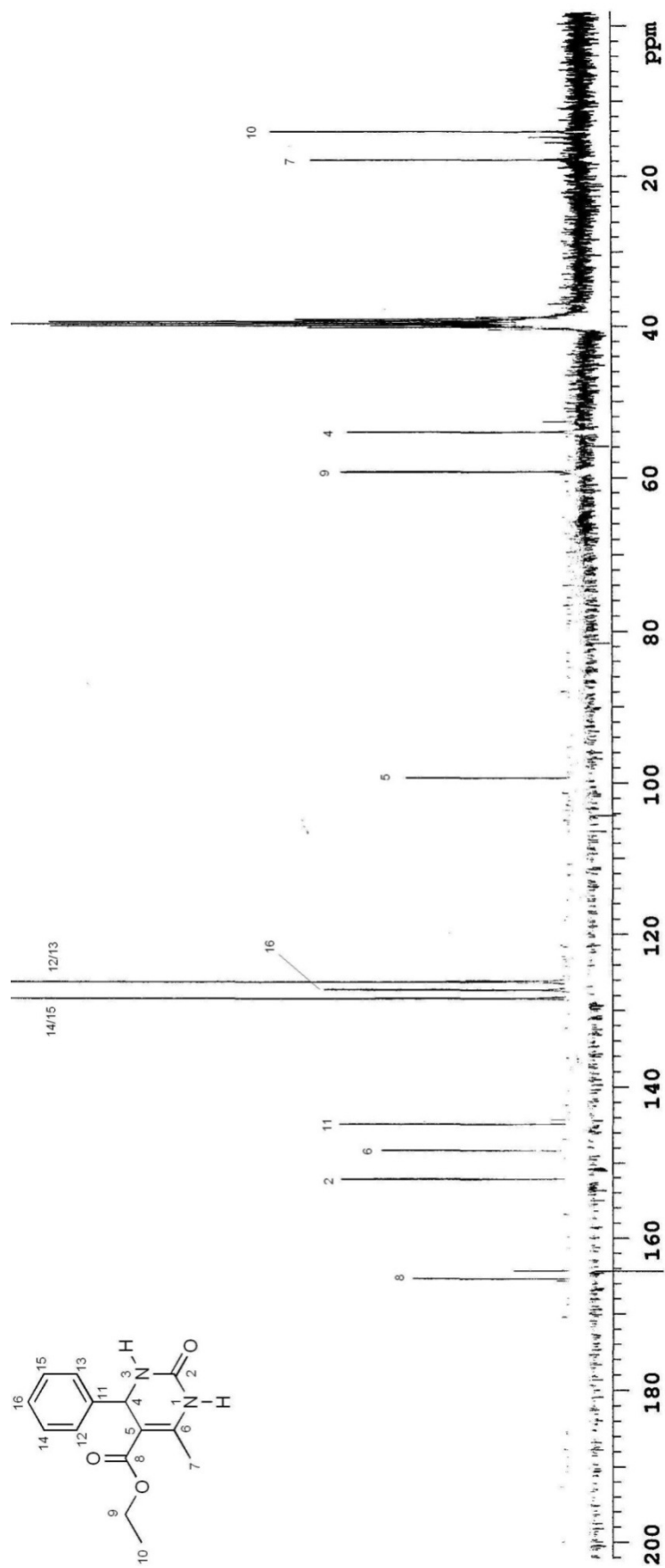
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d^6) do composto **167**



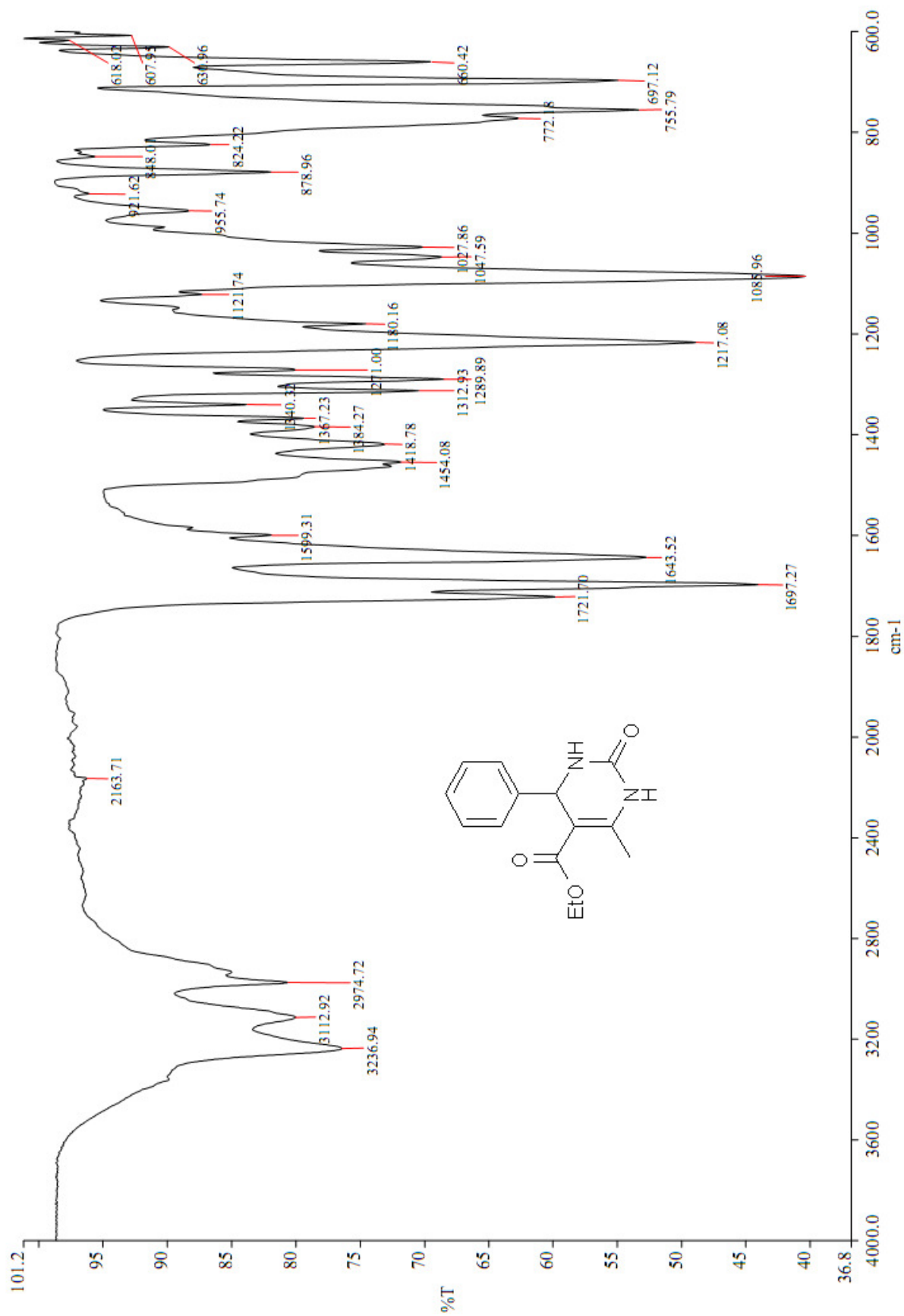
Espectro de IV (ATR) do composto **167**



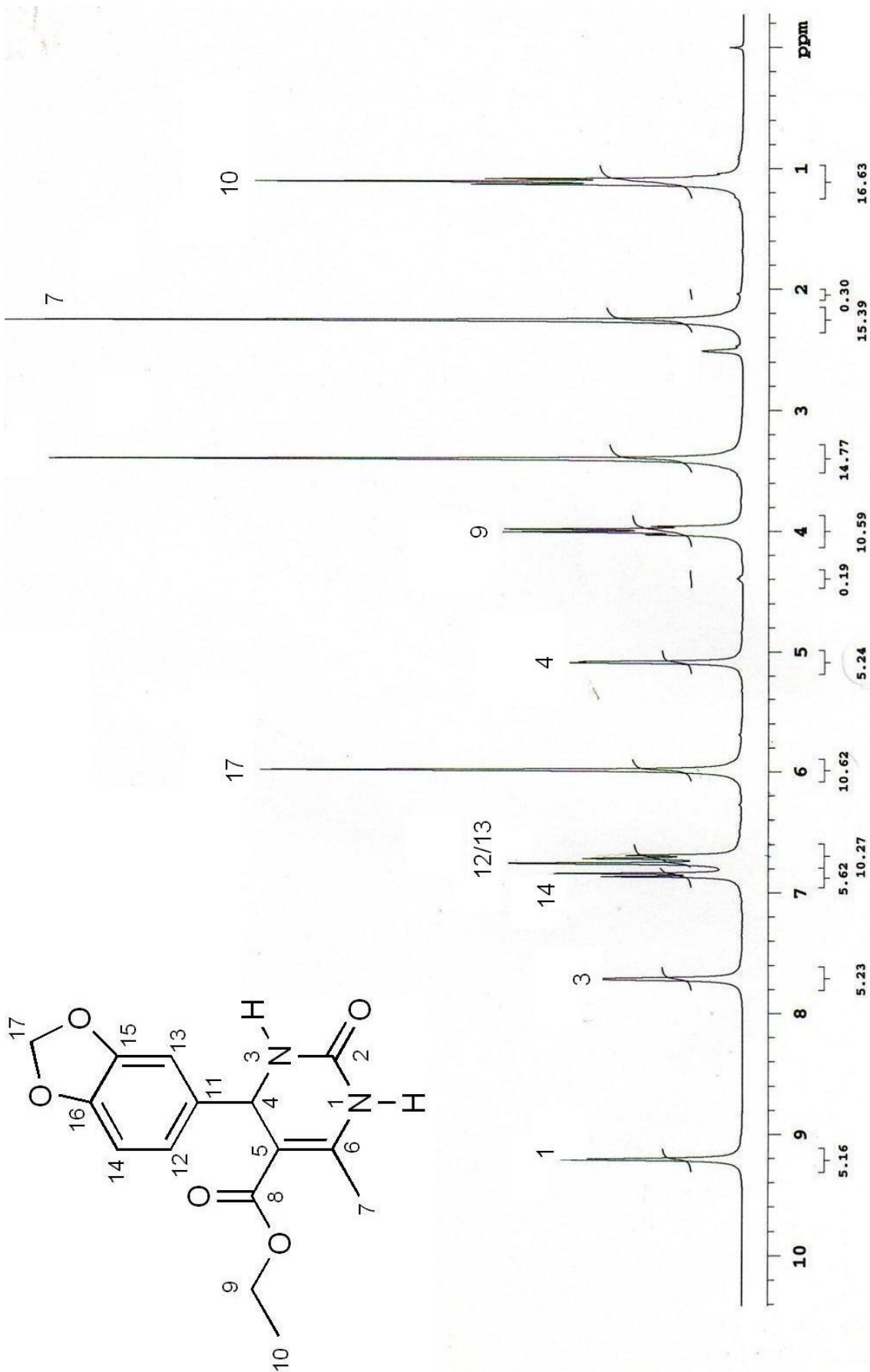
Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **181**



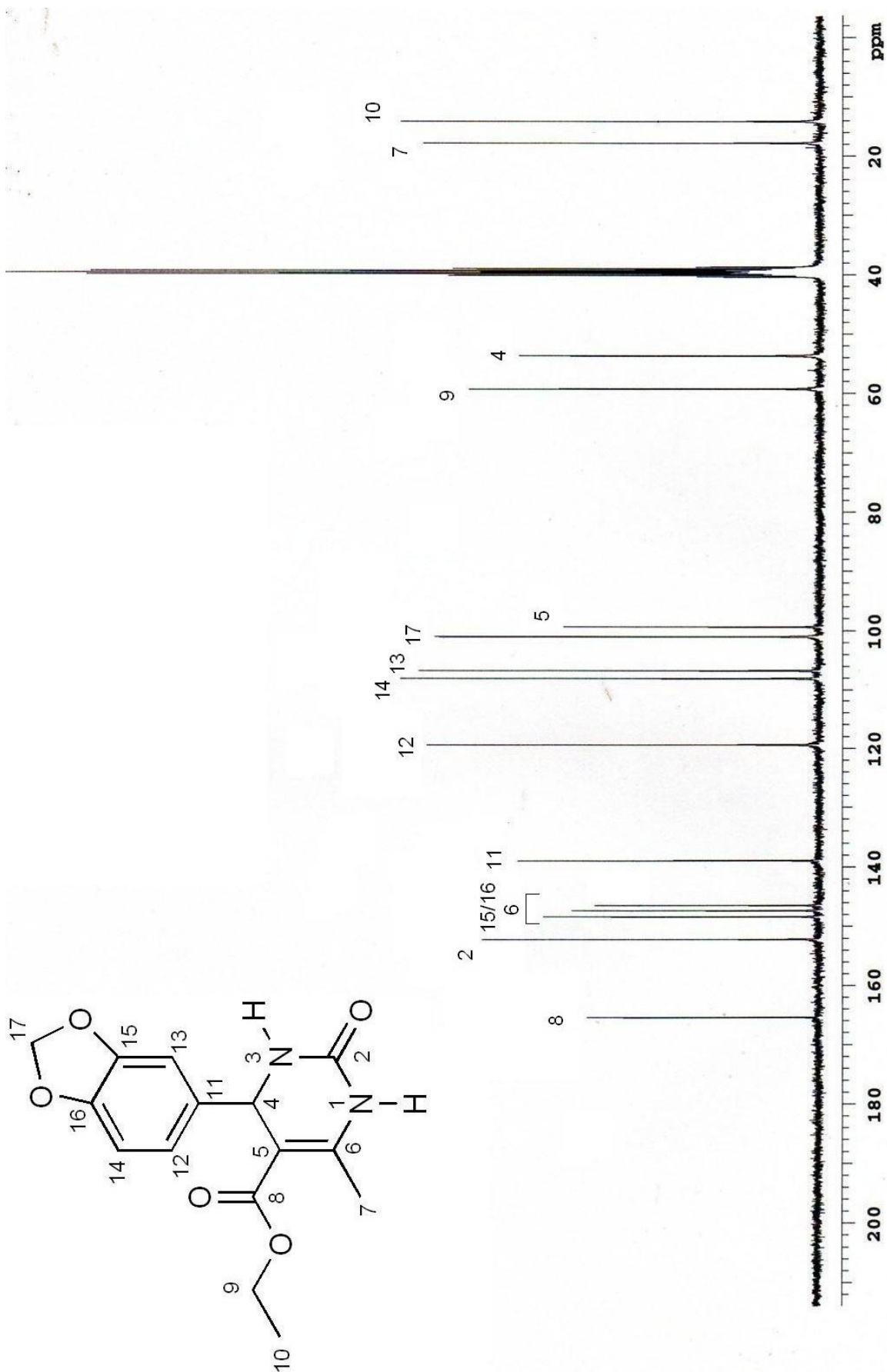
Espectro de C^{13} RMN (75 MHz, $DMSO-d_6$) do composto **181**



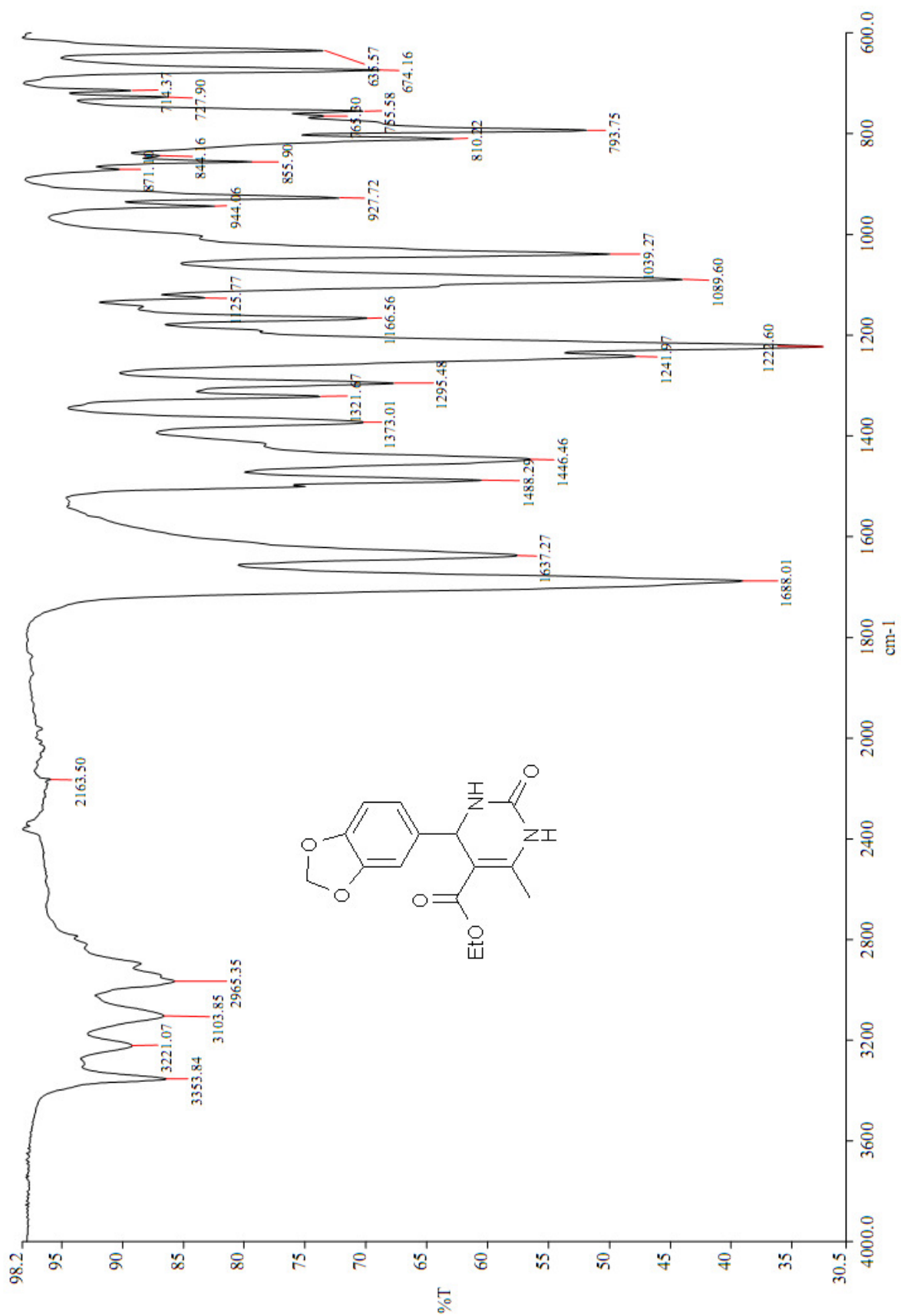
Espectro de IV (ATR) do composto **181**



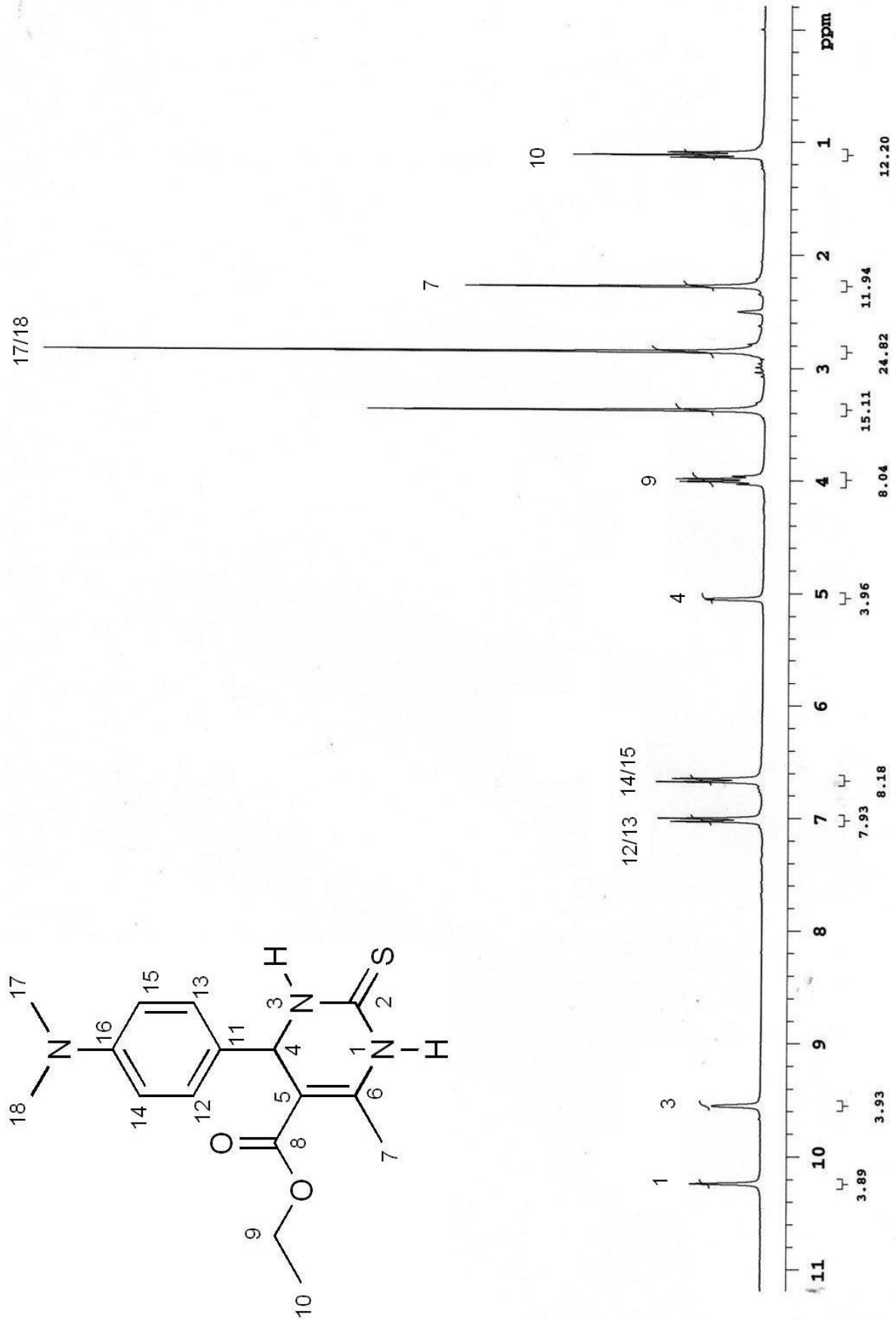
Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **190**



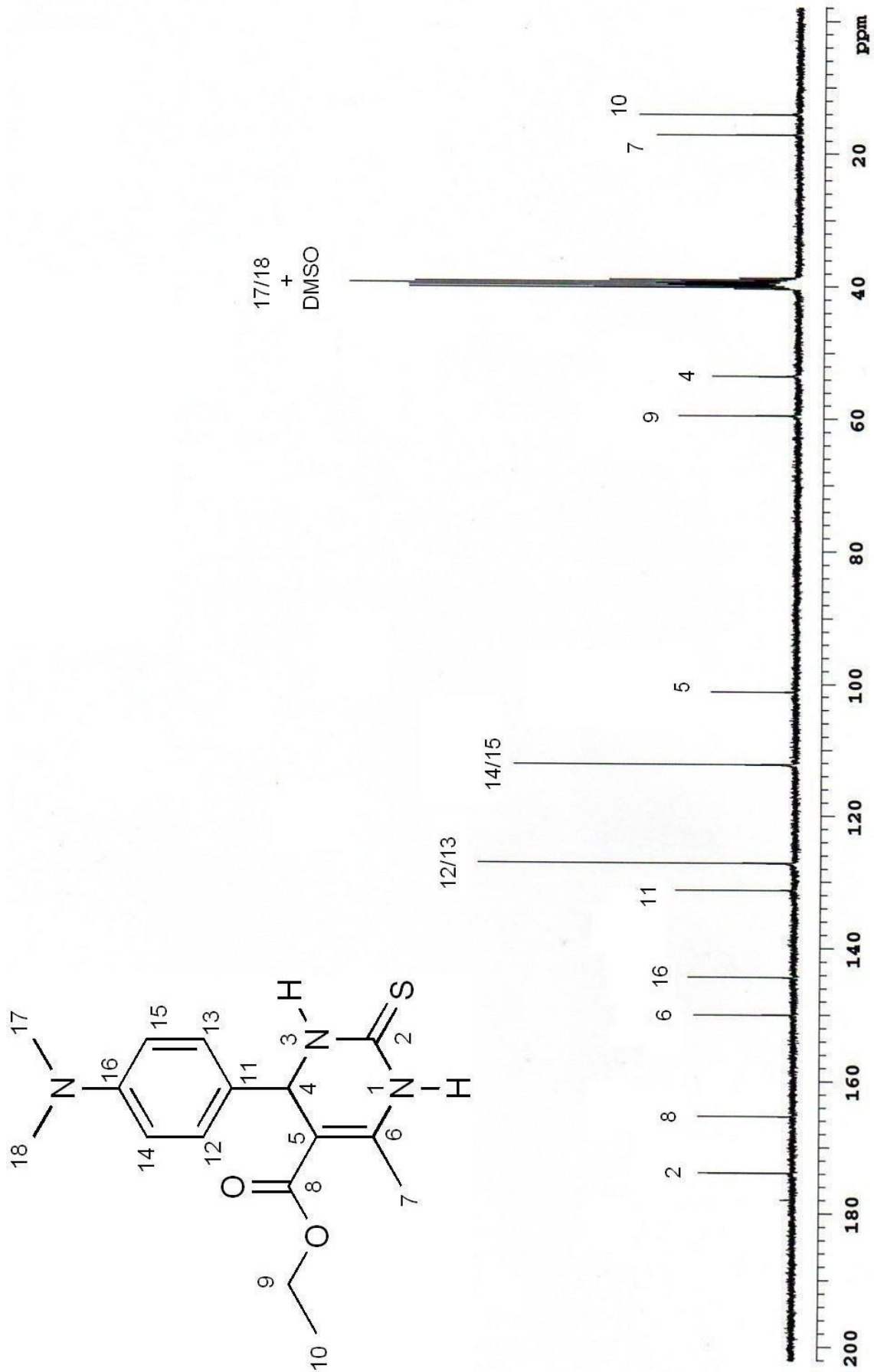
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d^6) do composto **190**



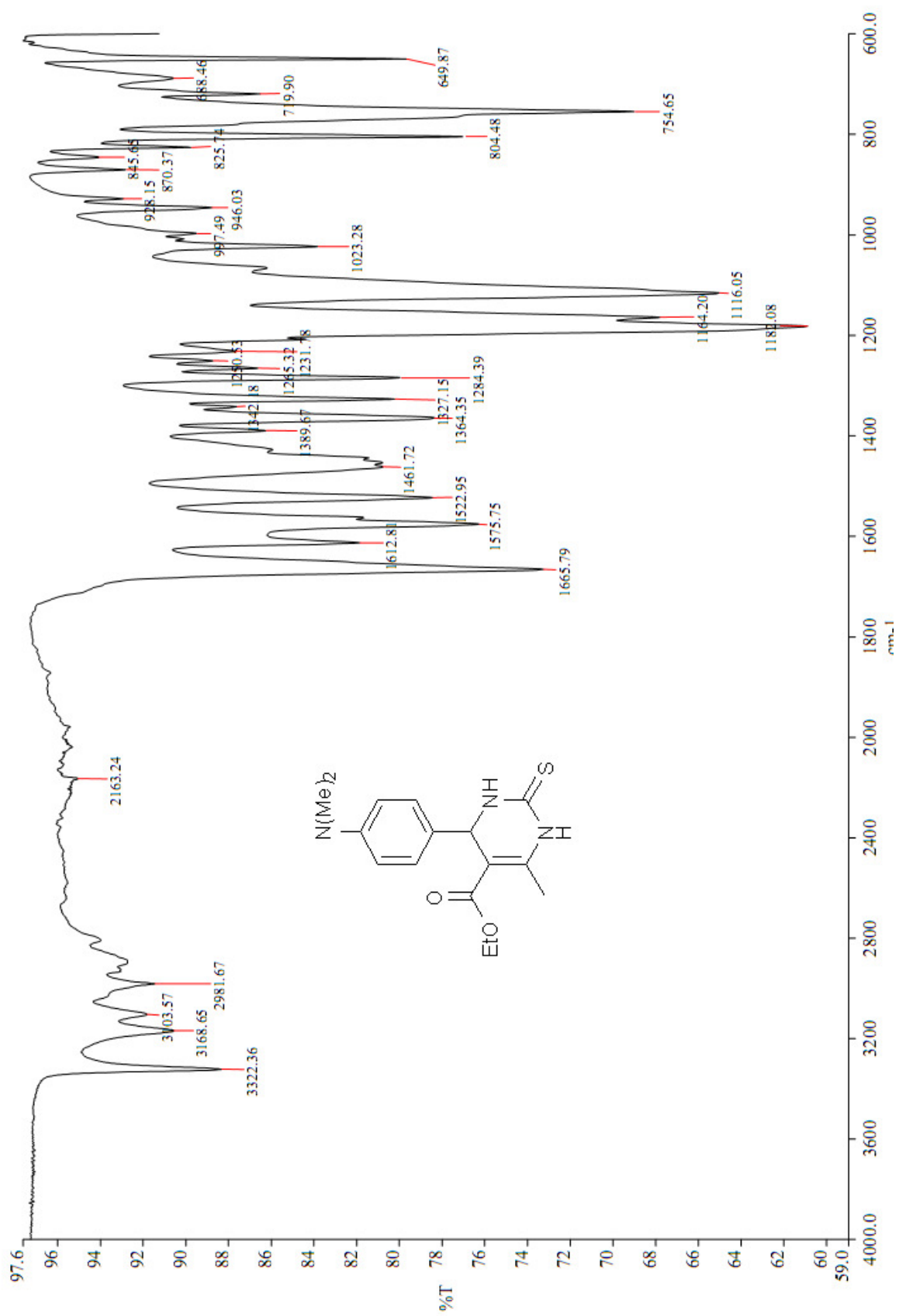
Espectro de IV (ATR) do composto **190**



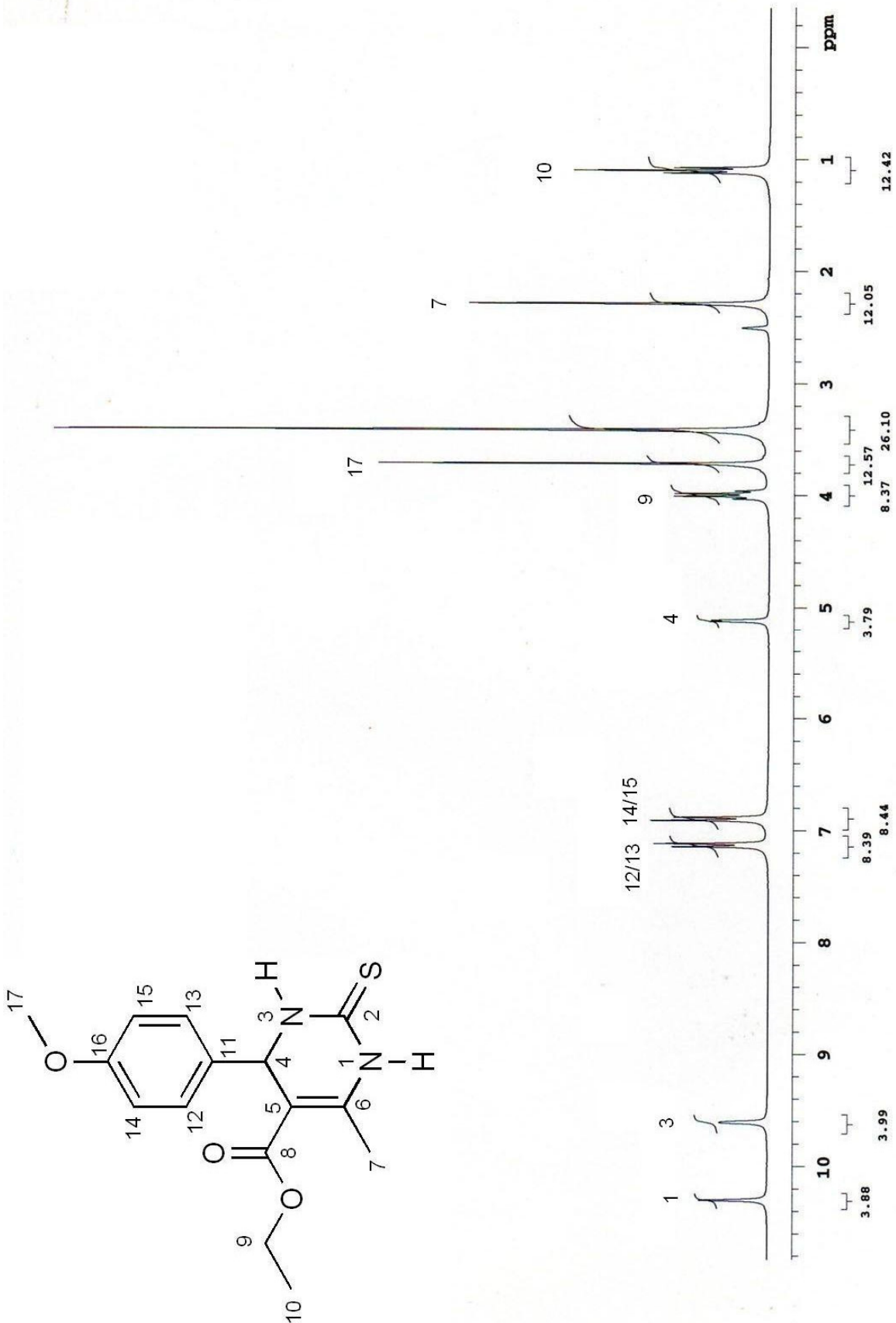
Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **184**



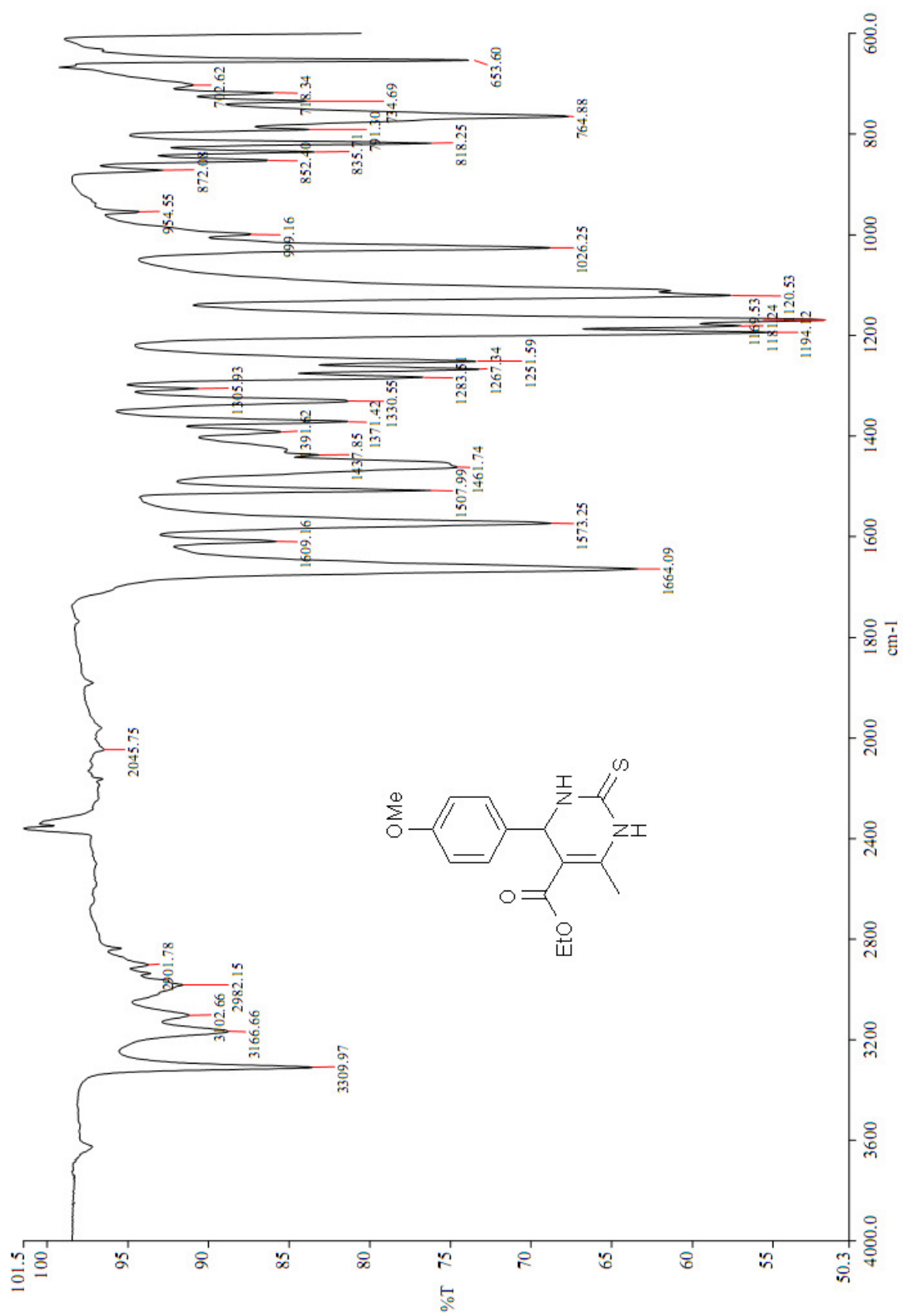
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO- d_6) do composto **184**



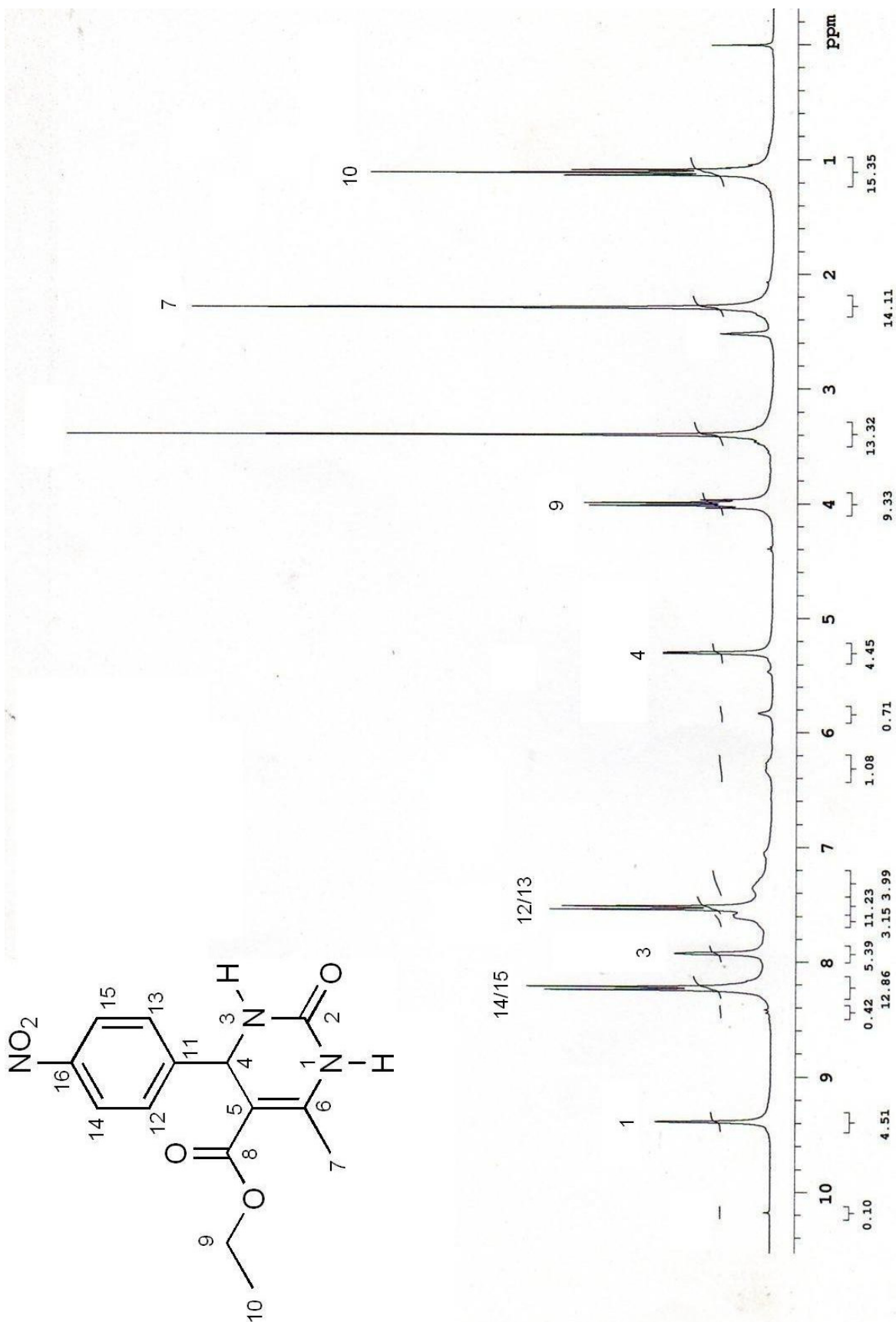
Espectro de IV (ATR) do composto **184**



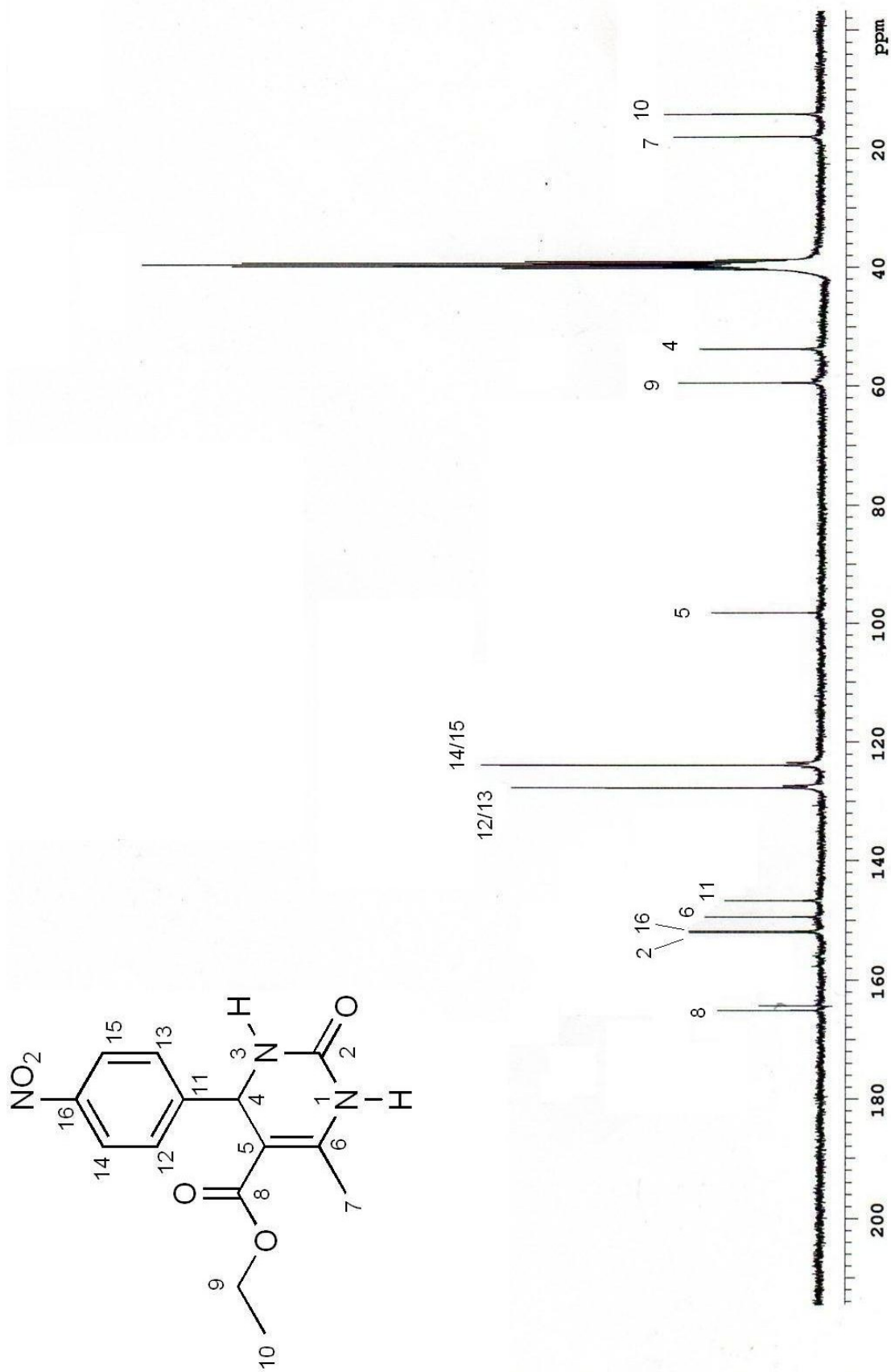
Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **172**



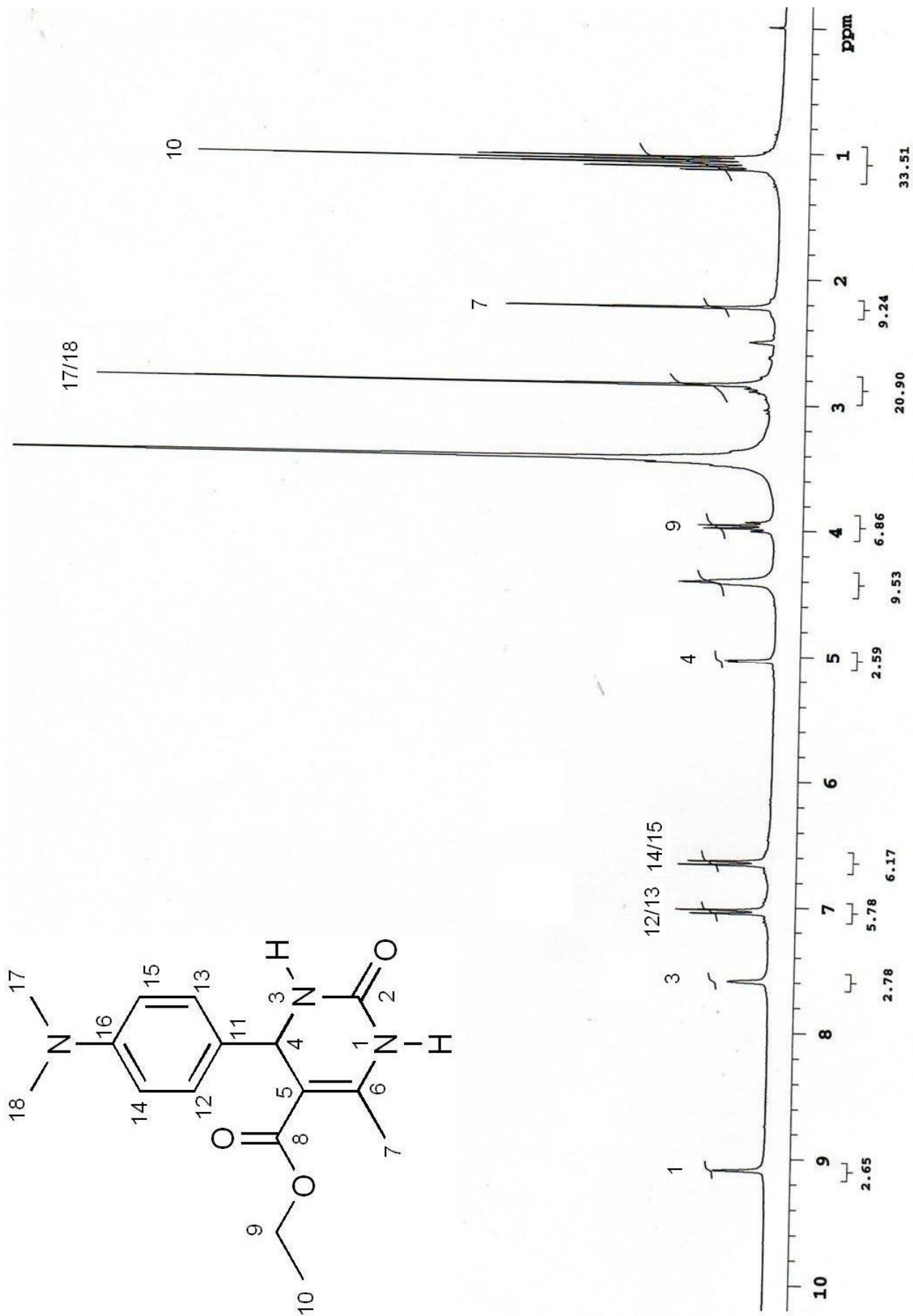
Espectro de IV (ATR) do composto **172**



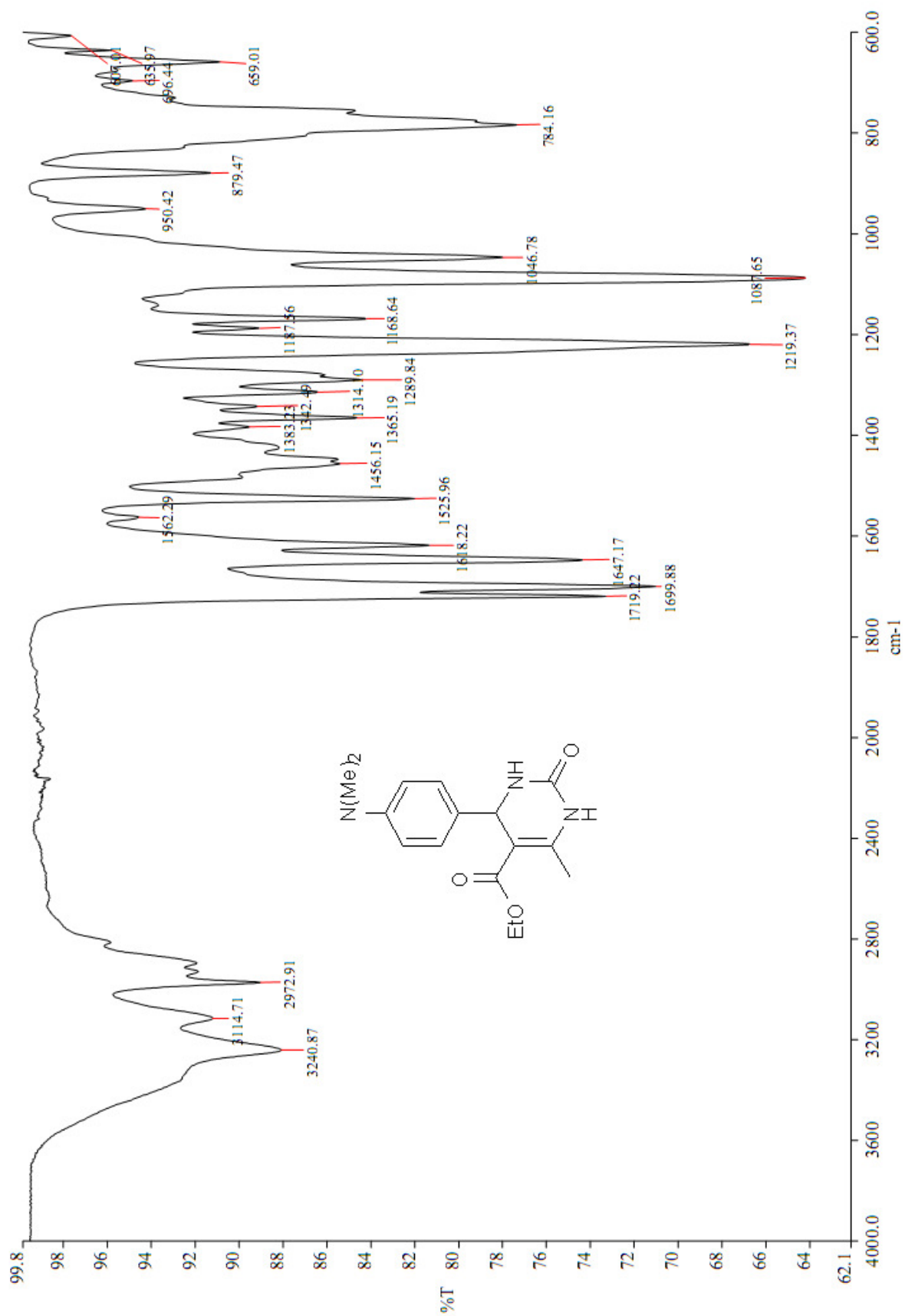
Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **217**



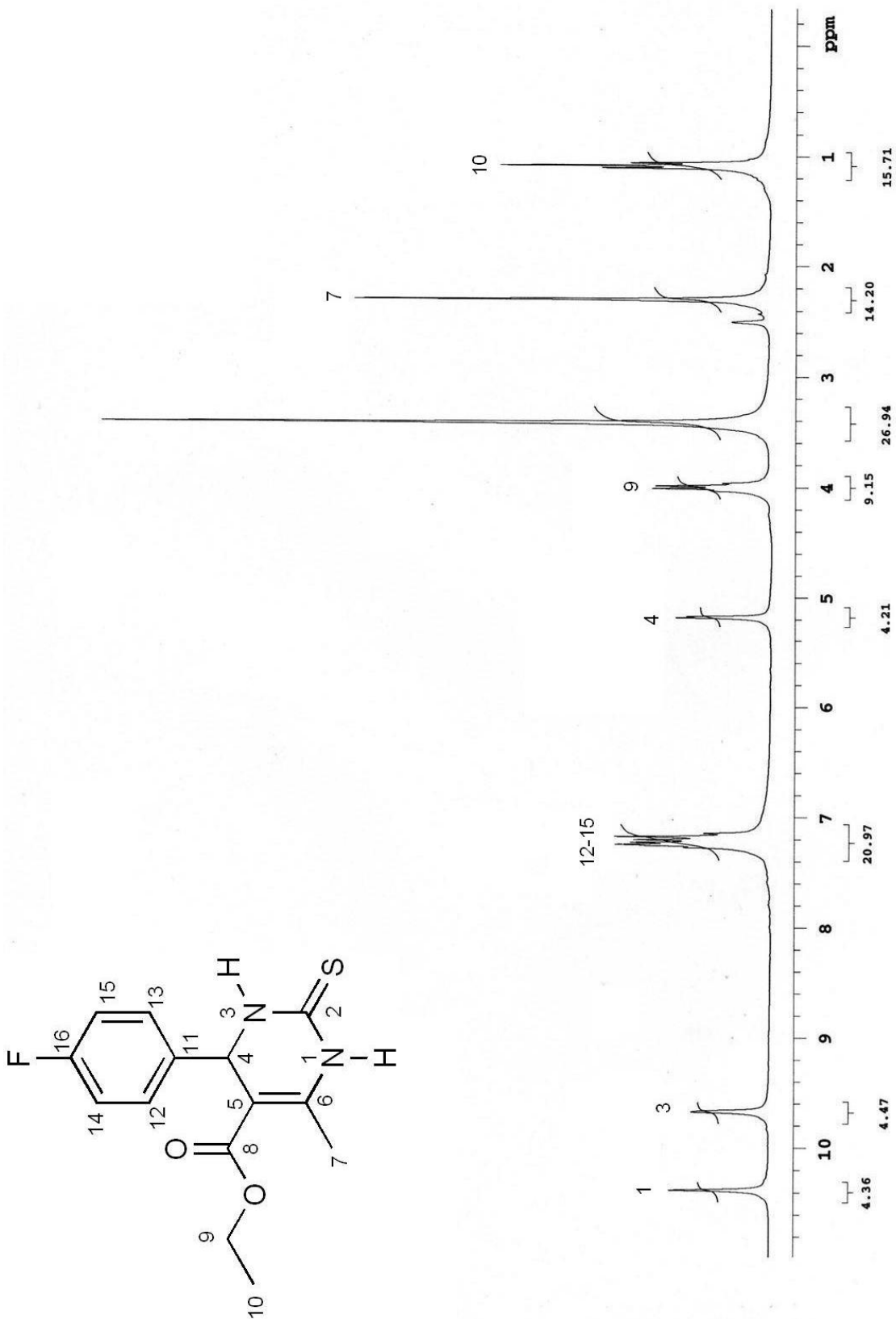
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d^6) do composto **217**



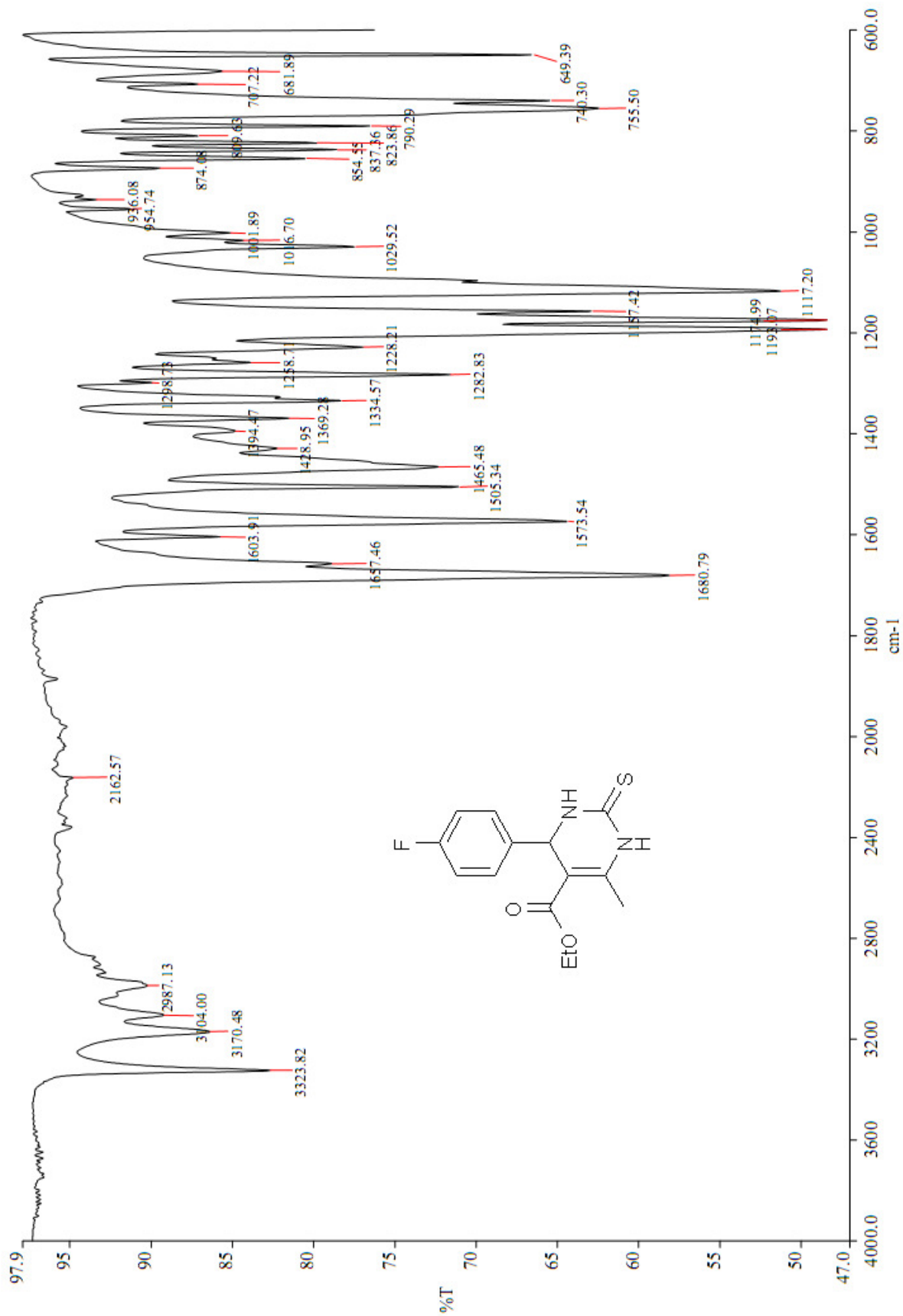
Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO- d_6) do composto **195**



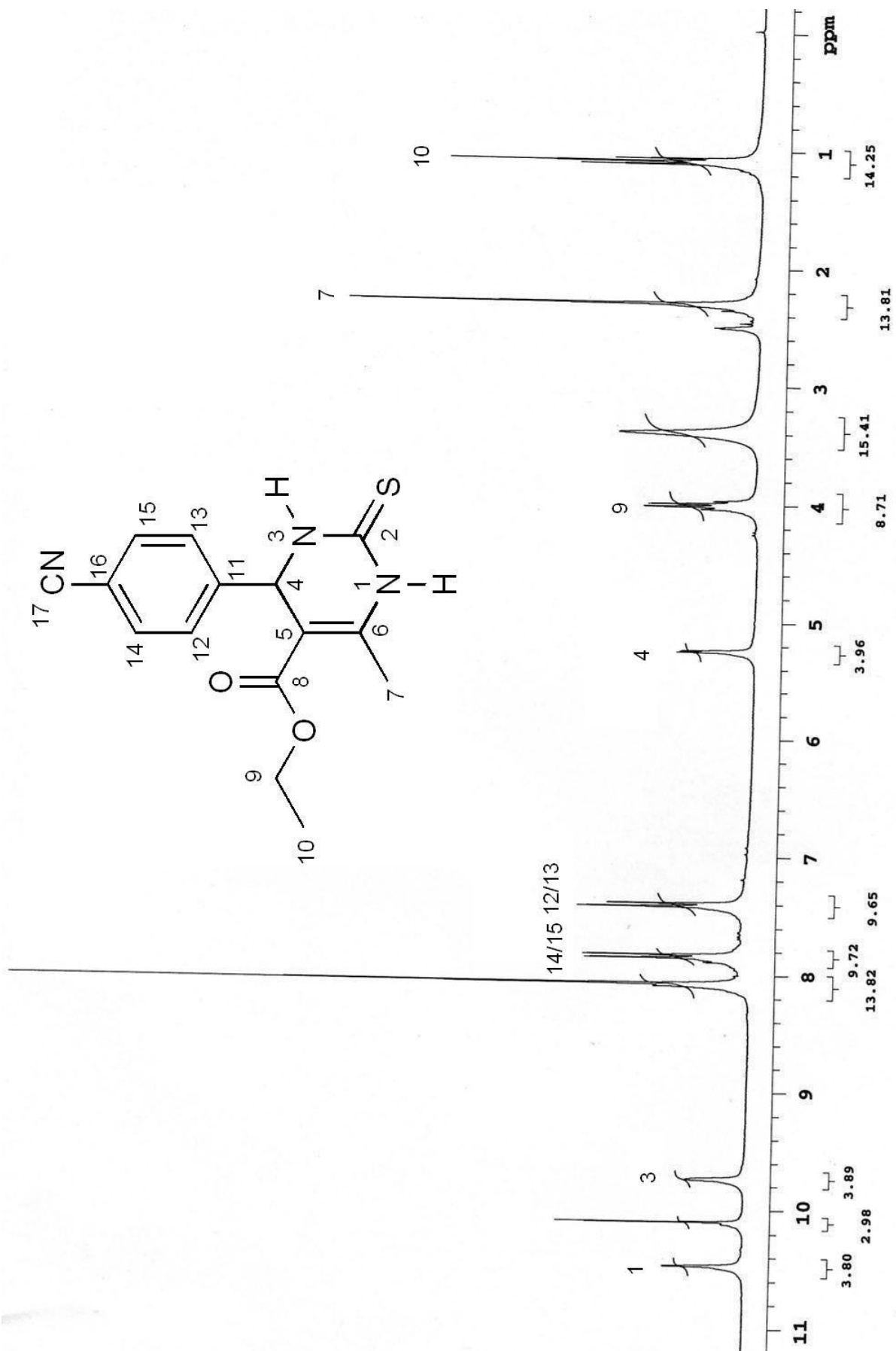
Espectro de IV (ATR) do composto **195**



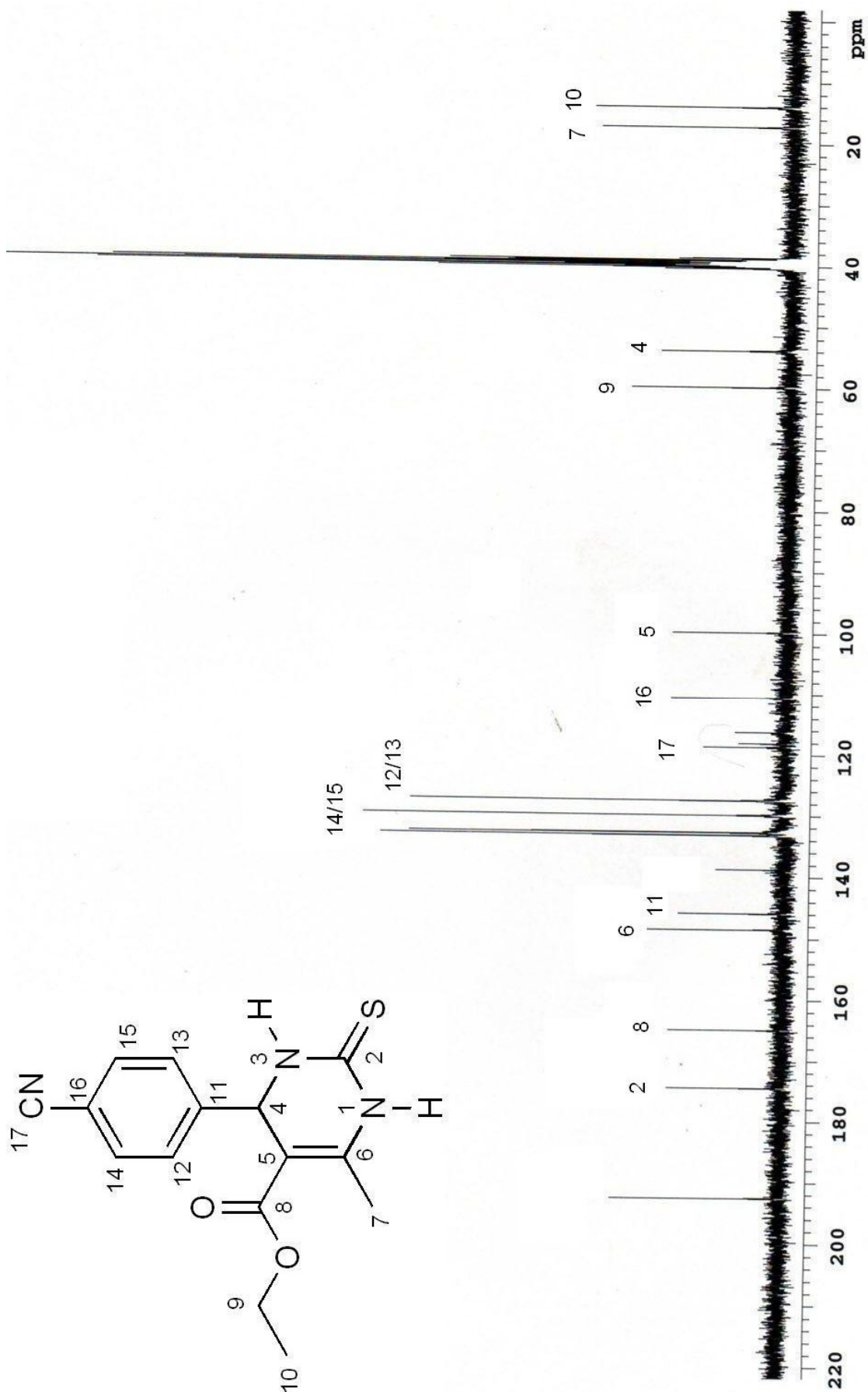
Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **173**



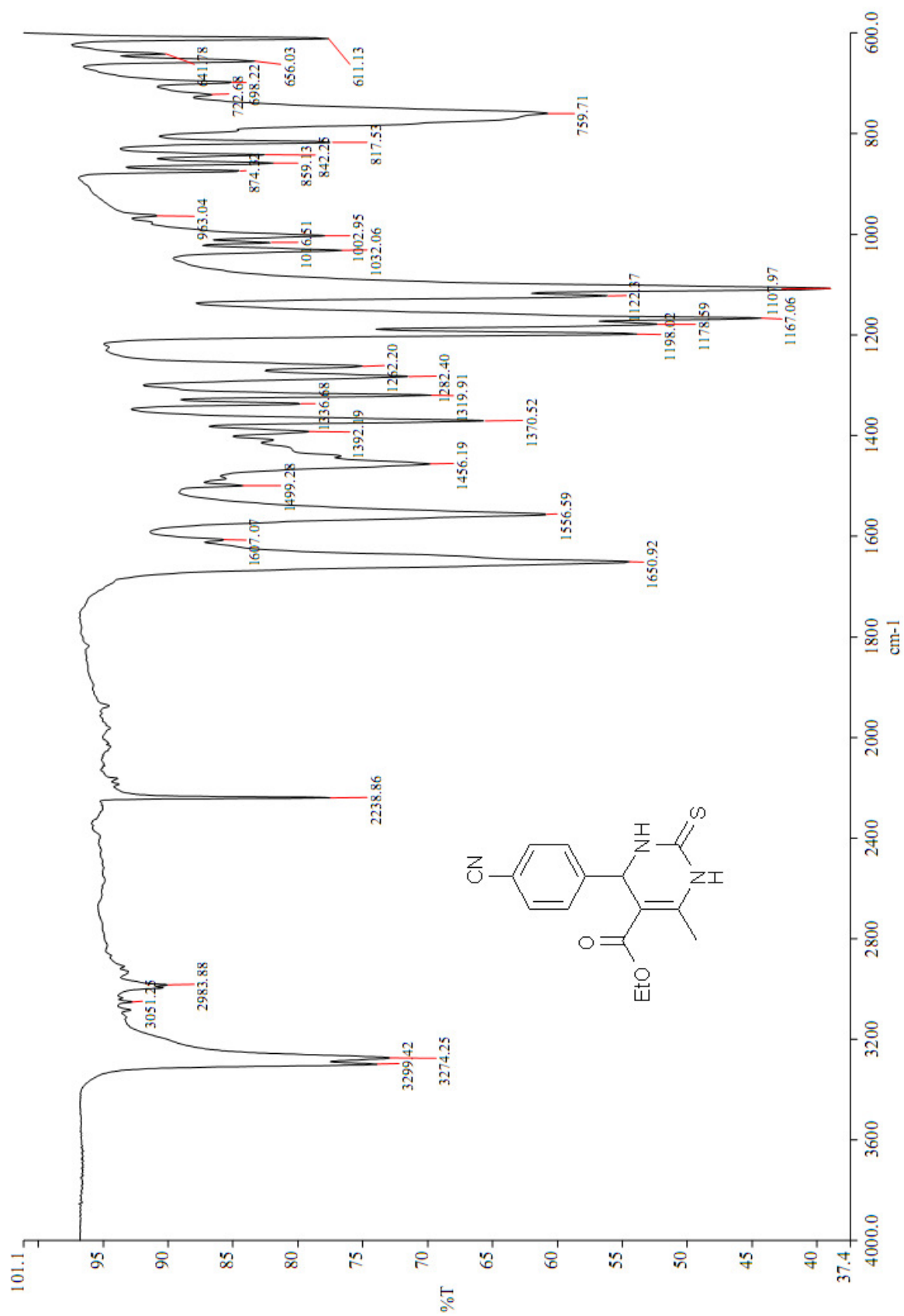
Espectro de IV (ATR) do composto **173**



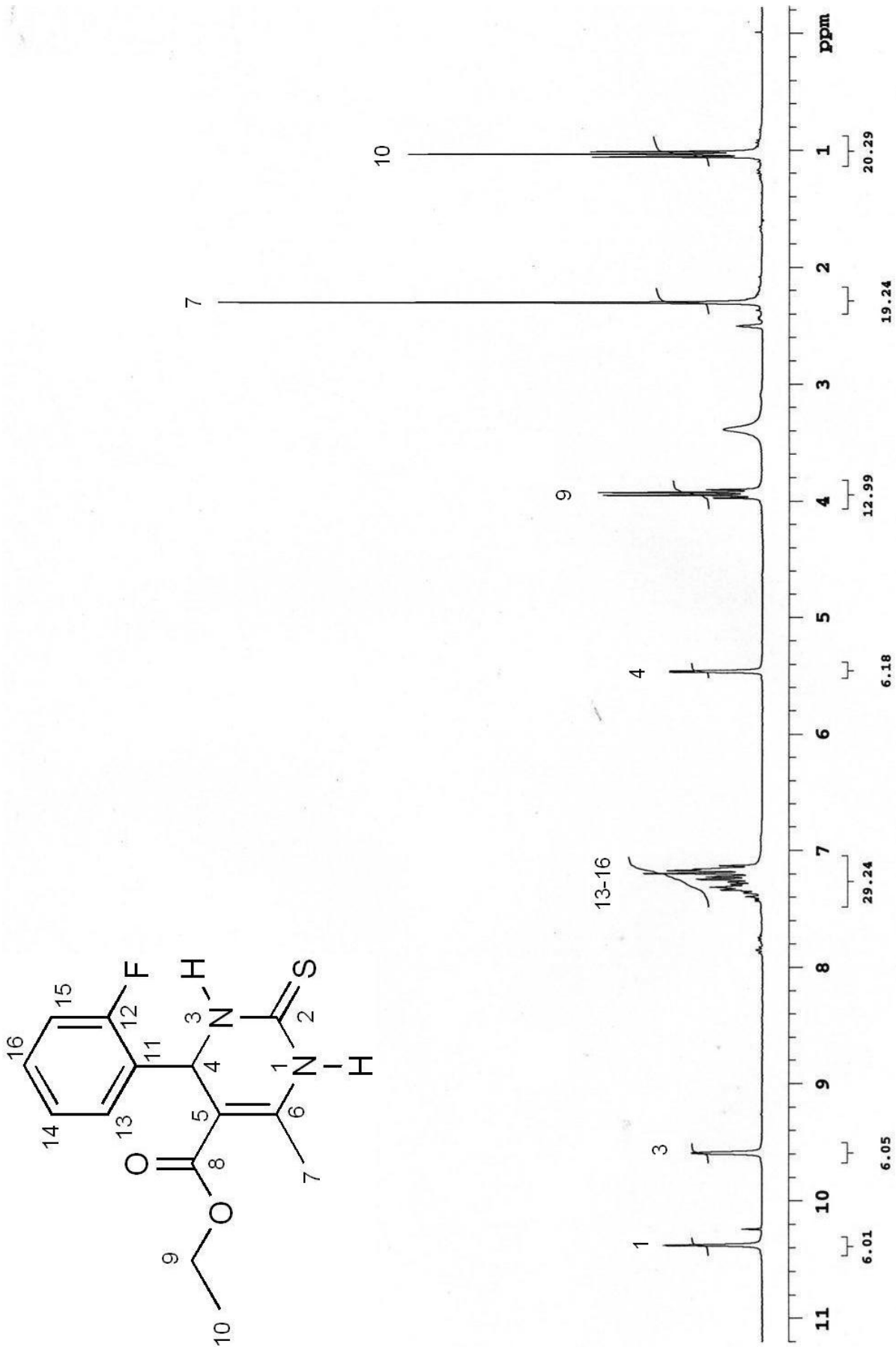
Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **182**



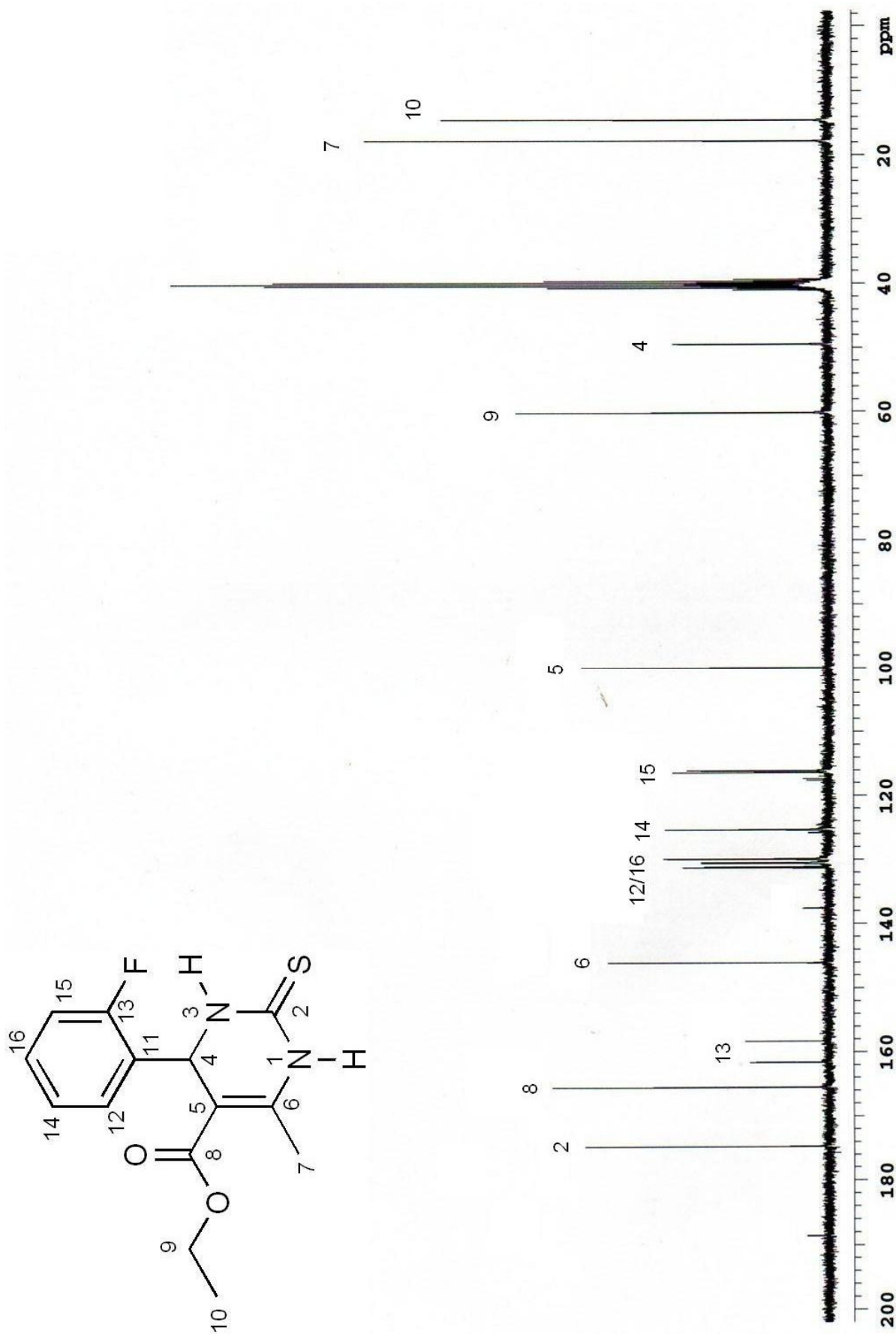
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d^6) do composto **182**



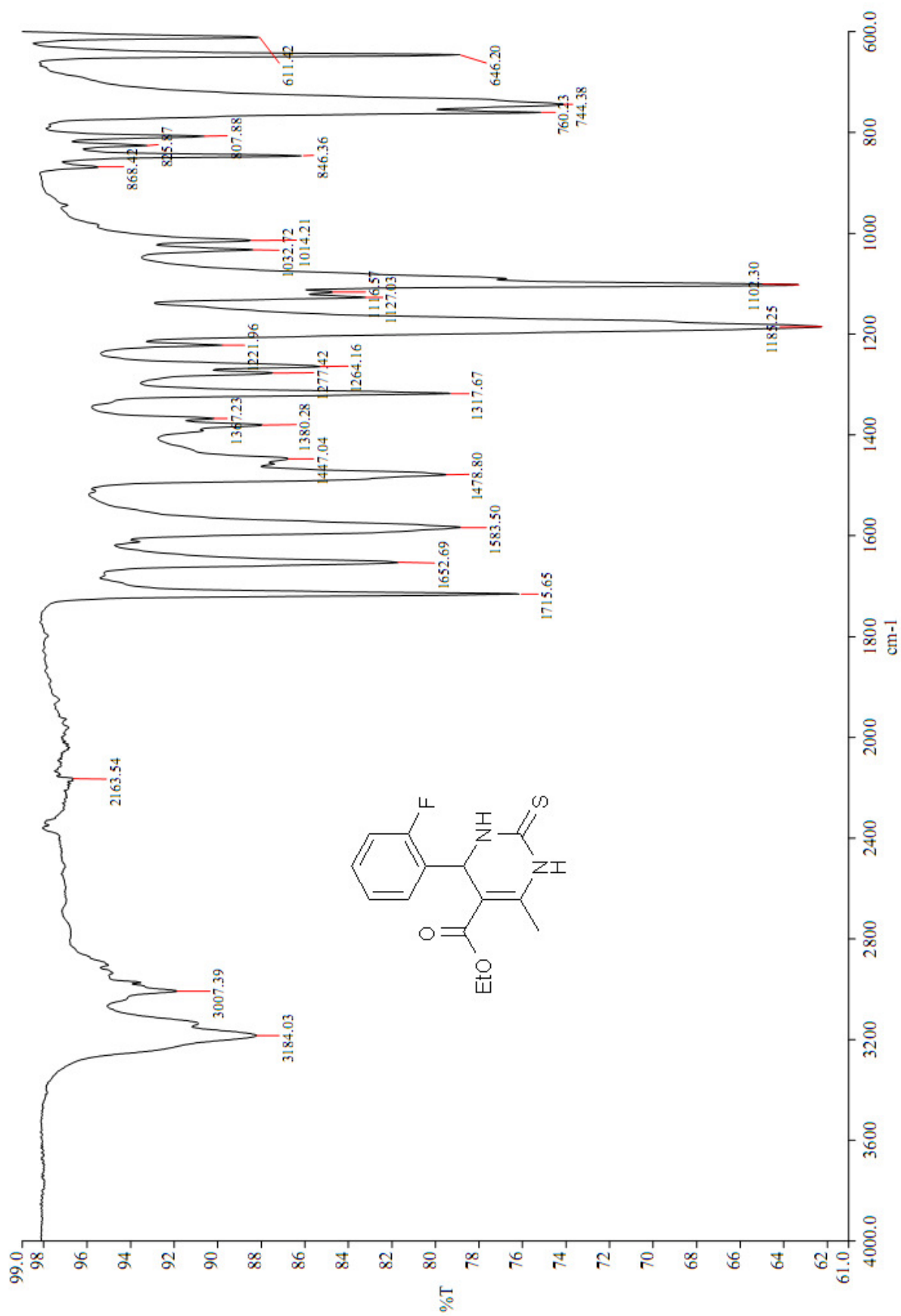
Espectro de IV (ATR) do composto **182**



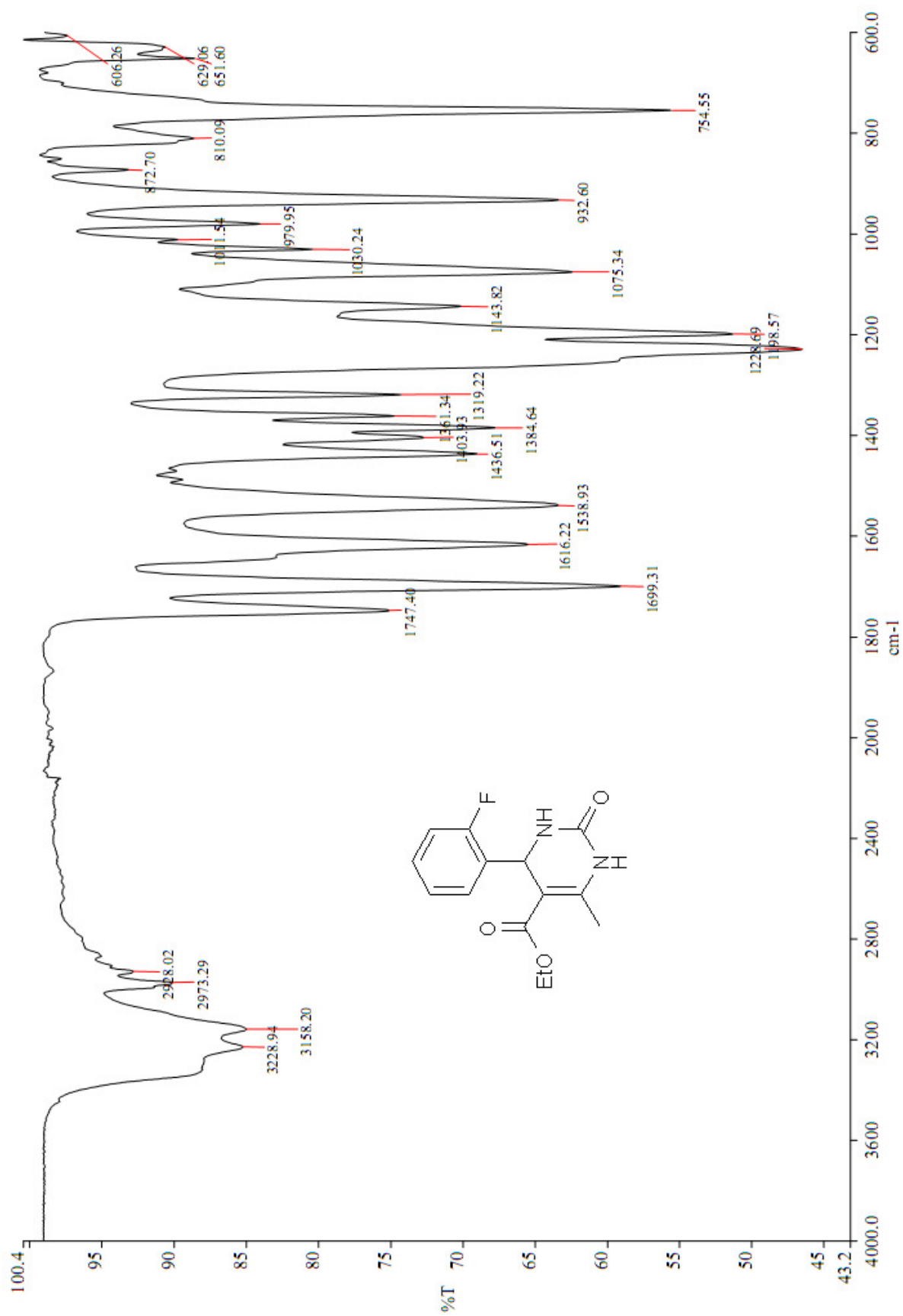
Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **211**



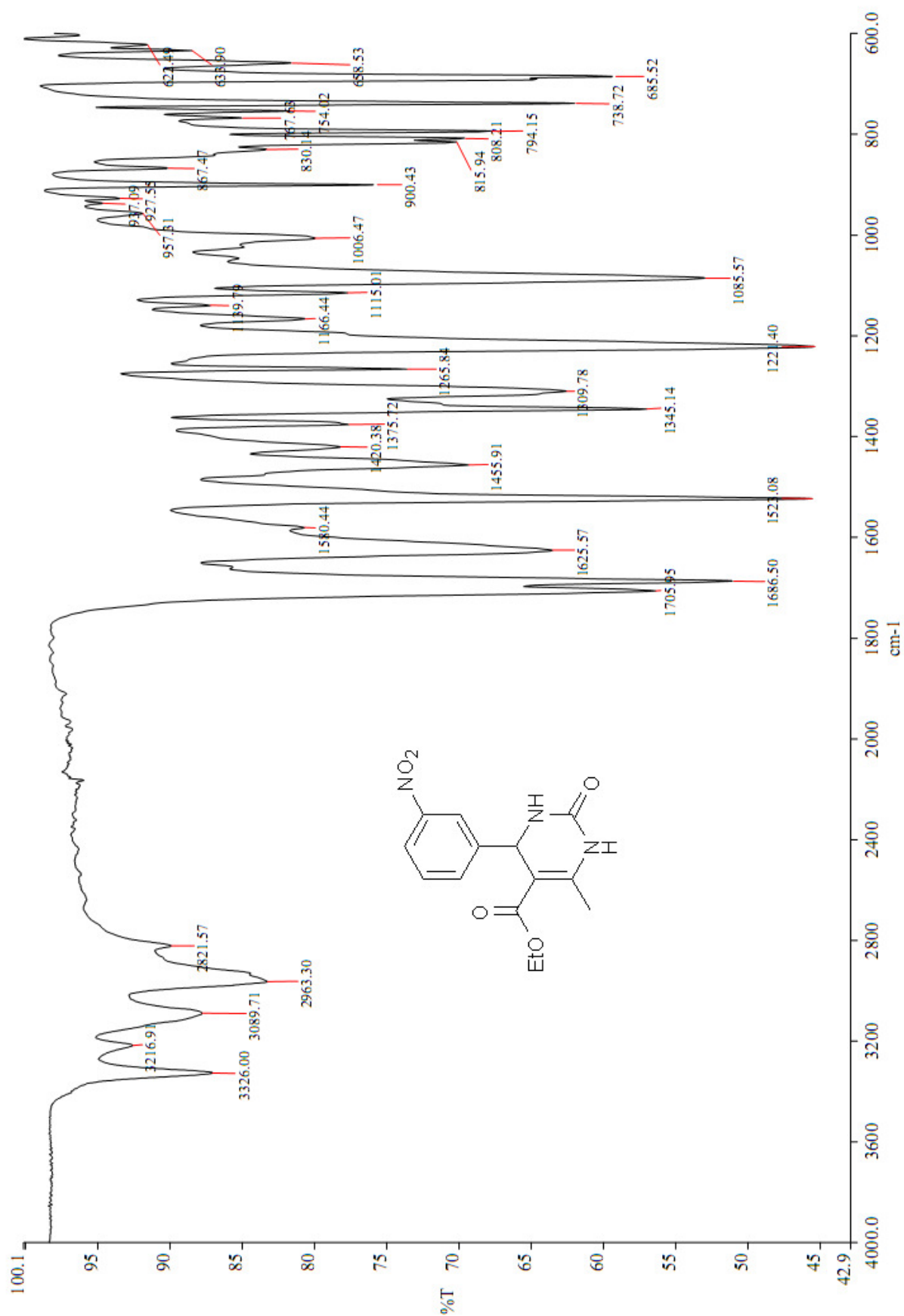
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d^6) do composto **211**



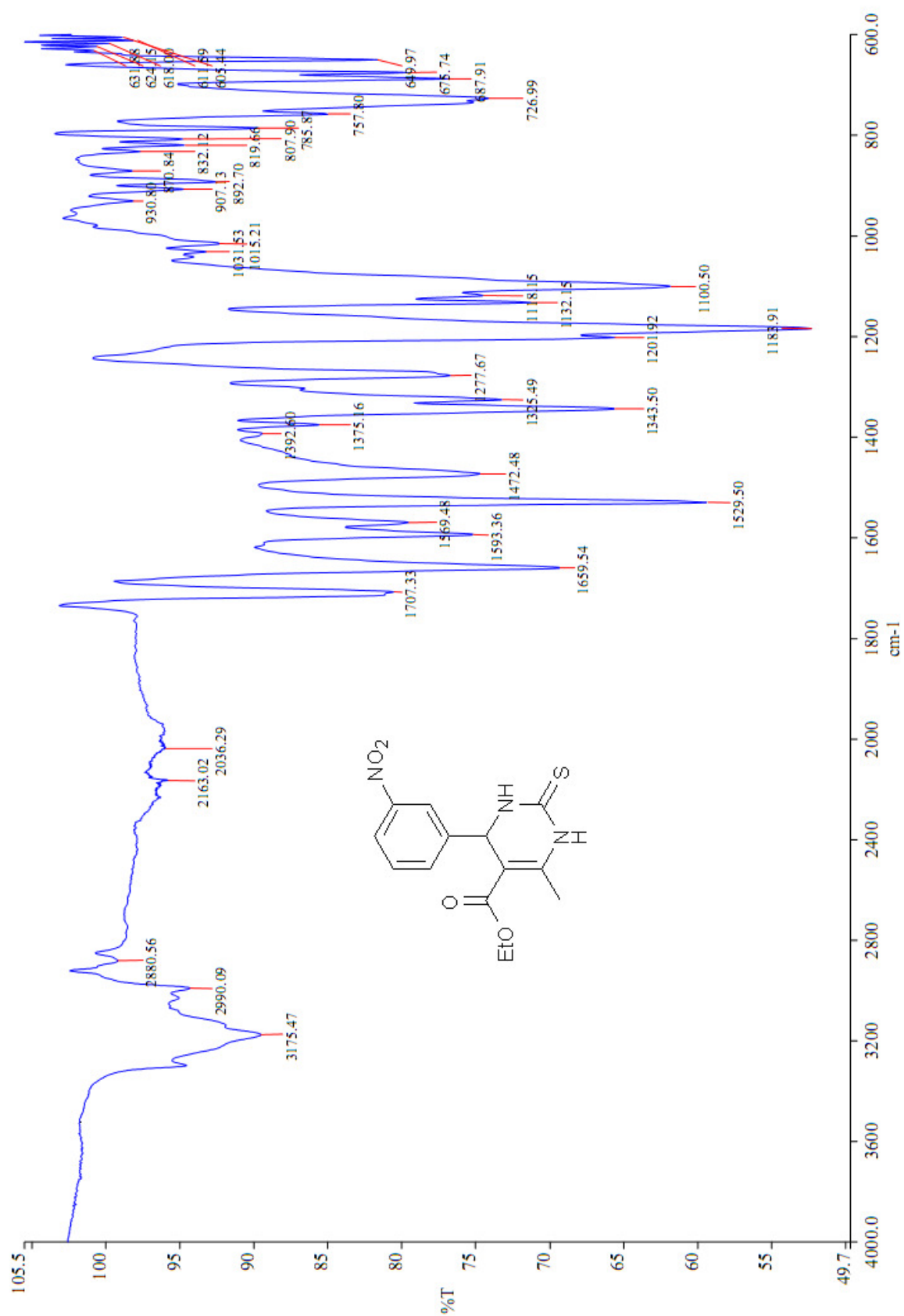
Espectro de IV (ATR) do composto **211**



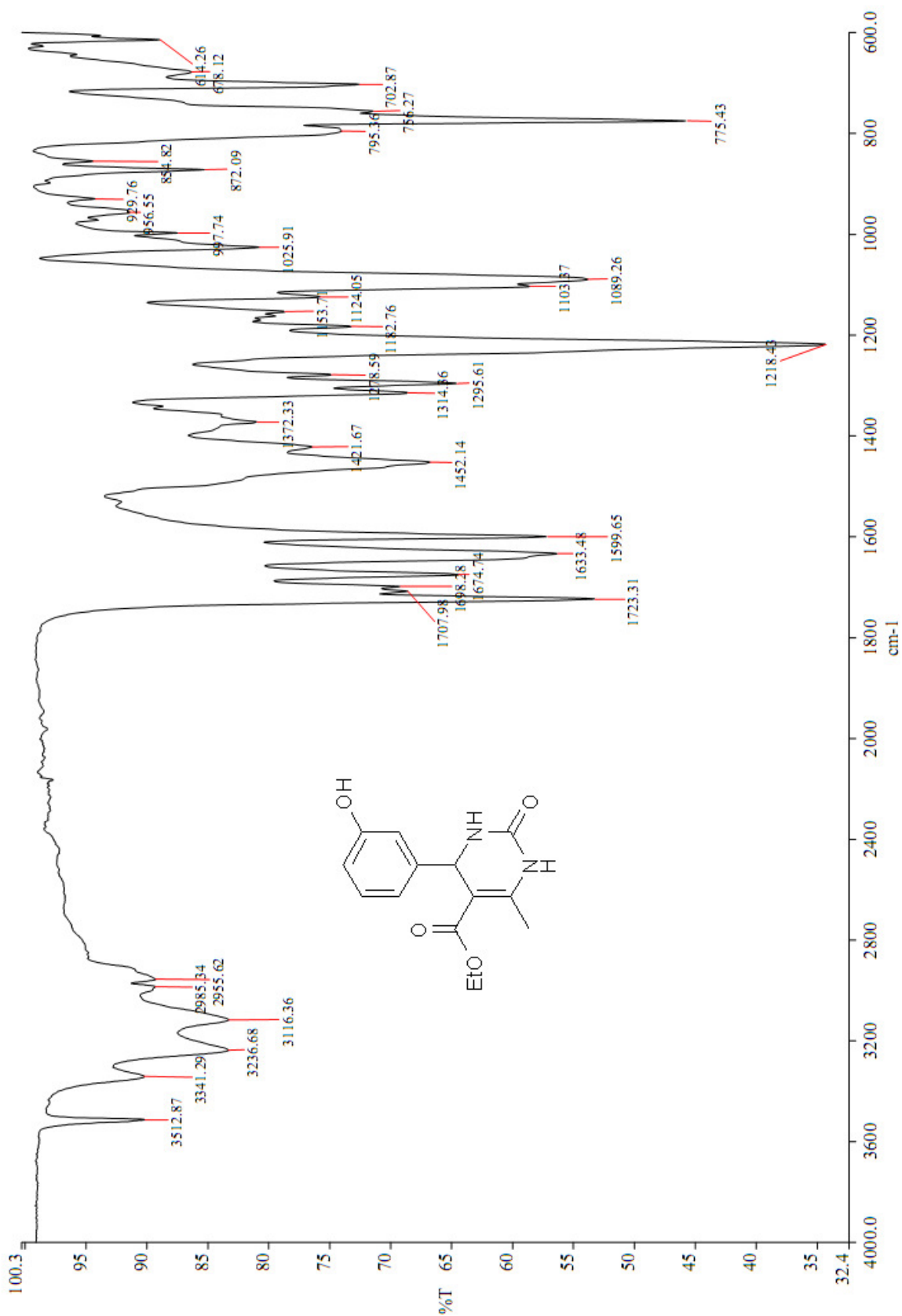
Espectro de IV (ATR) do composto **215**



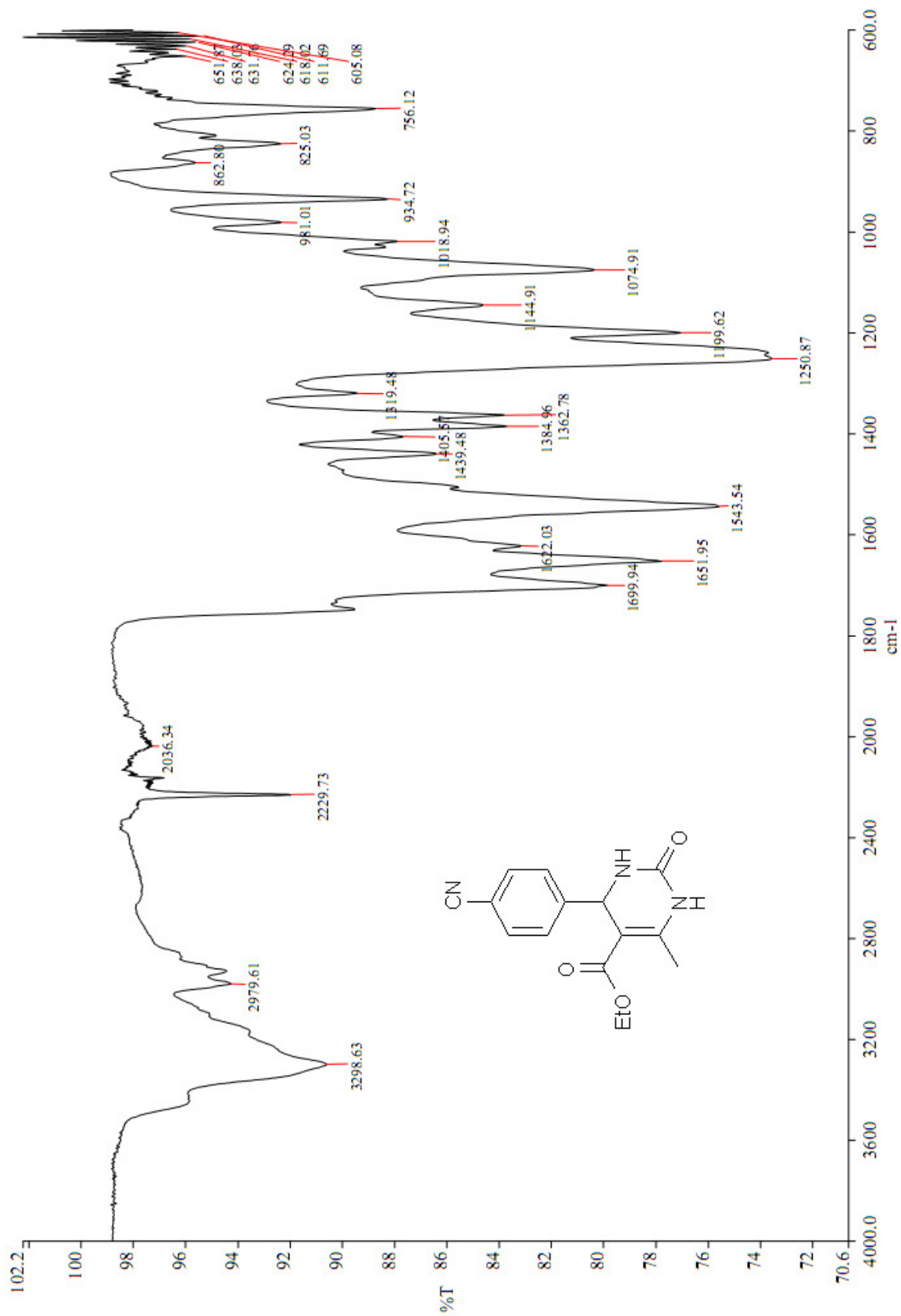
Espectro de IV (ATR) do composto **214**



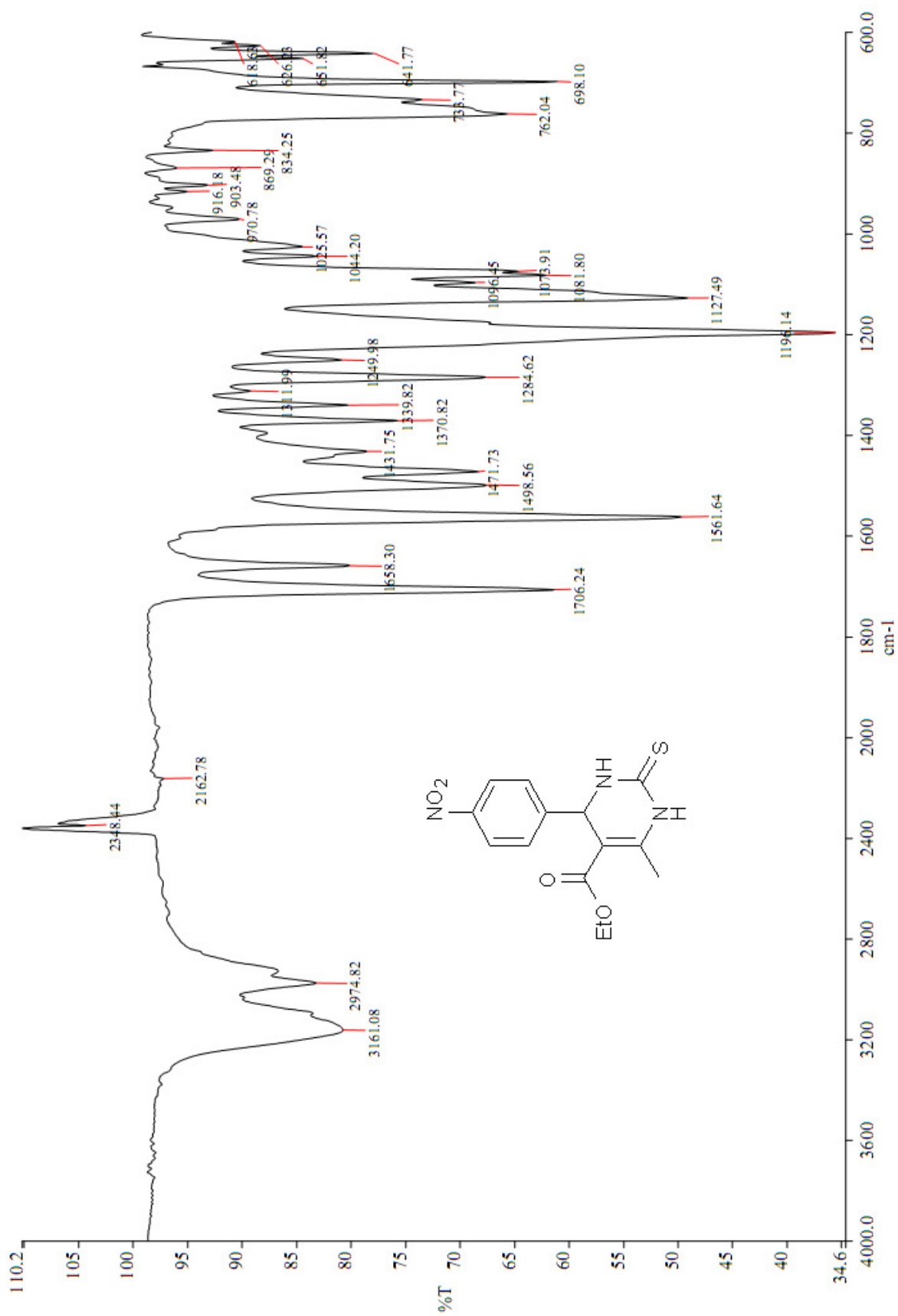
Espectro de IV (ATR) do composto **210**



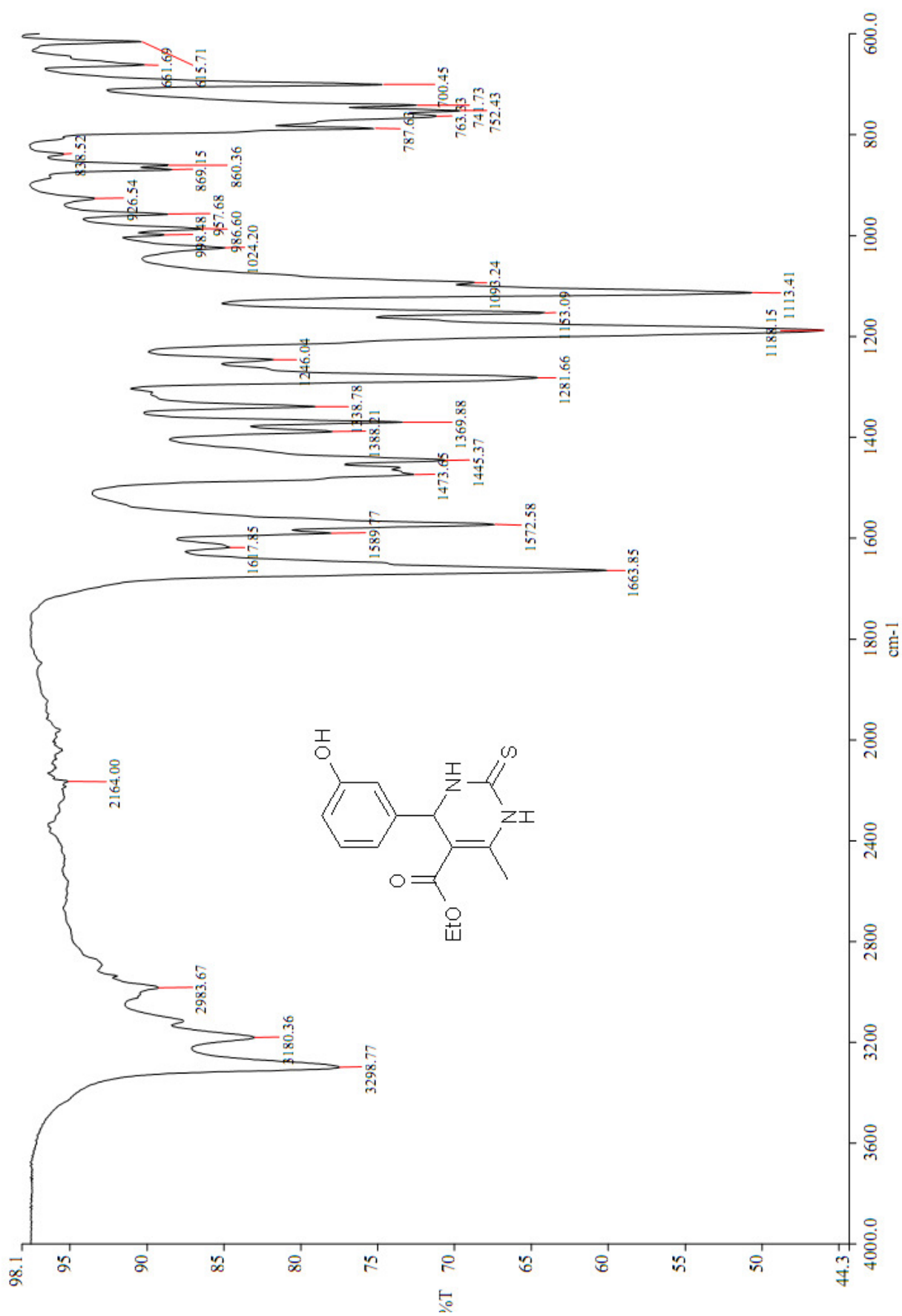
Espectro de IV (ATR) do composto **213**



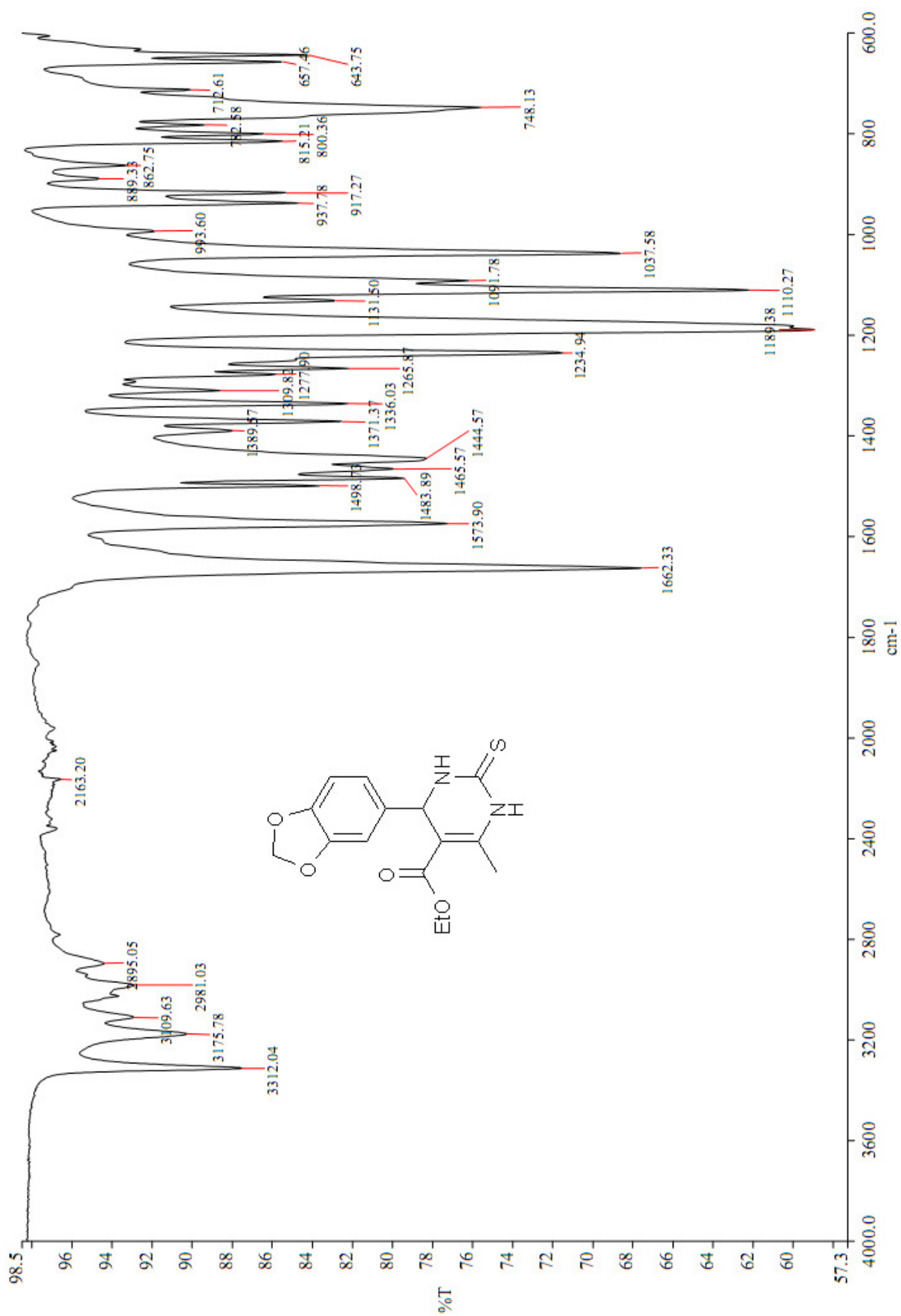
Espectro de IV (ATR) do composto **183**



Espectro de IV (ATR) do composto **171**

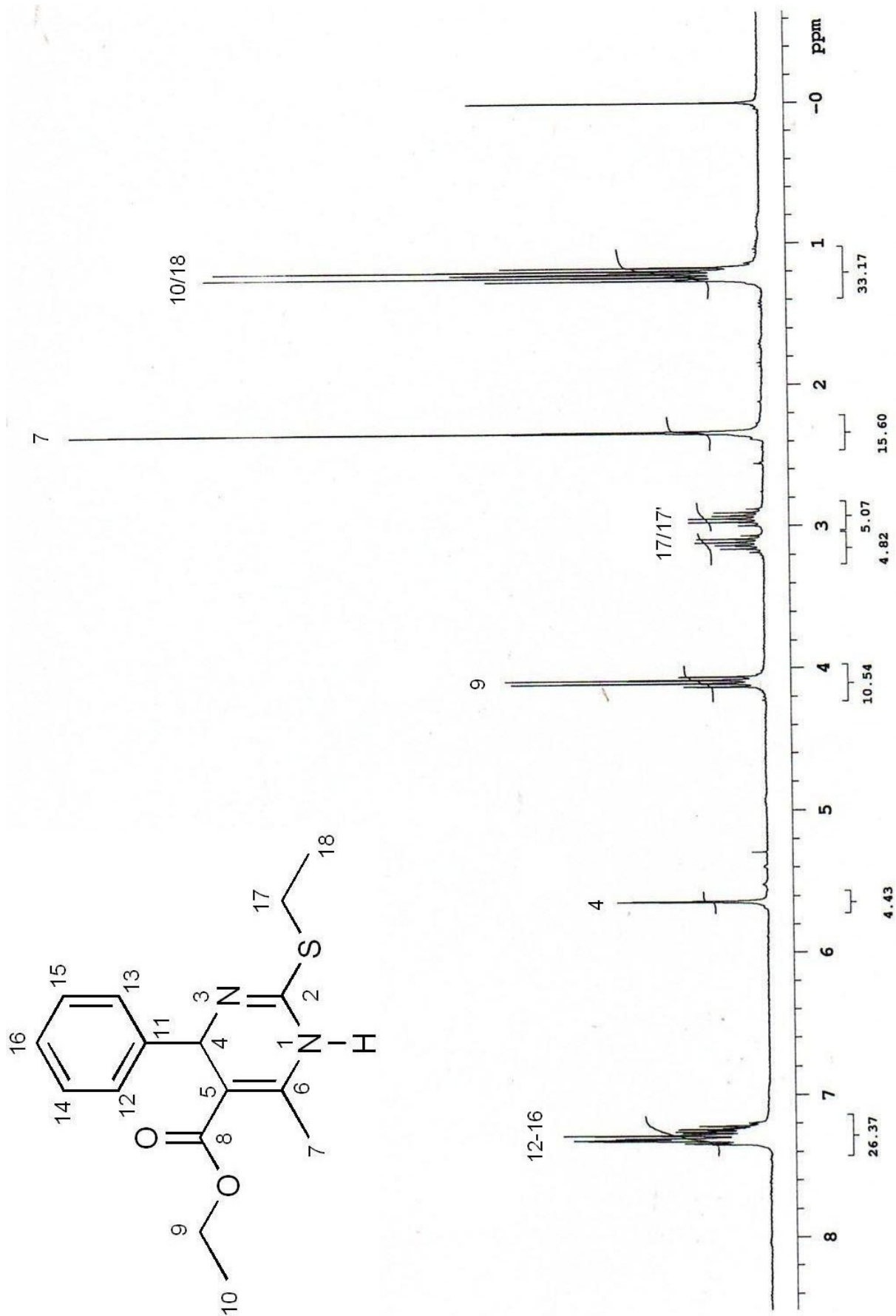


Espectro de IV (ATR) do composto **209**

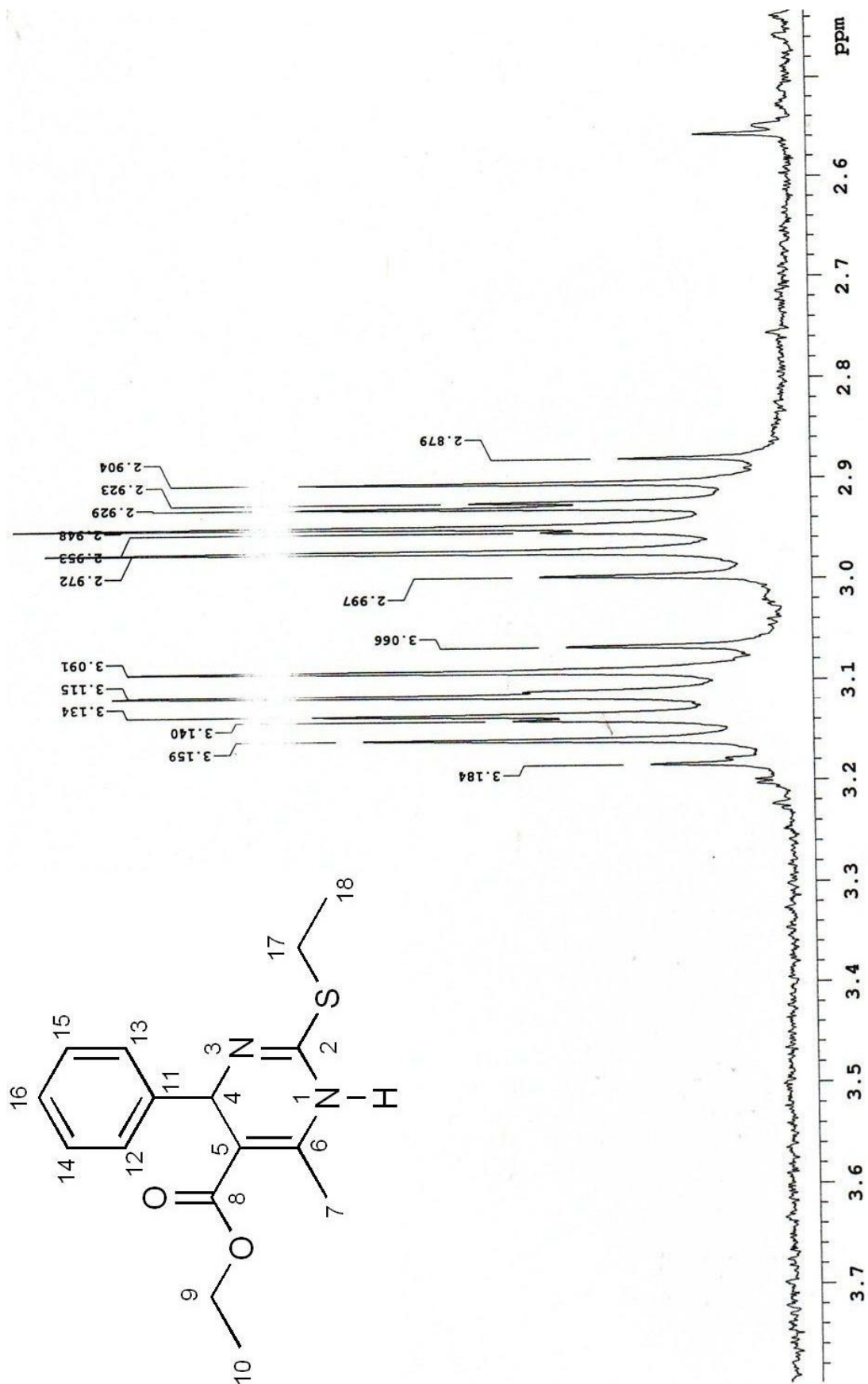


Espectro de IV (ATR) do composto **191**

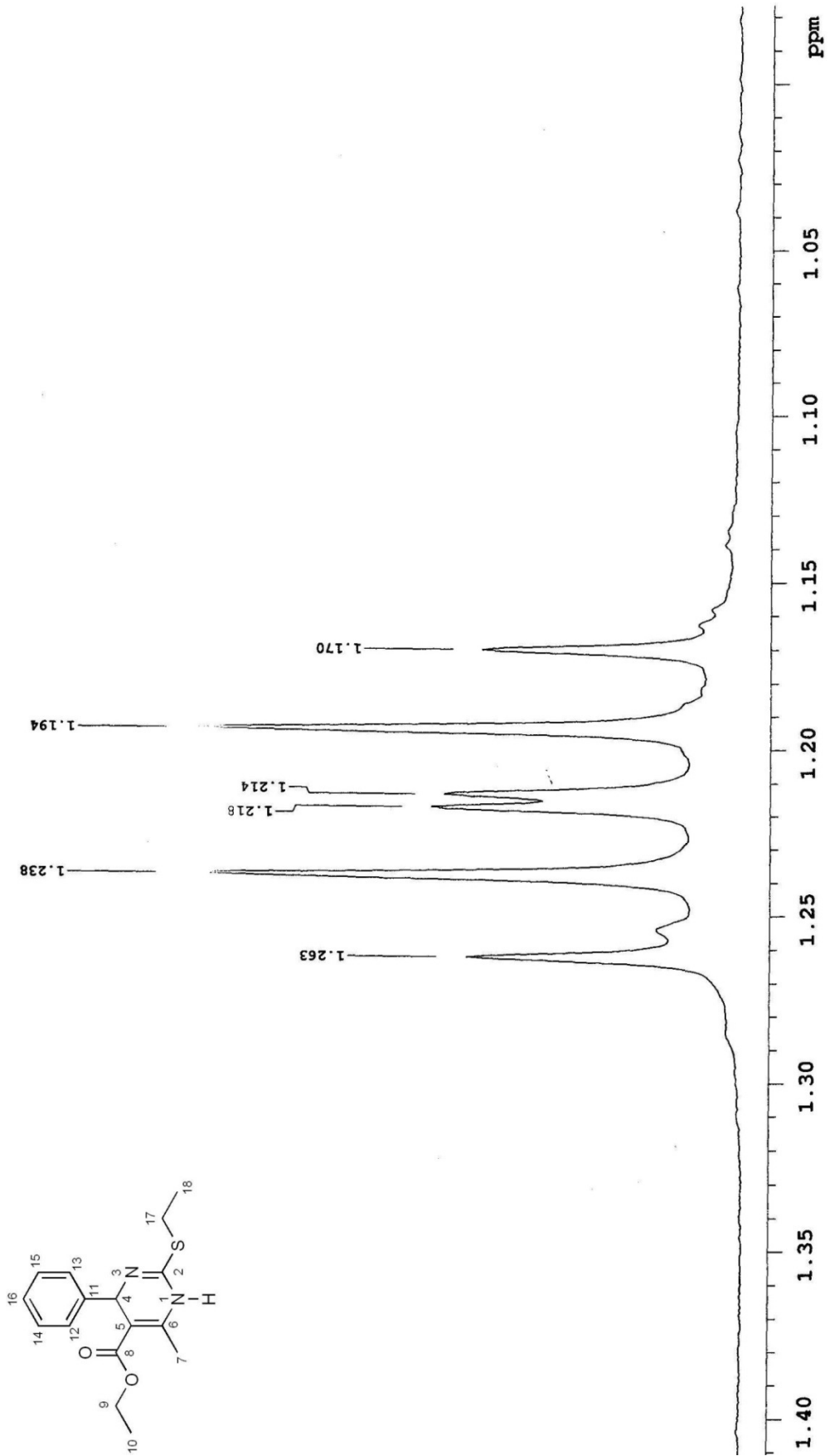
Demais produtos obtidos



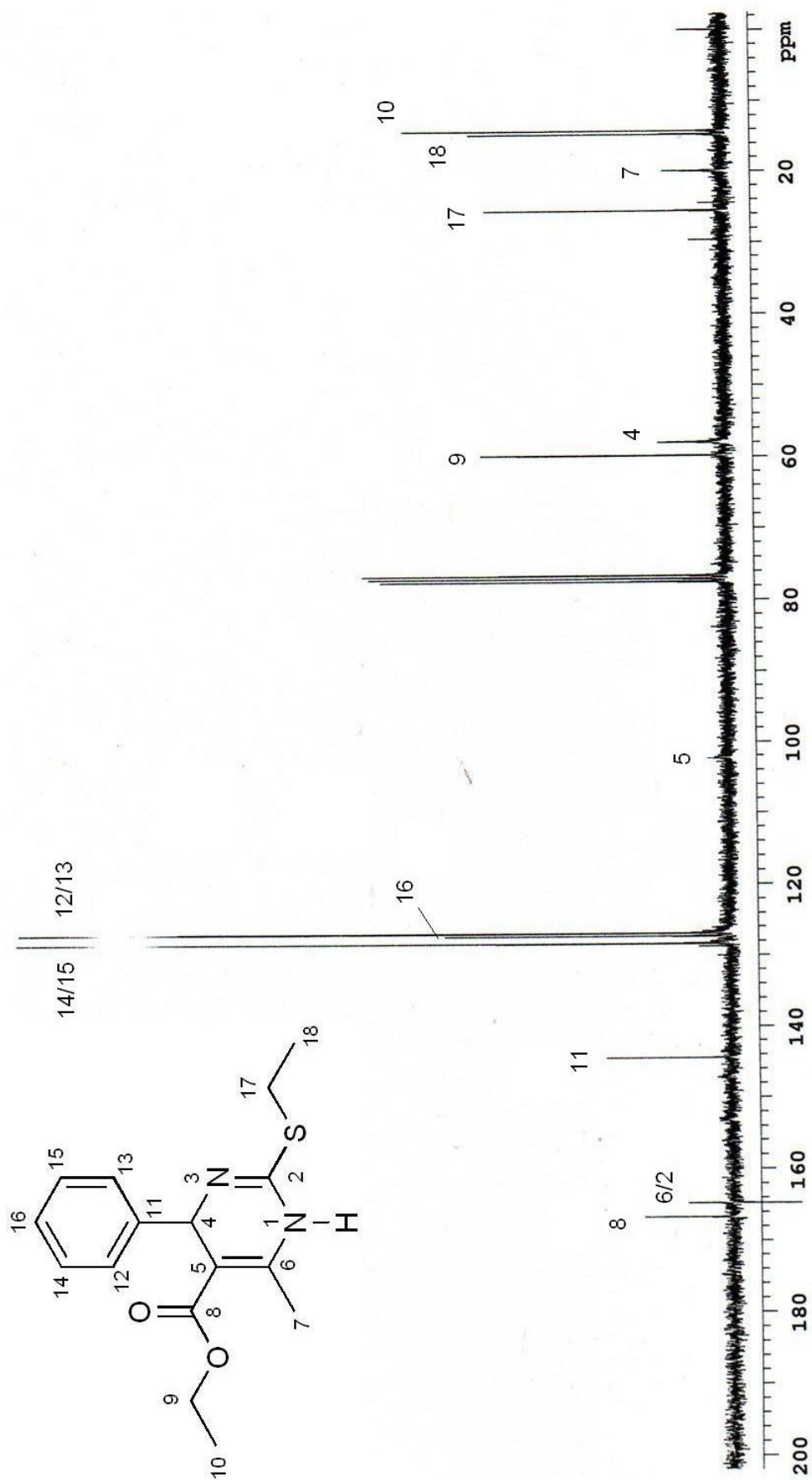
Espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) do composto **222**



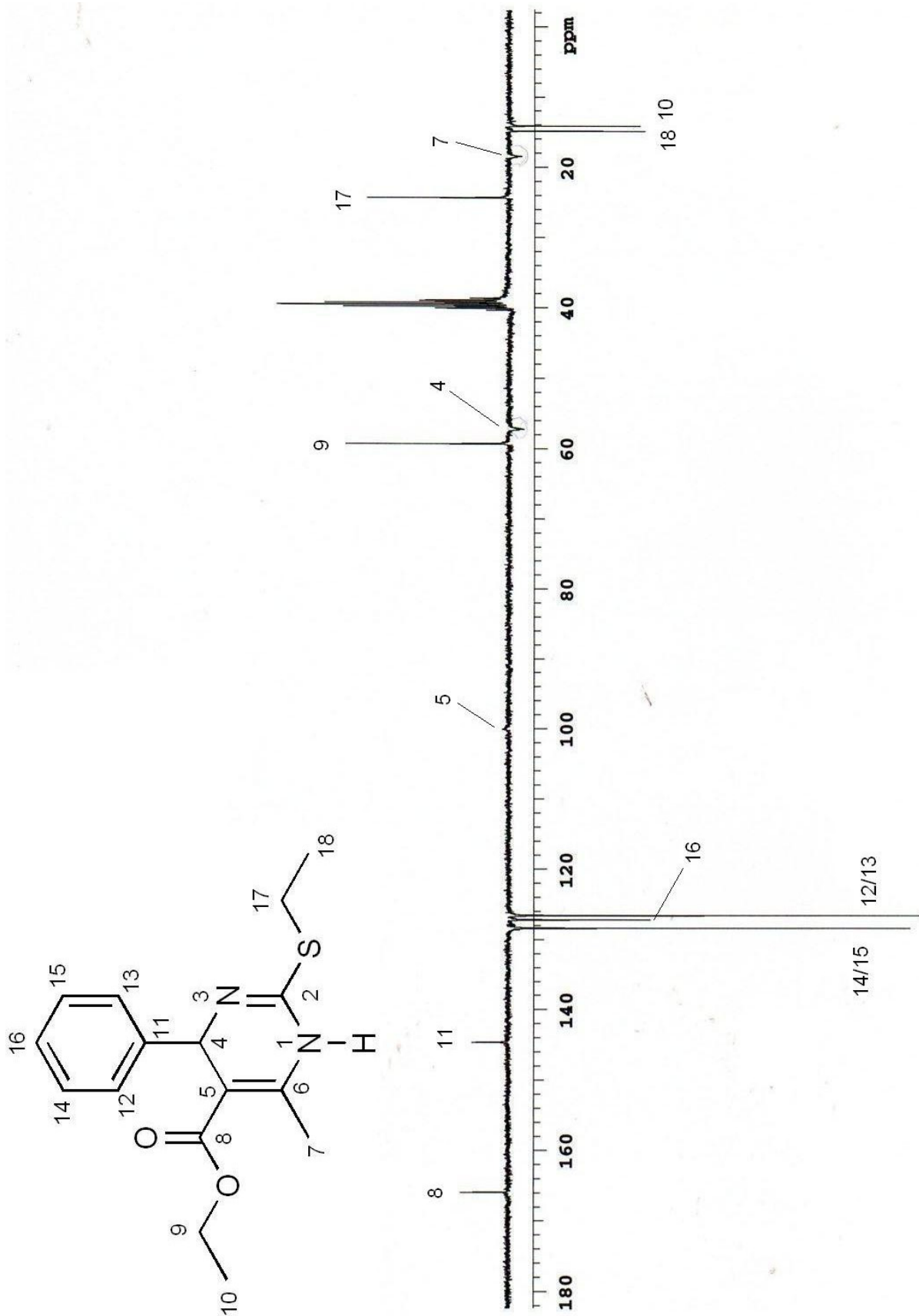
Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) do composto **222**, ampliação dos prótons diastereotópicos 17



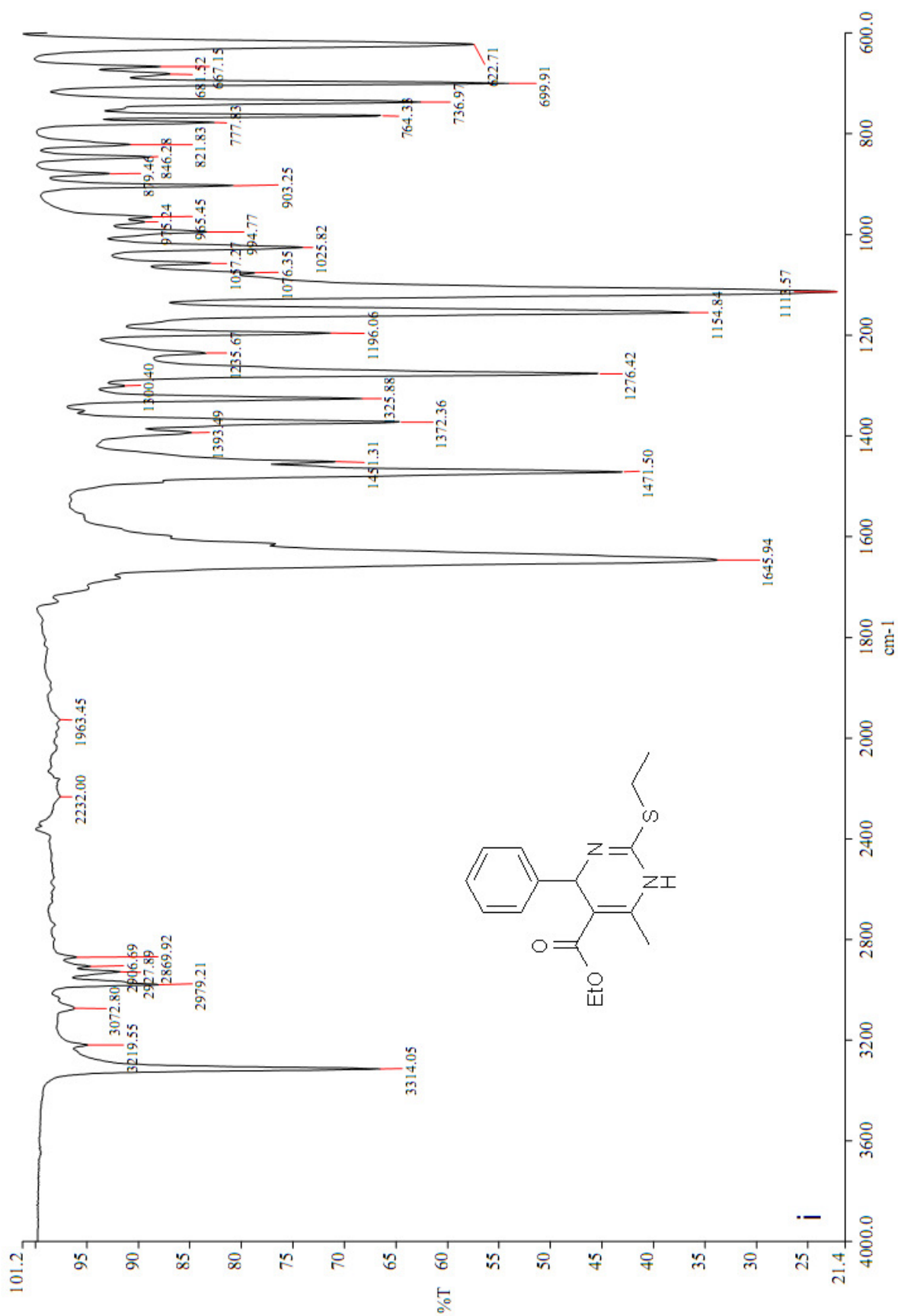
Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) do composto **222**, ampliação dos prótons das metilas 10 e 18



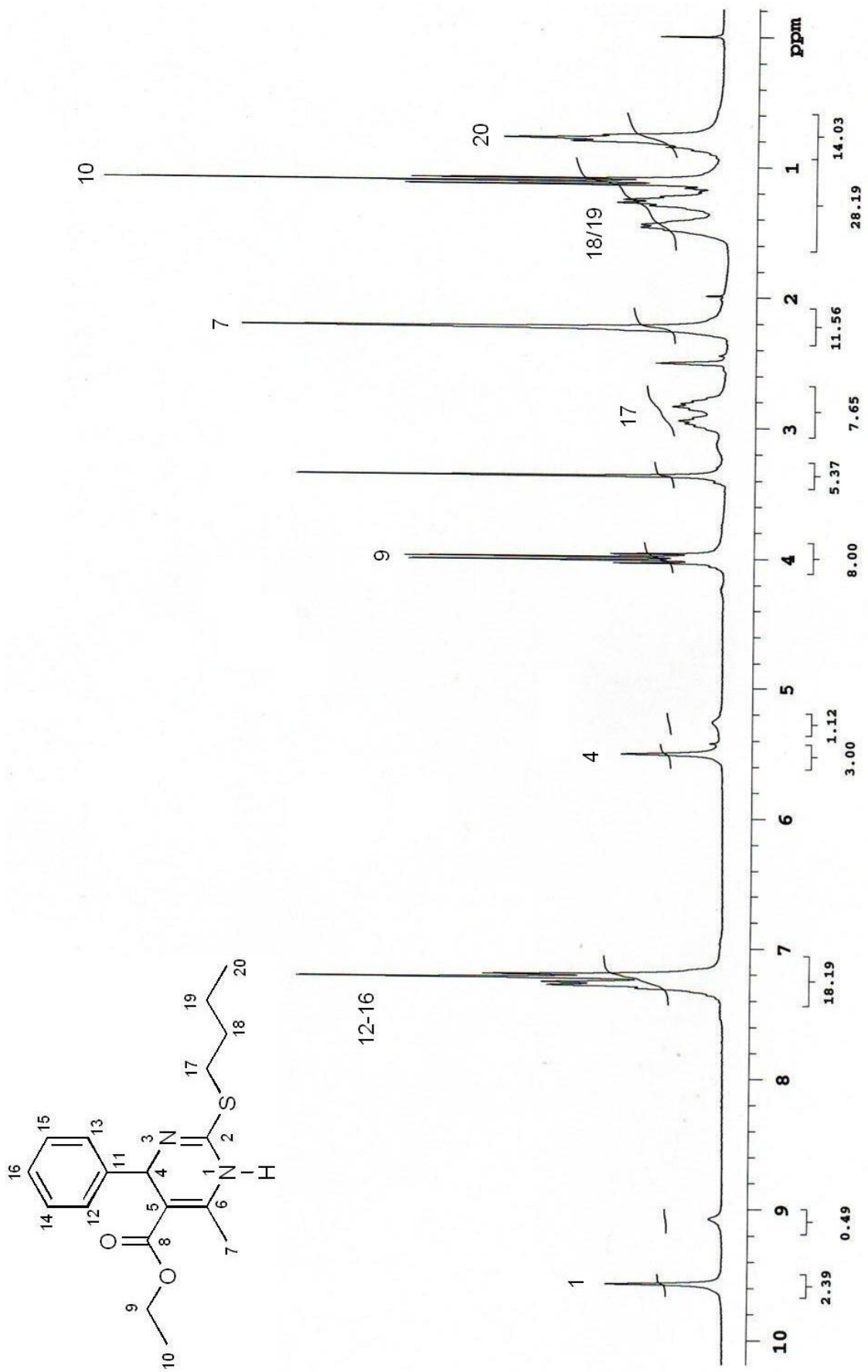
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, CDCl_3) do composto **222**



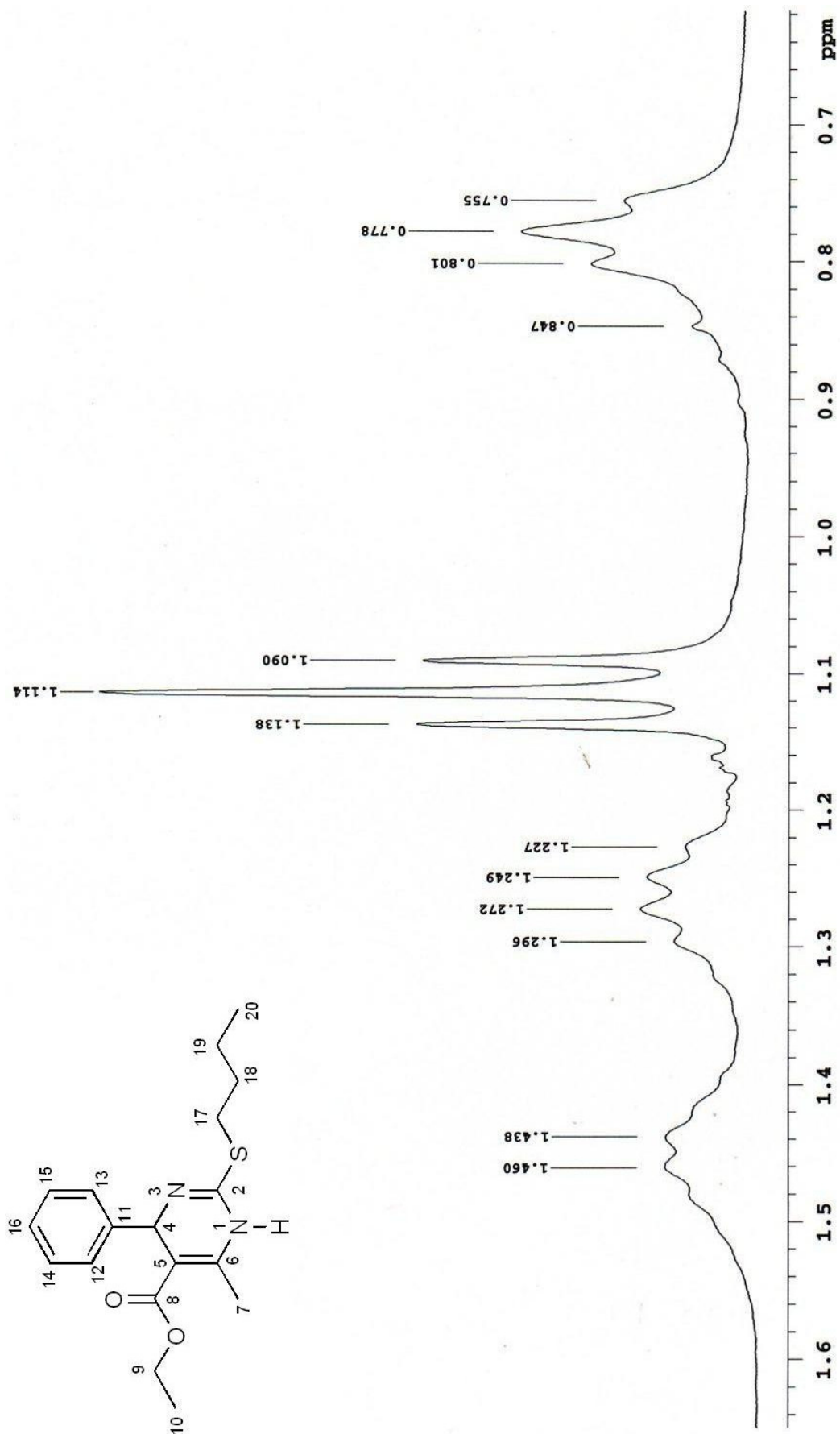
Espectro de APT (75 MHz, DMSO-d⁶) do composto **222**



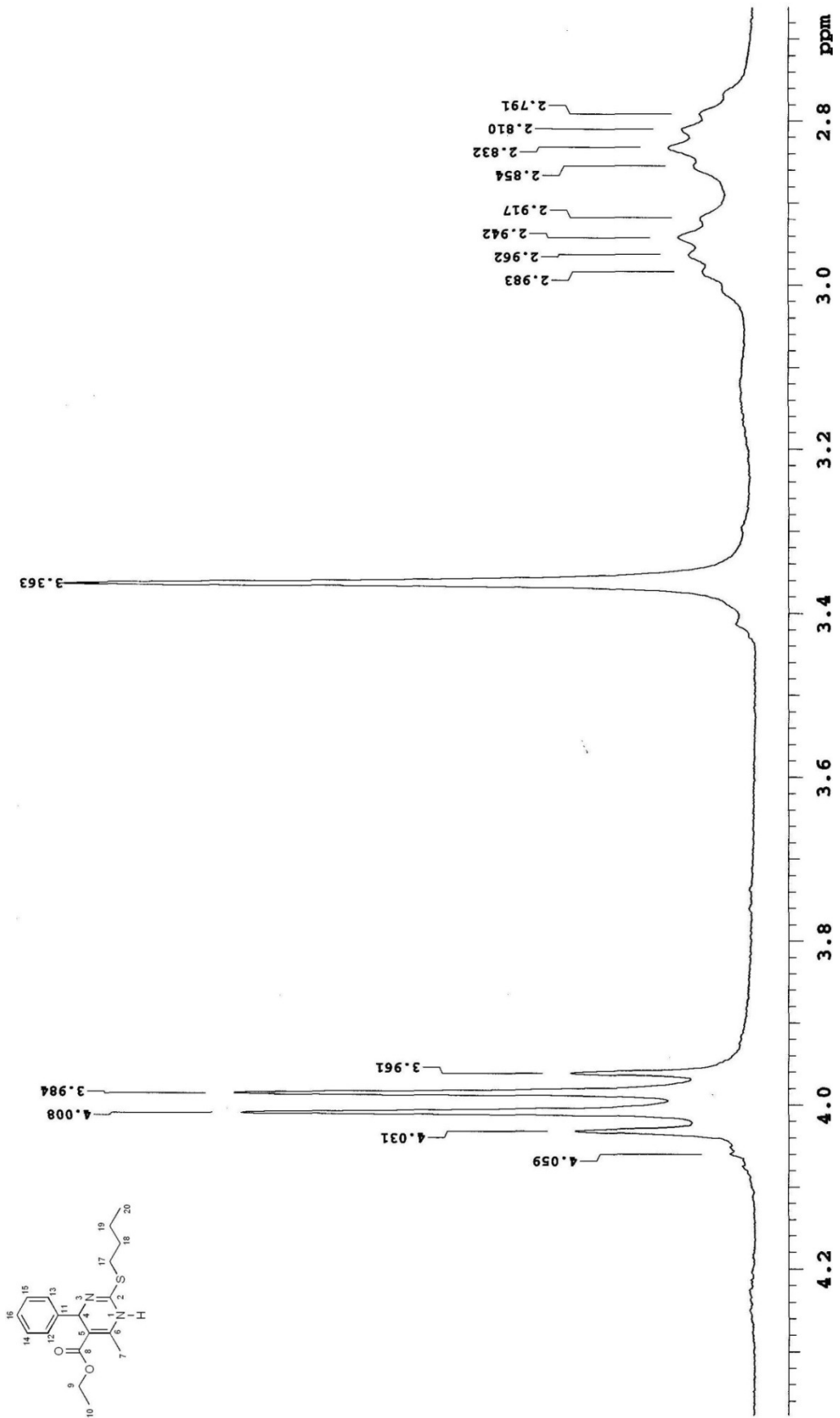
Espectro de IV (ATR) do composto **222**



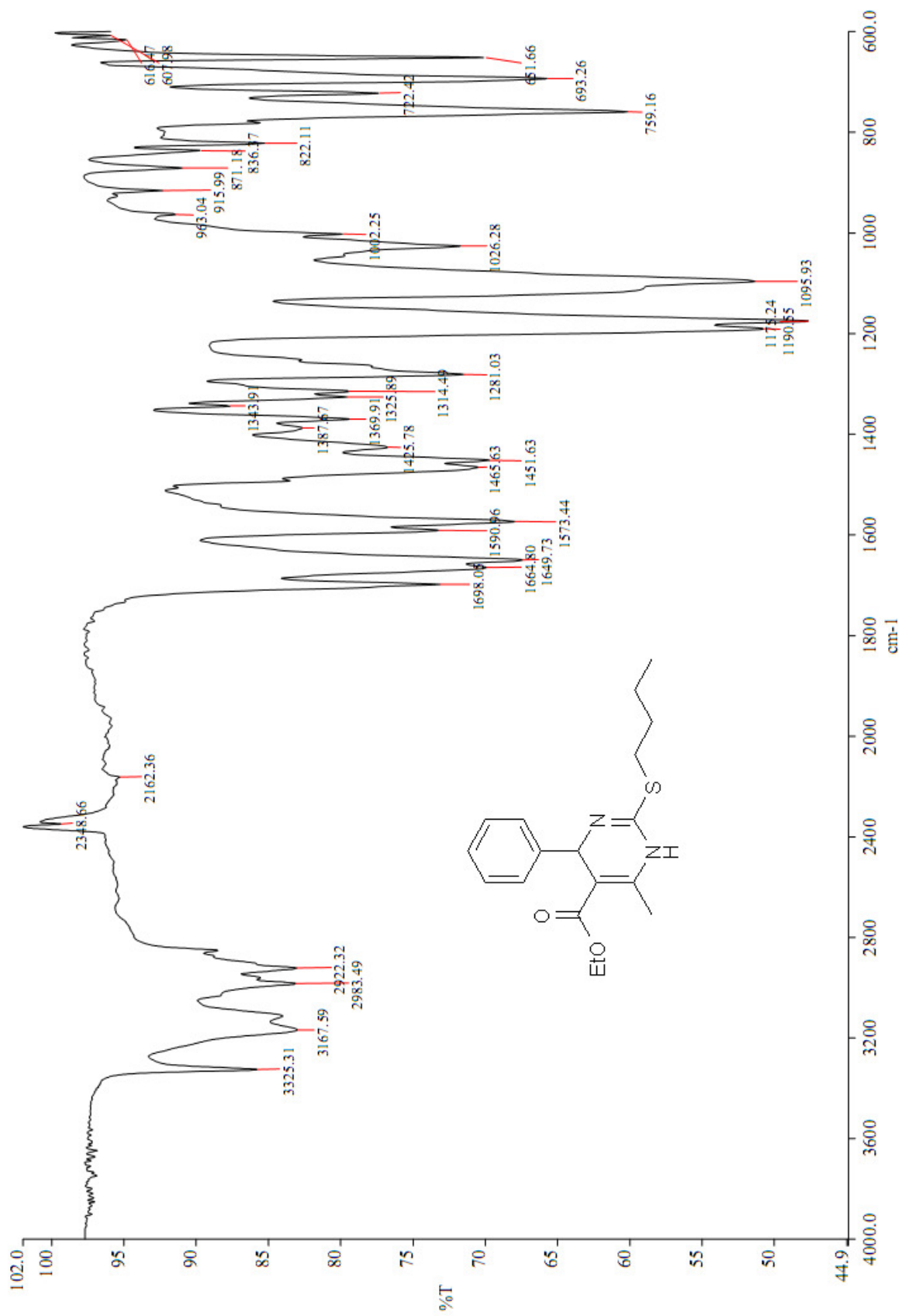
Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **223**



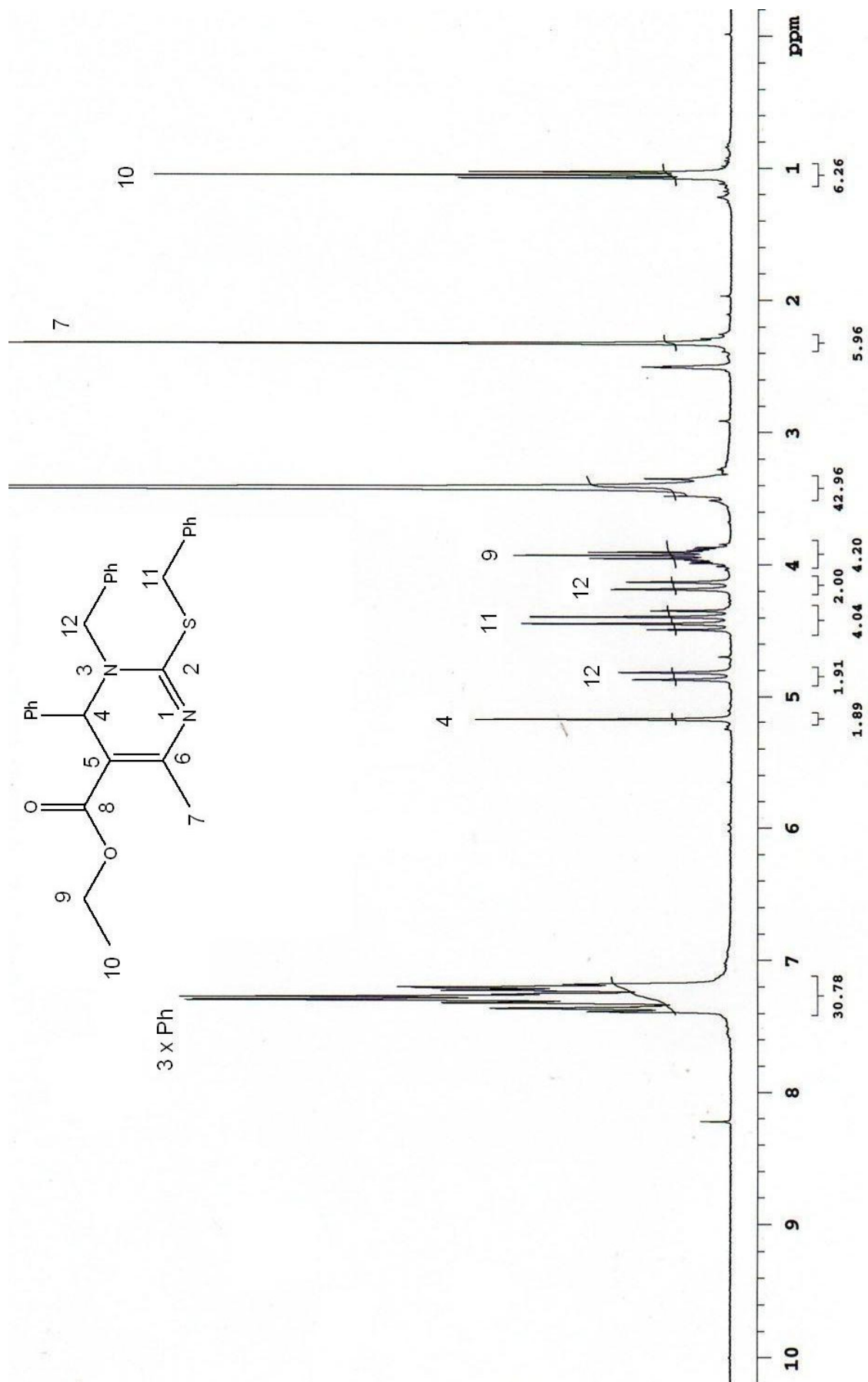
Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **223**, ampliação 0,6-2,0 ppm



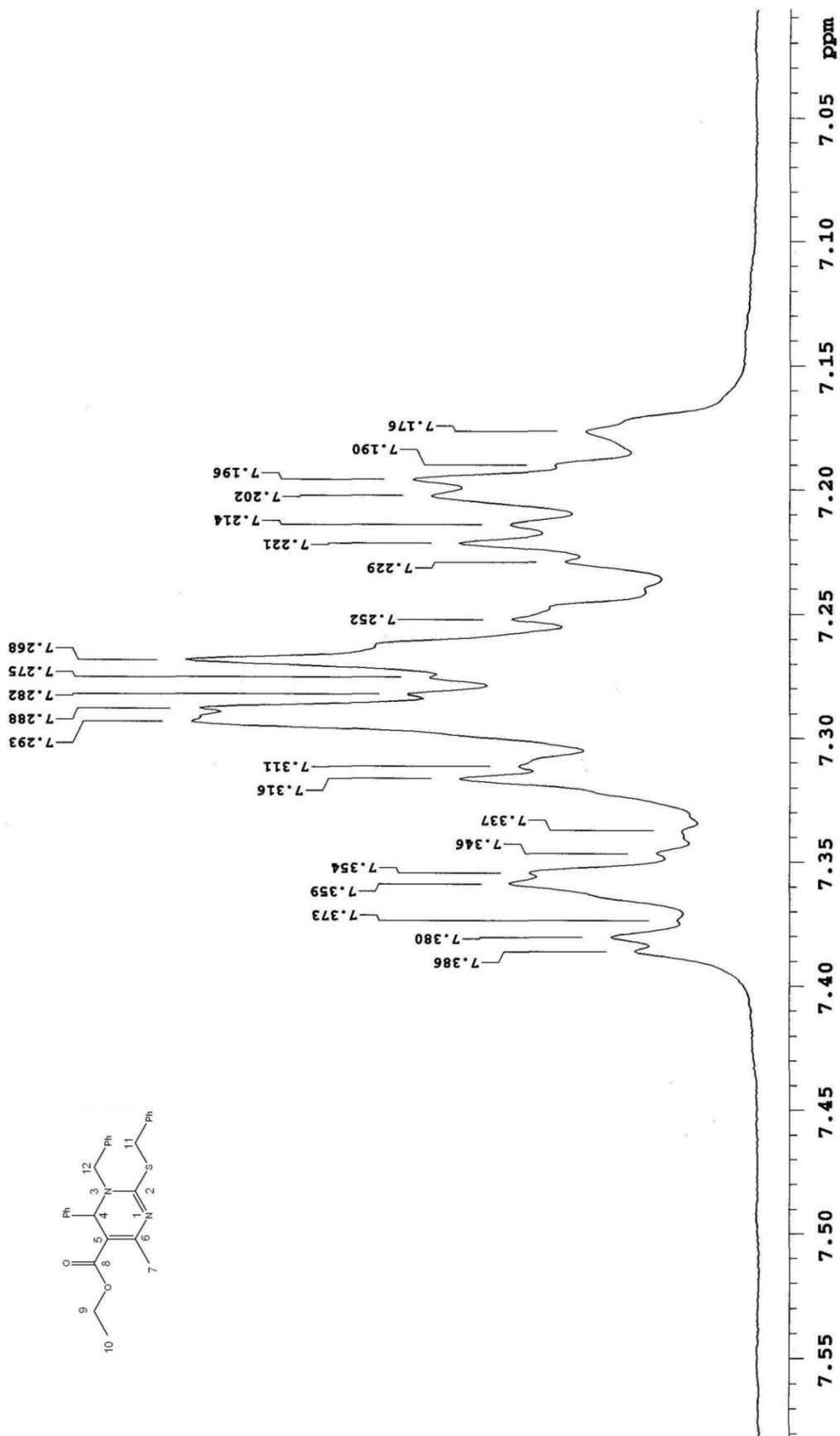
Espectro de H^1 RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$) do composto **223**, ampliação dos prótons diastereotópicos 17



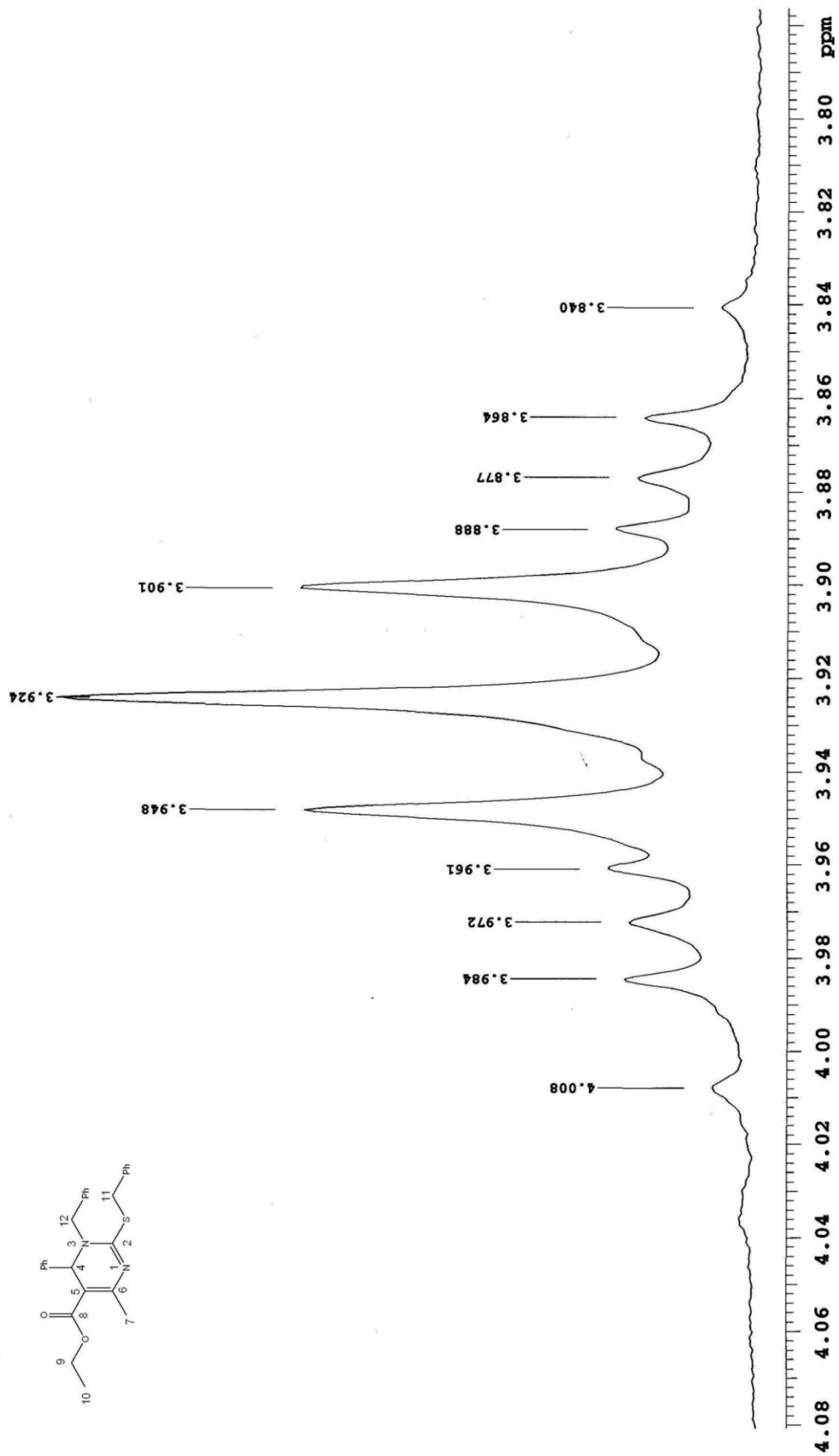
Espectro de IV (ATR) do composto **223**



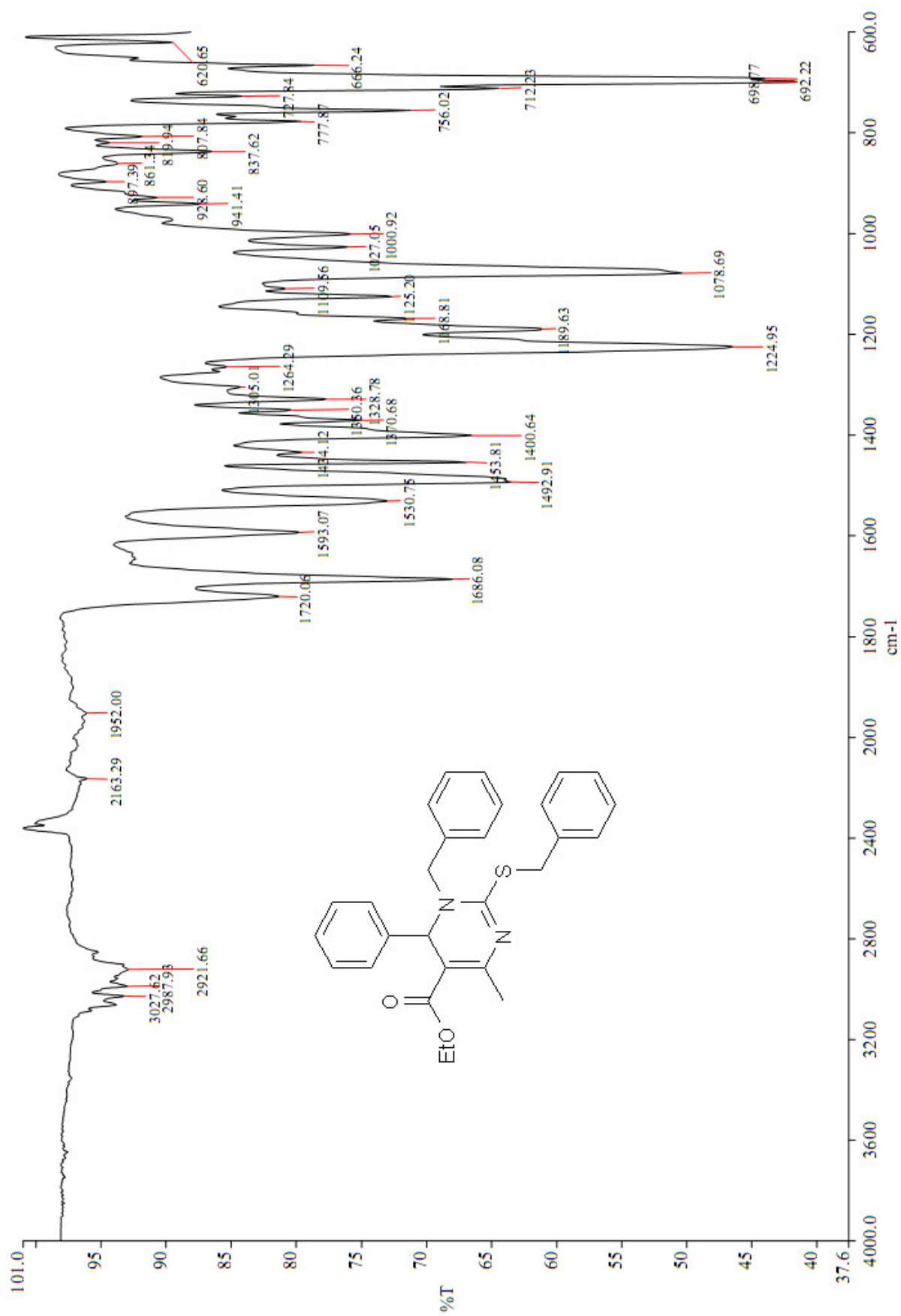
Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **221**



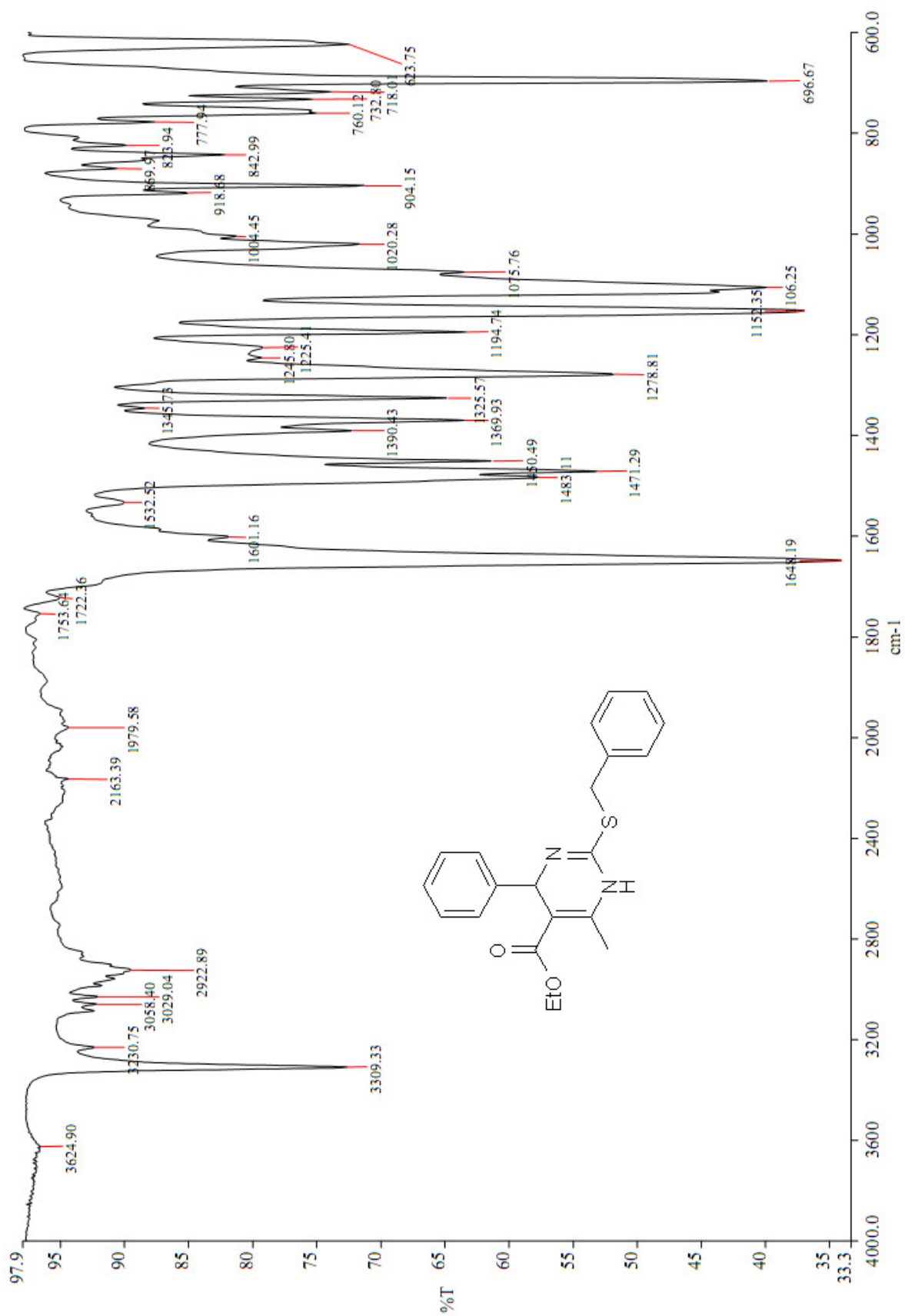
Espectro de H^1 RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **221**, ampliação dos prótons aromáticos



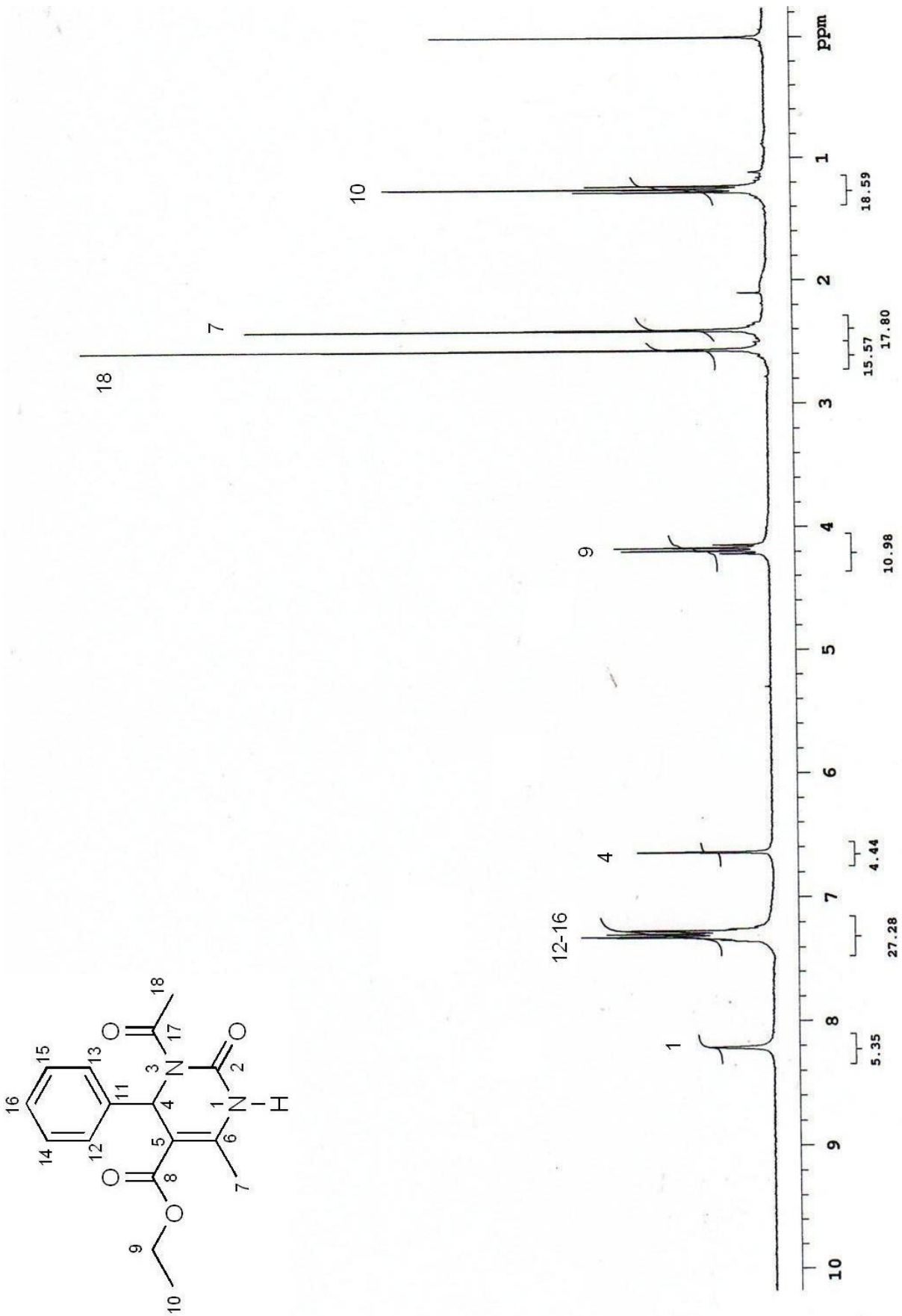
Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **221**, ampliação dos prótons 9



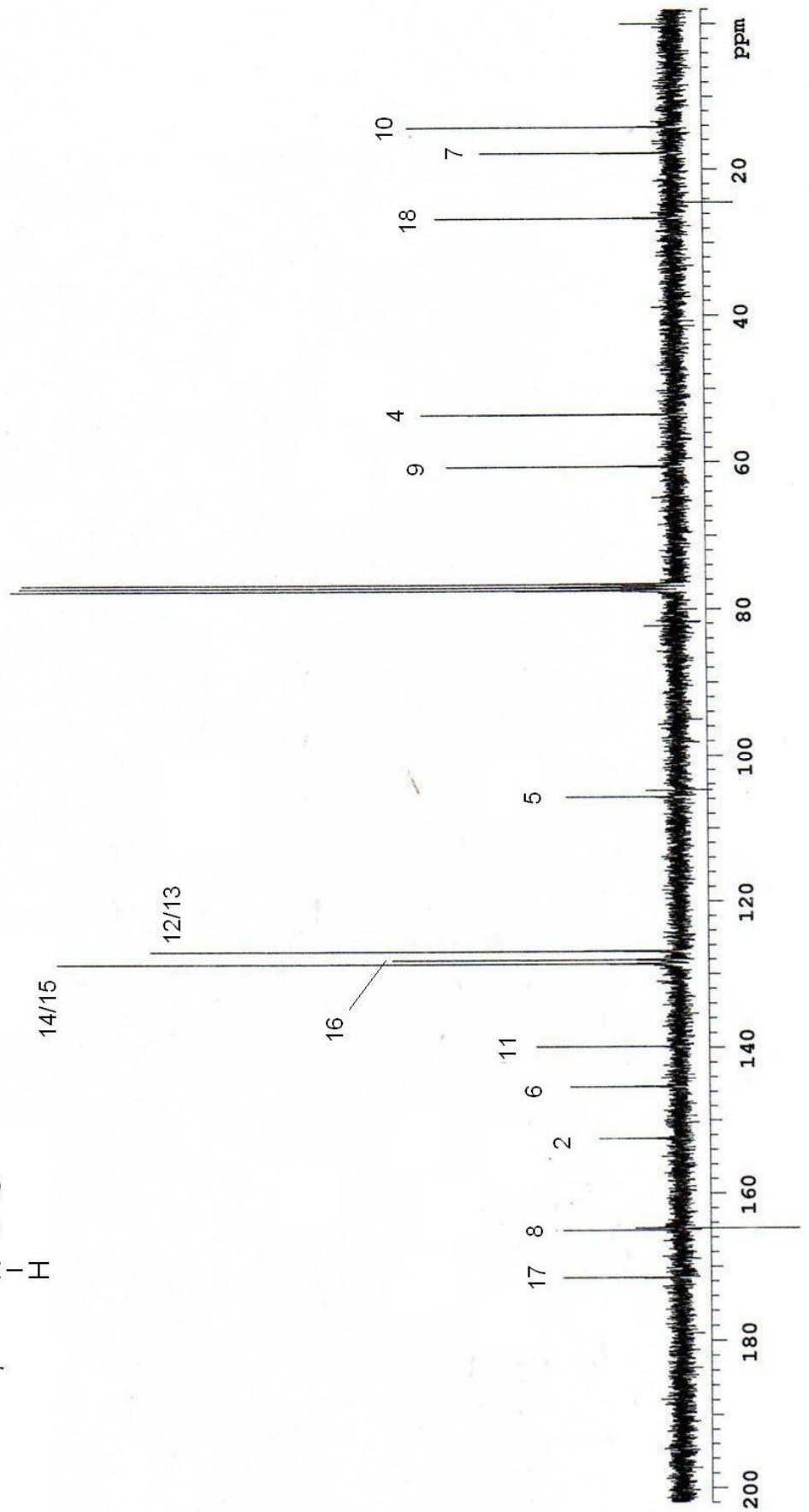
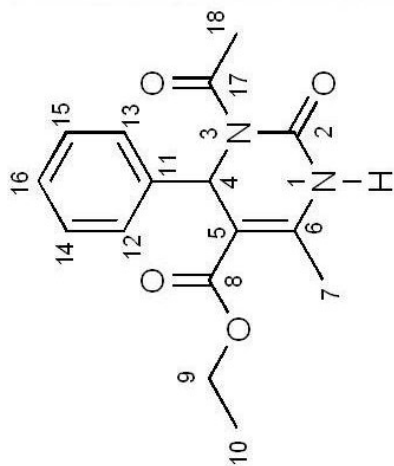
Espectro de IV (ATR) do composto **221**



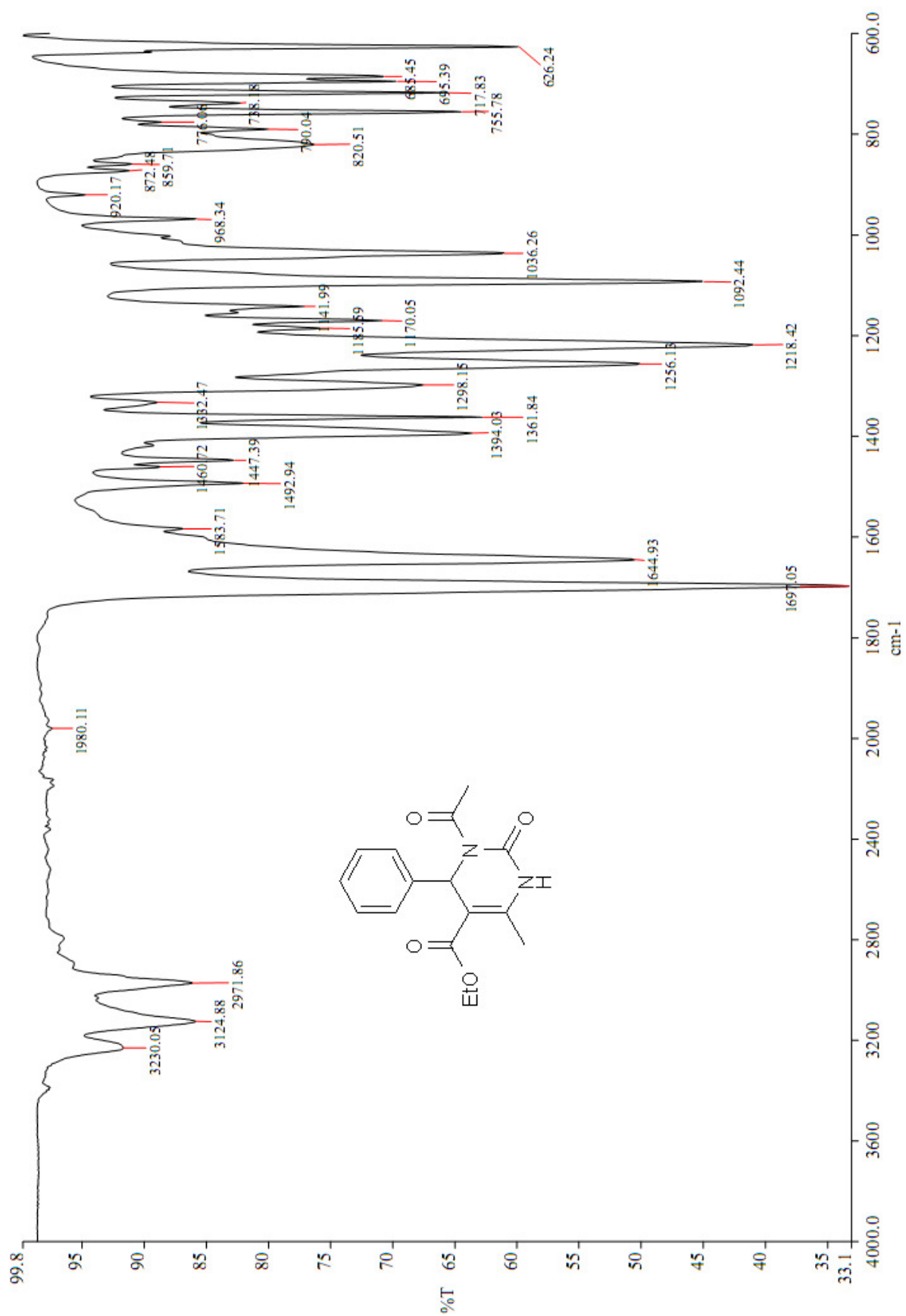
Espectro de IV (ATR) do composto **220**



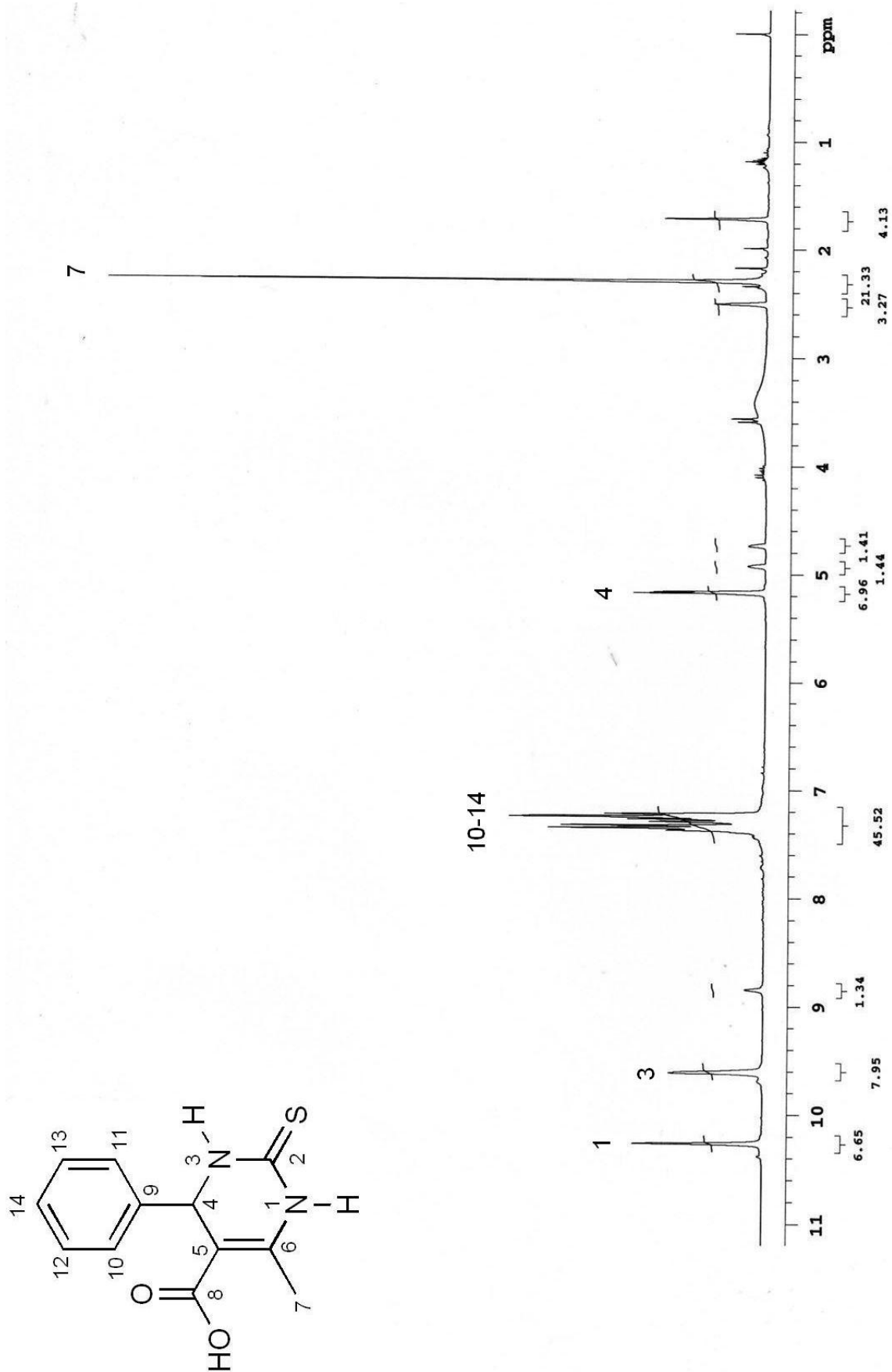
Espectro de H¹RMN (300 MHz, CDCl₃) do composto **236**



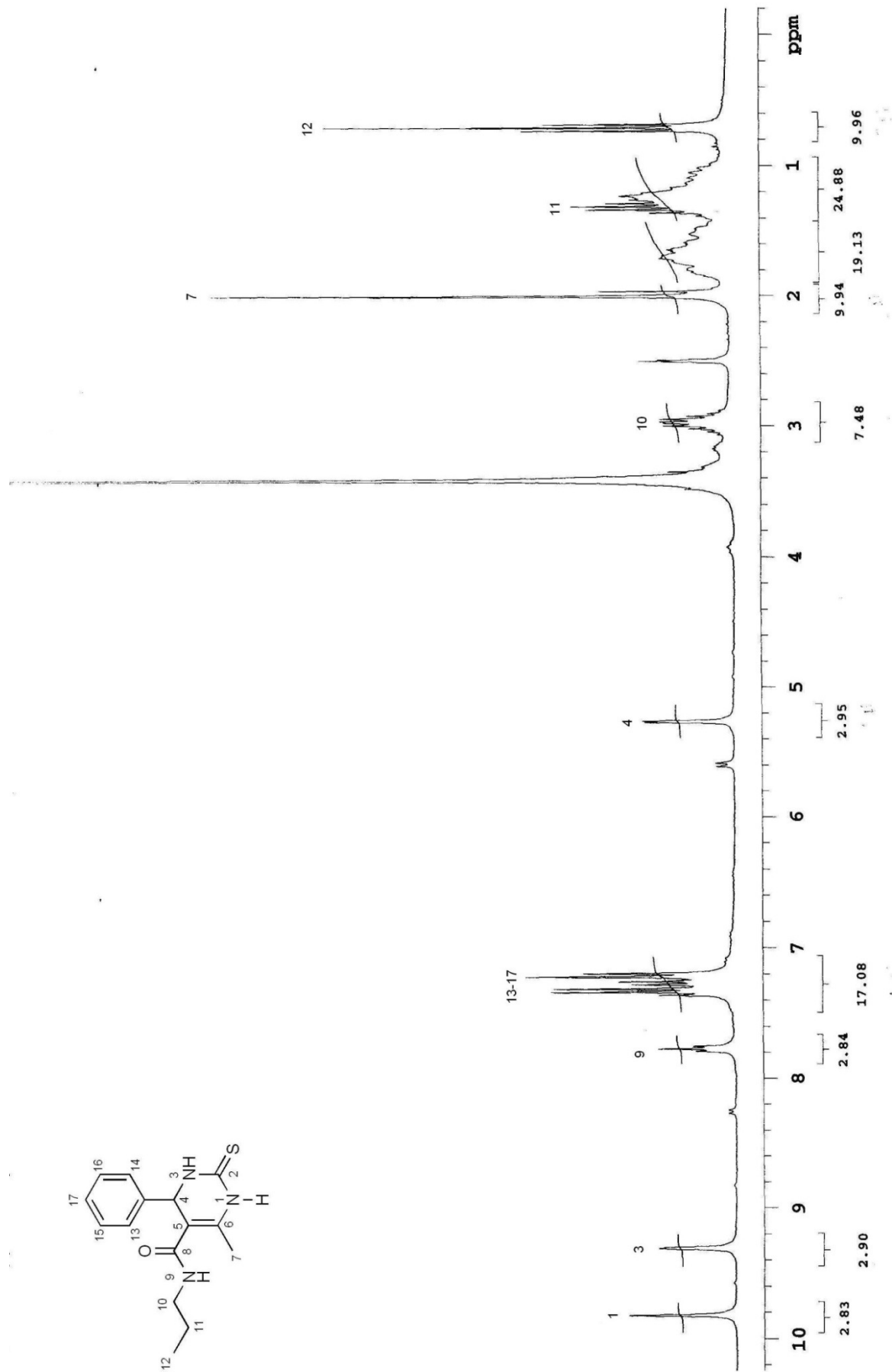
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, CDCl_3) do composto **236**



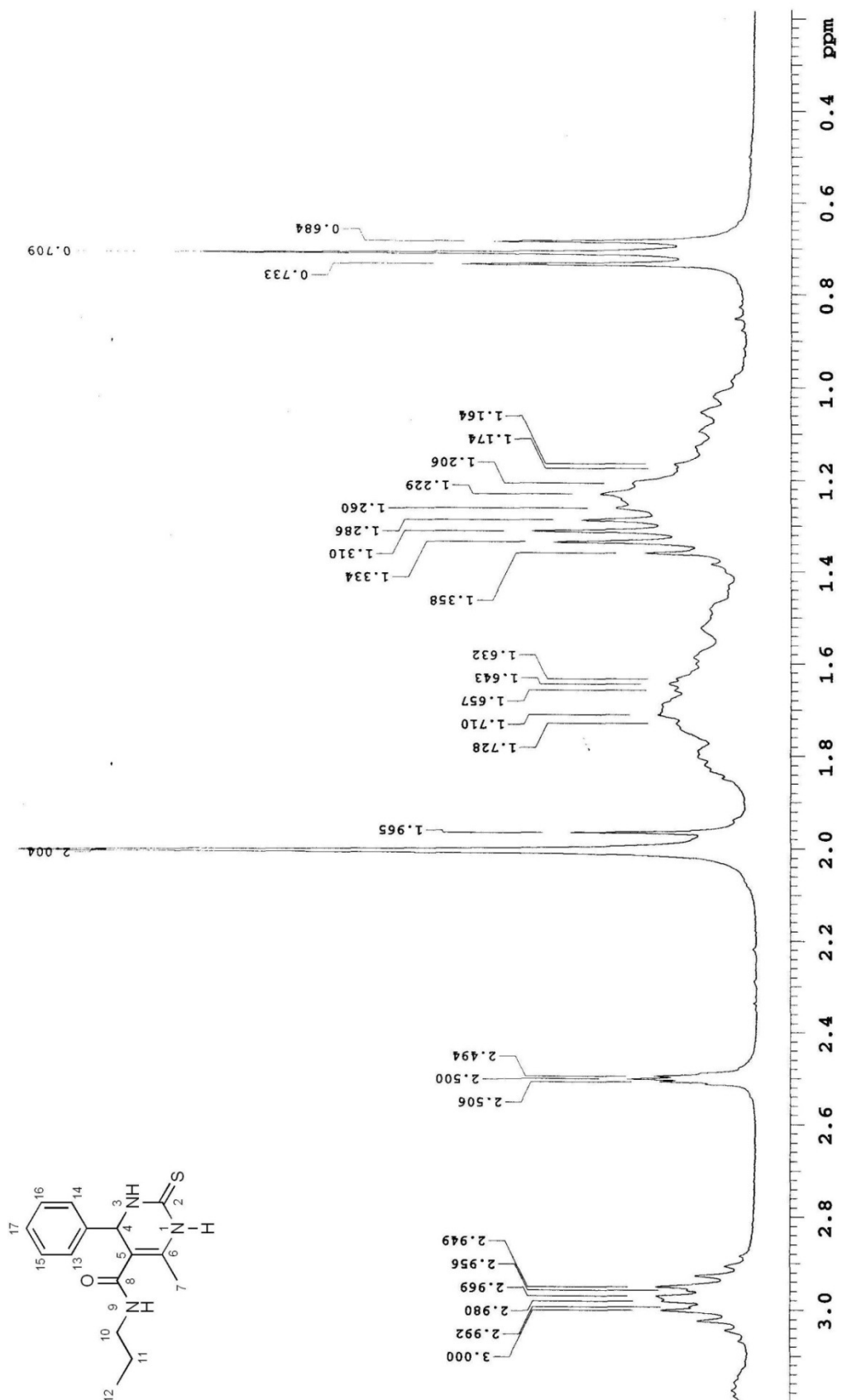
Espectro de IV (ATR) do composto **236**



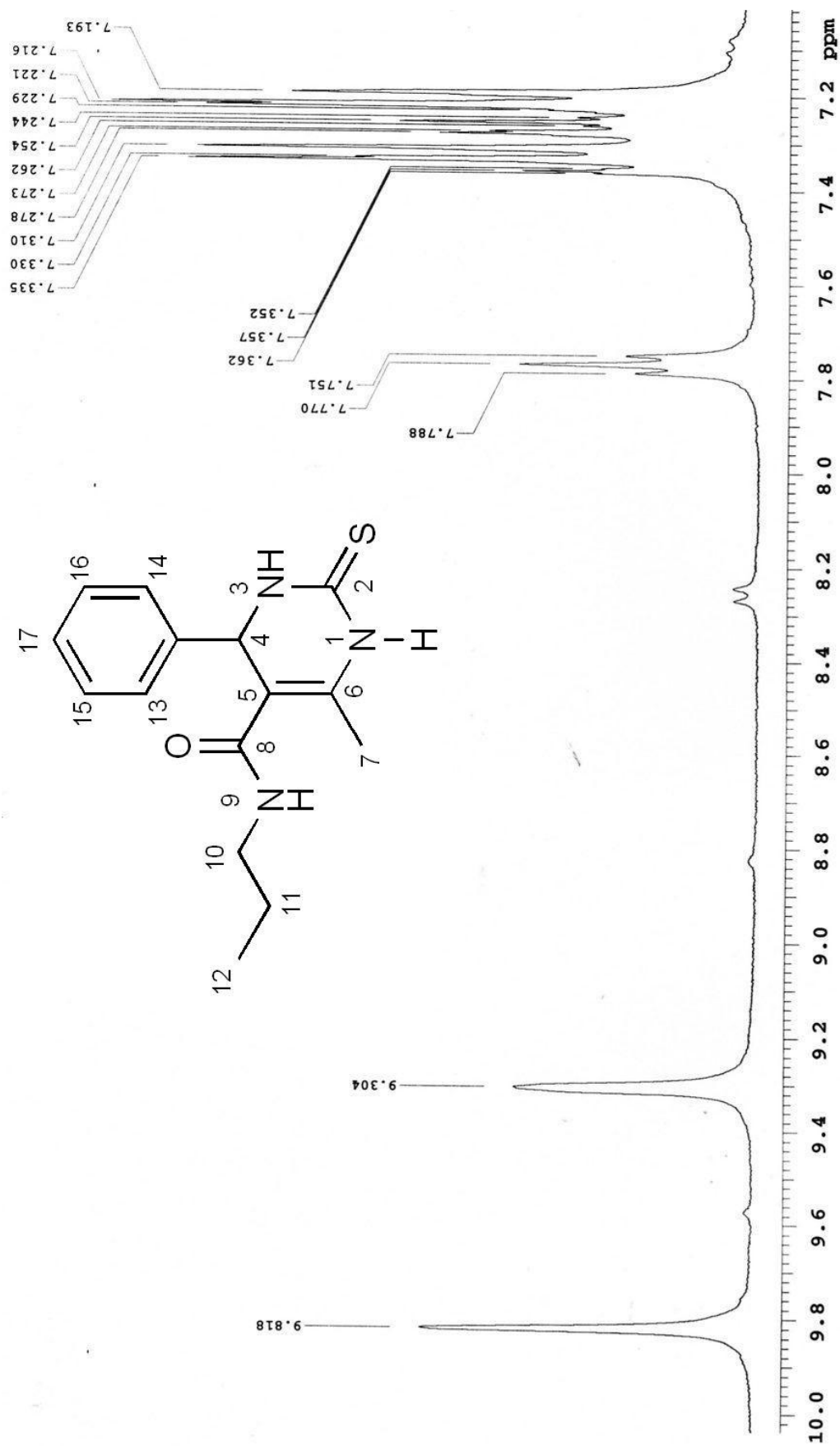
Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **225**



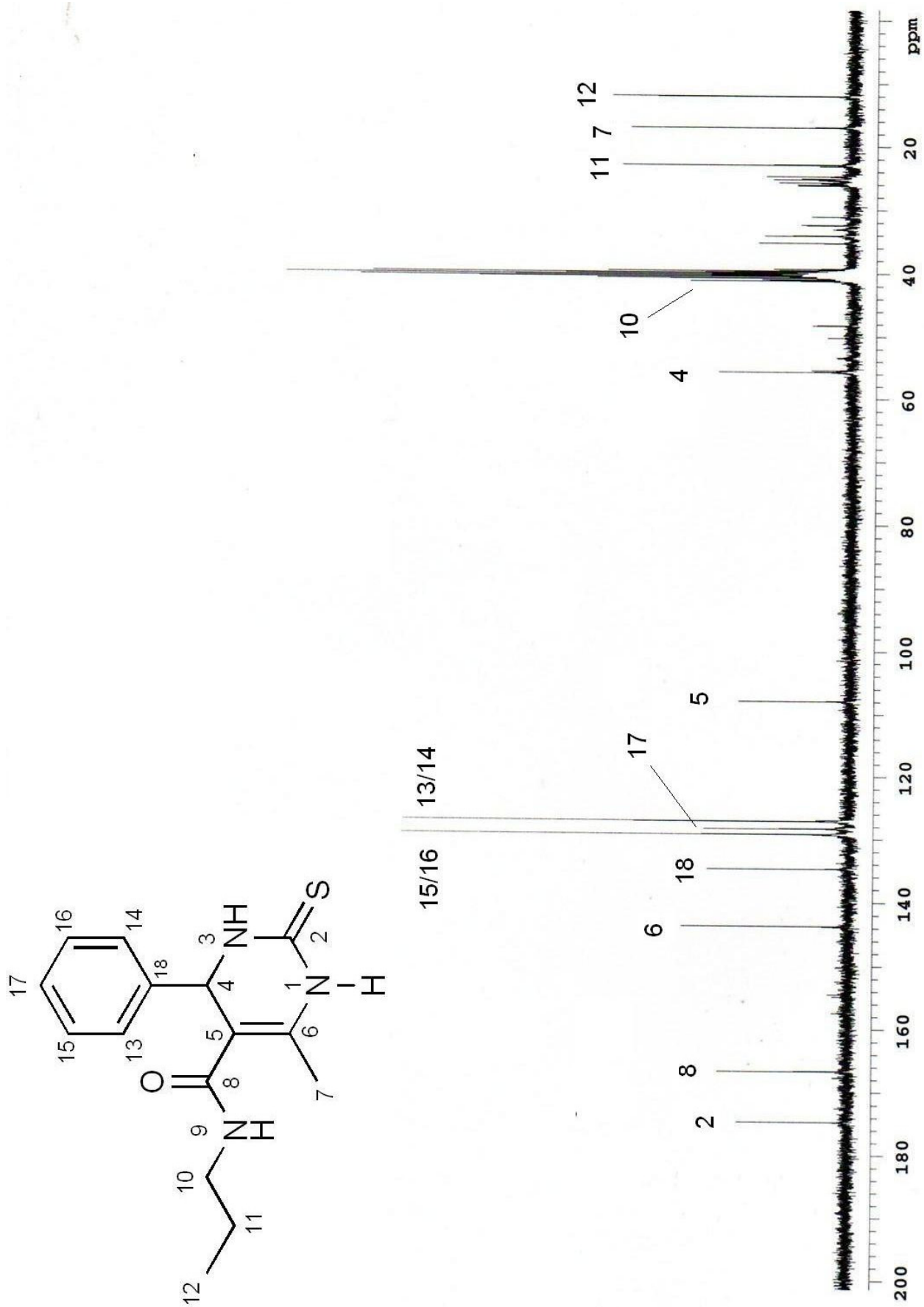
Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **241** (contaminante DCU)



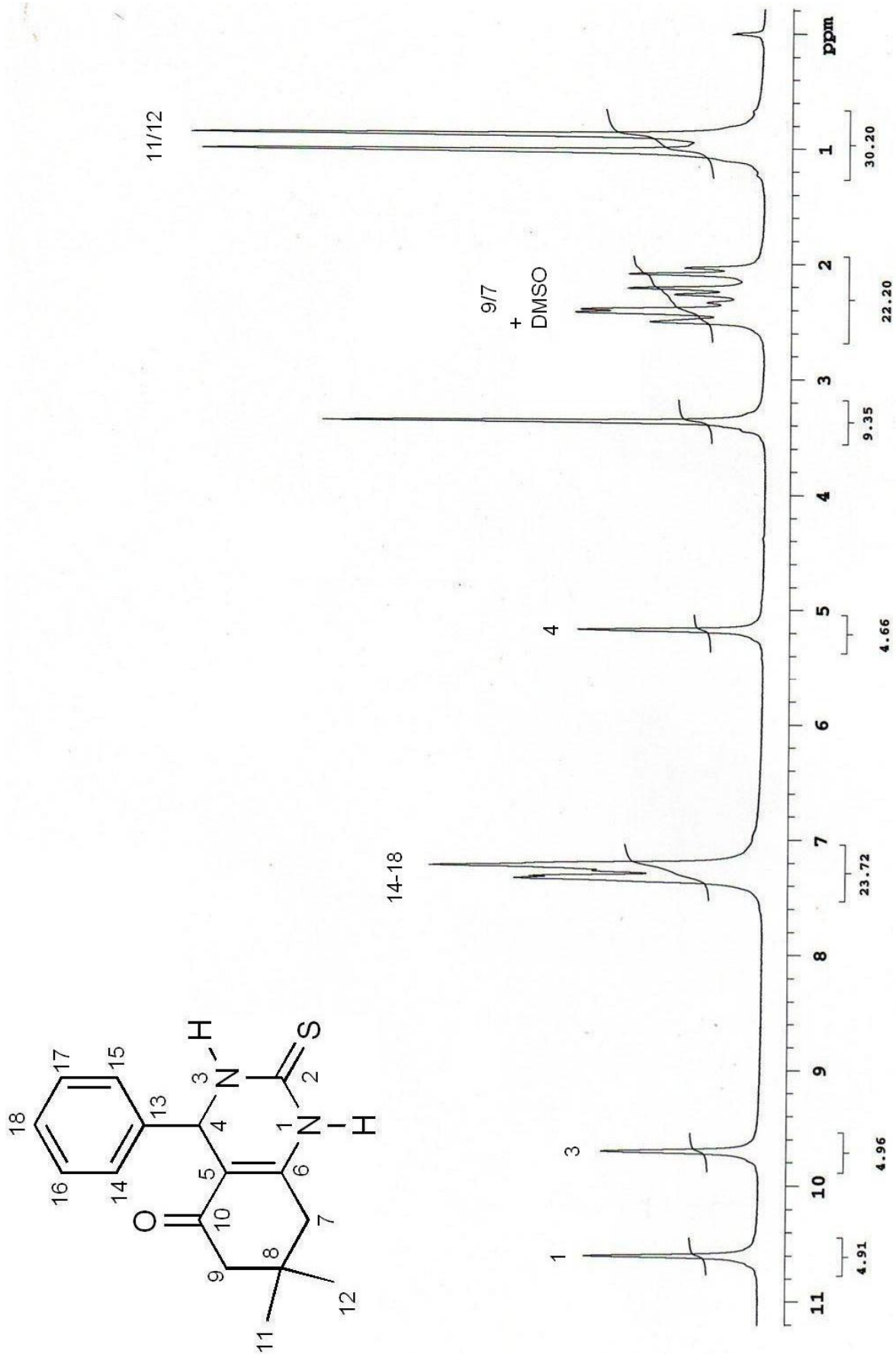
Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **241**, ampliação do contaminante dicitohexiluréia (DCU)



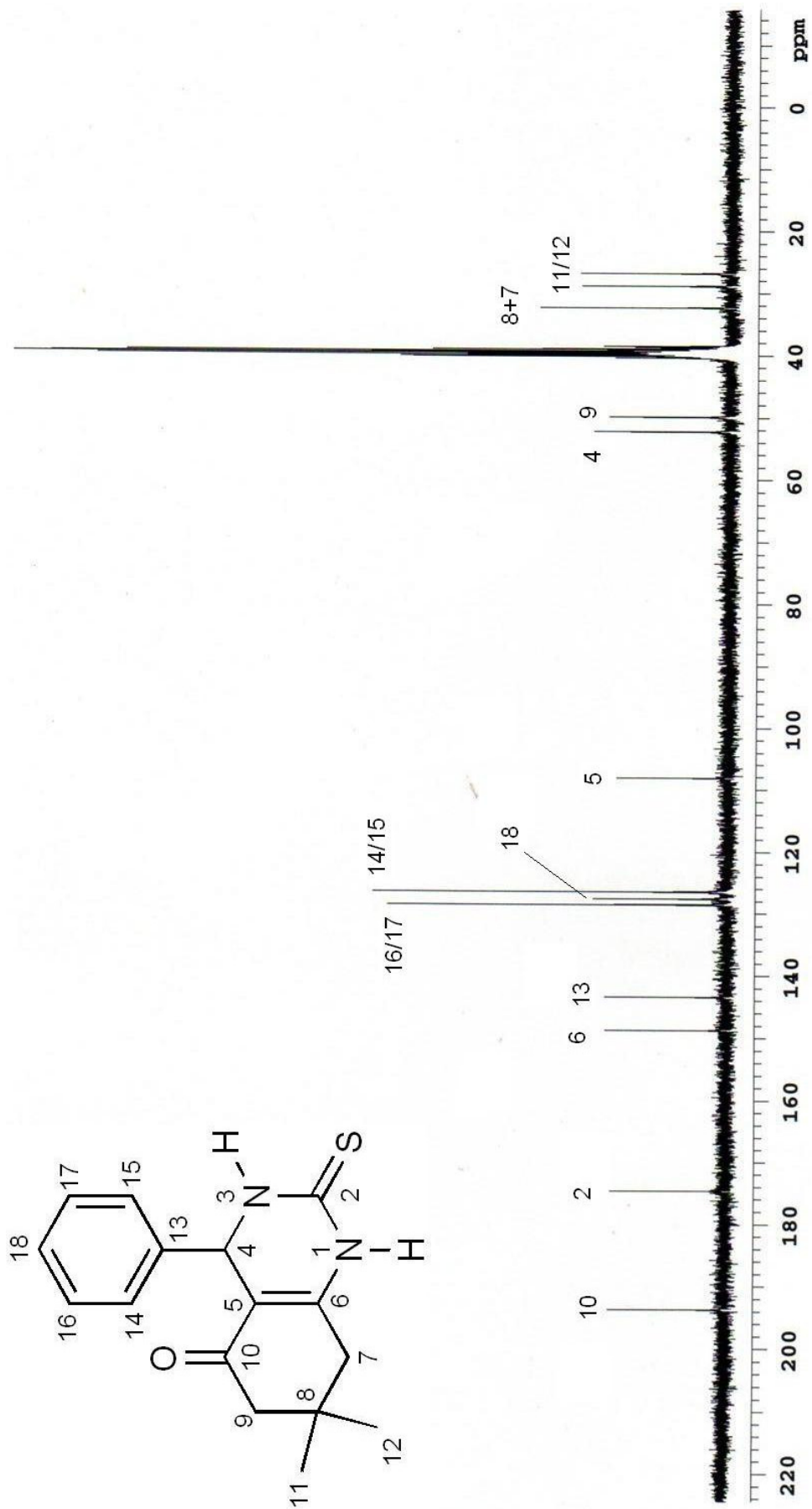
Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **241**, ampliação dos prótons aromáticos e 9



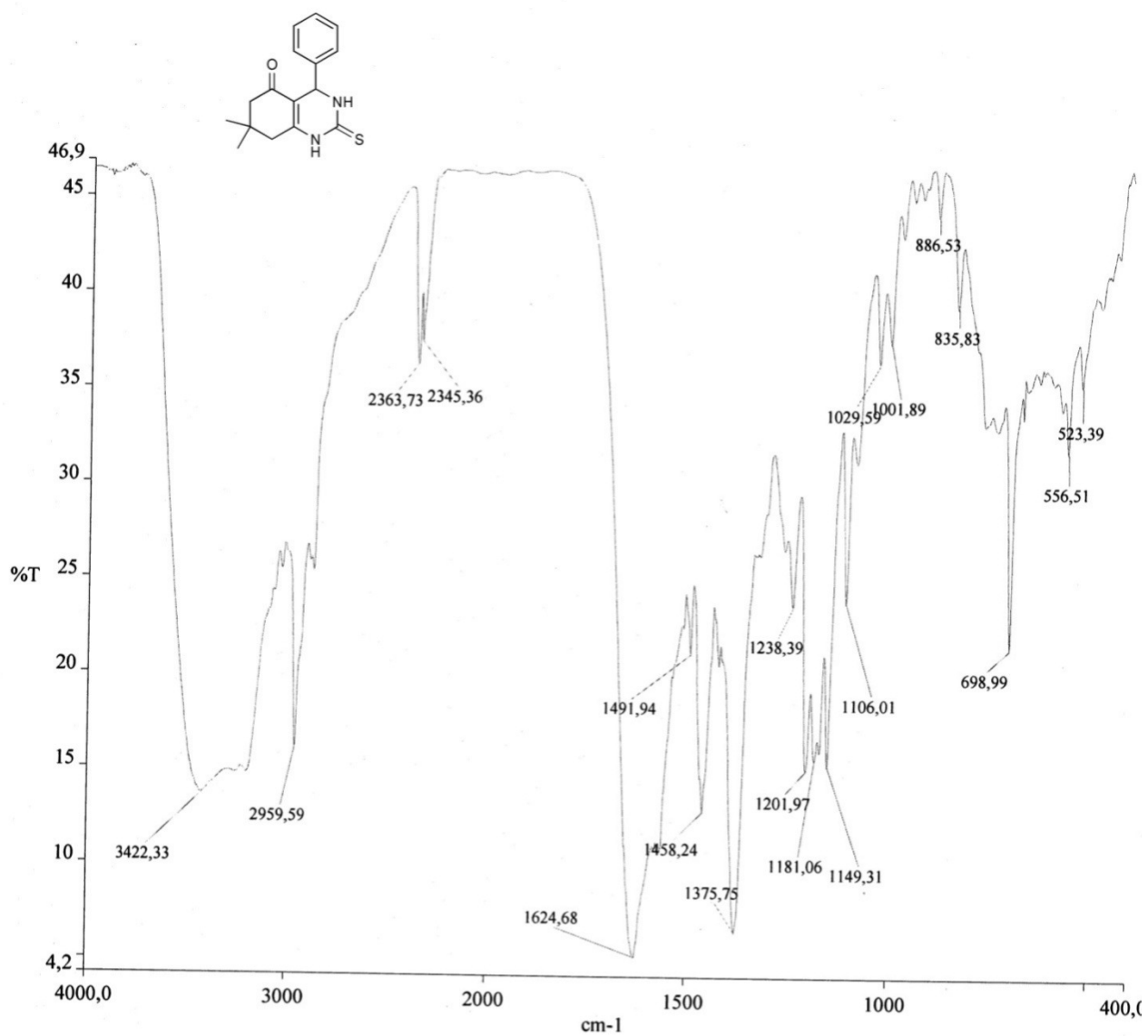
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d_6) do composto **241**



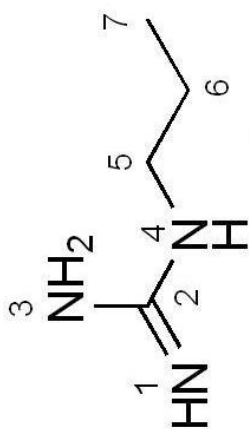
Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO- d_6) do composto **219**



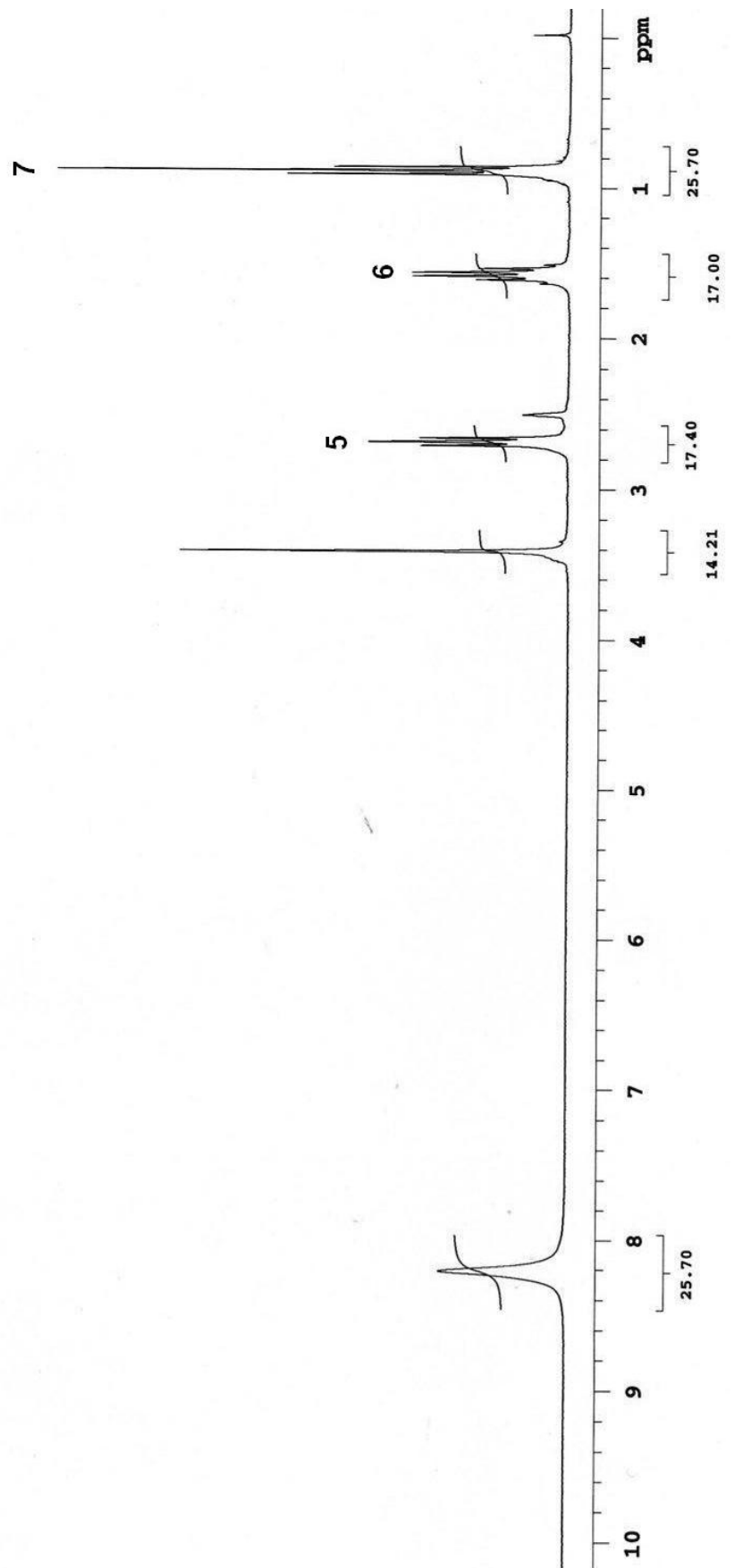
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d^6) do composto **219**

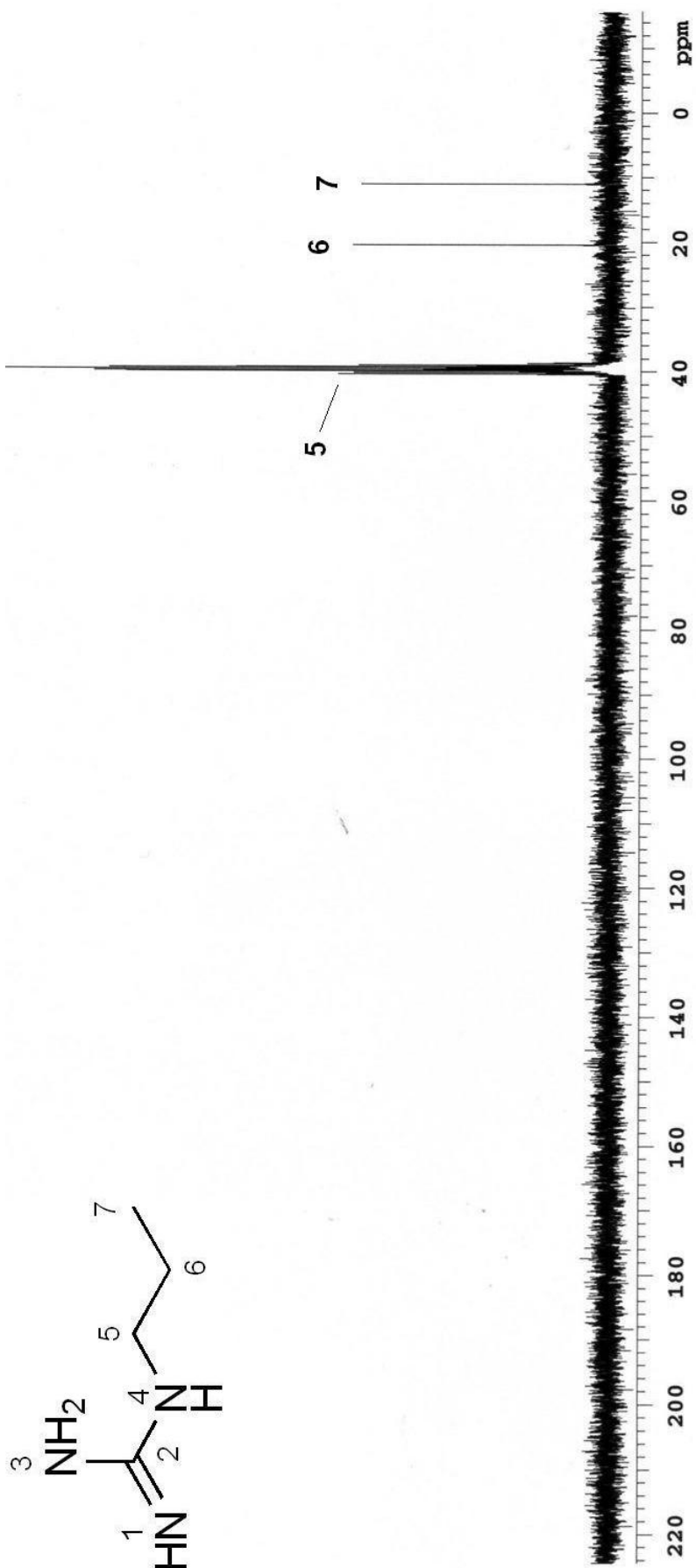


Espectro de IV (KBr) do composto **219**

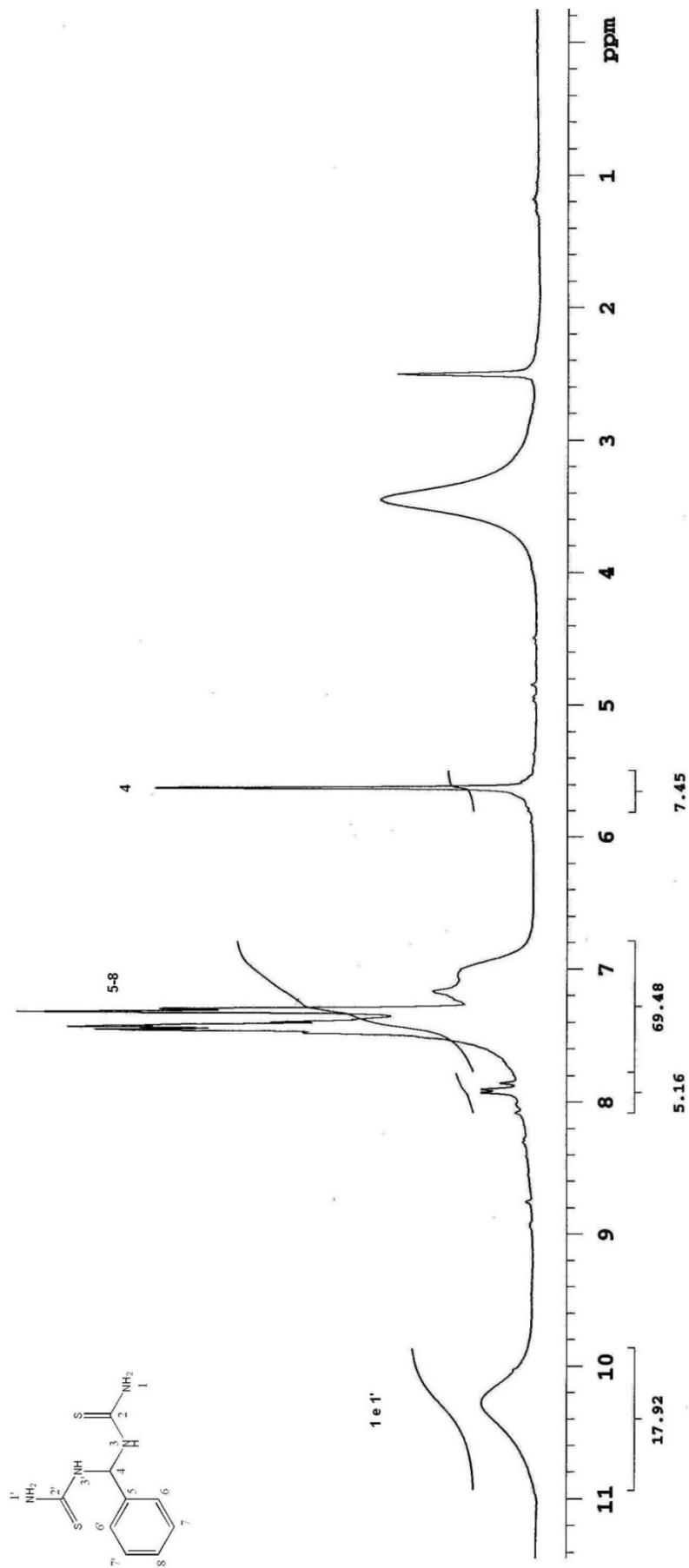


Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **247**

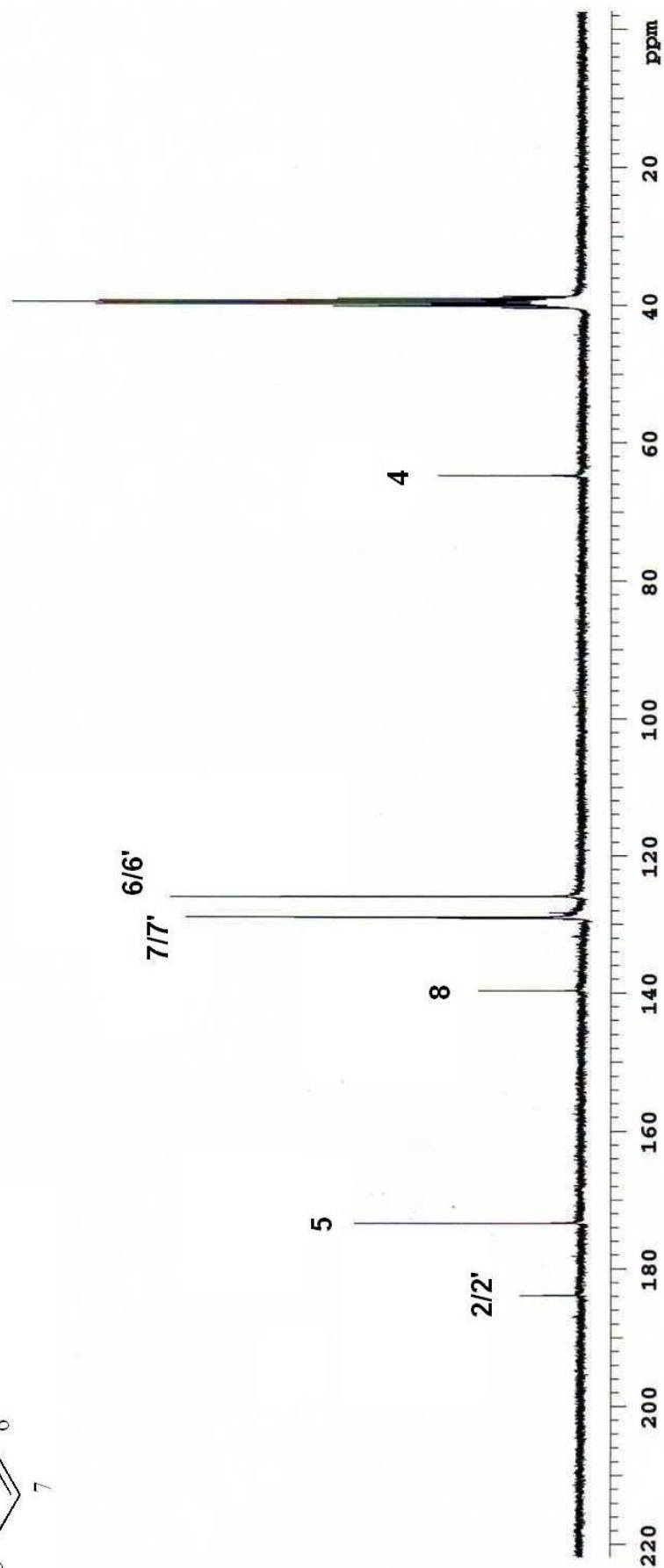
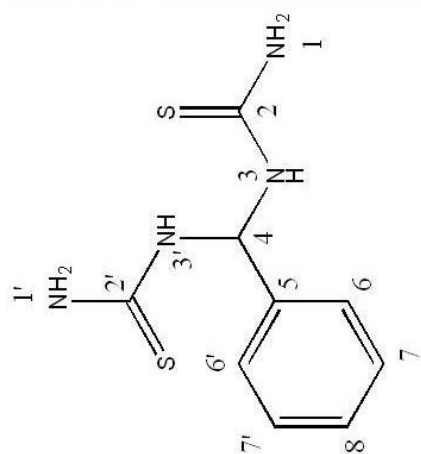




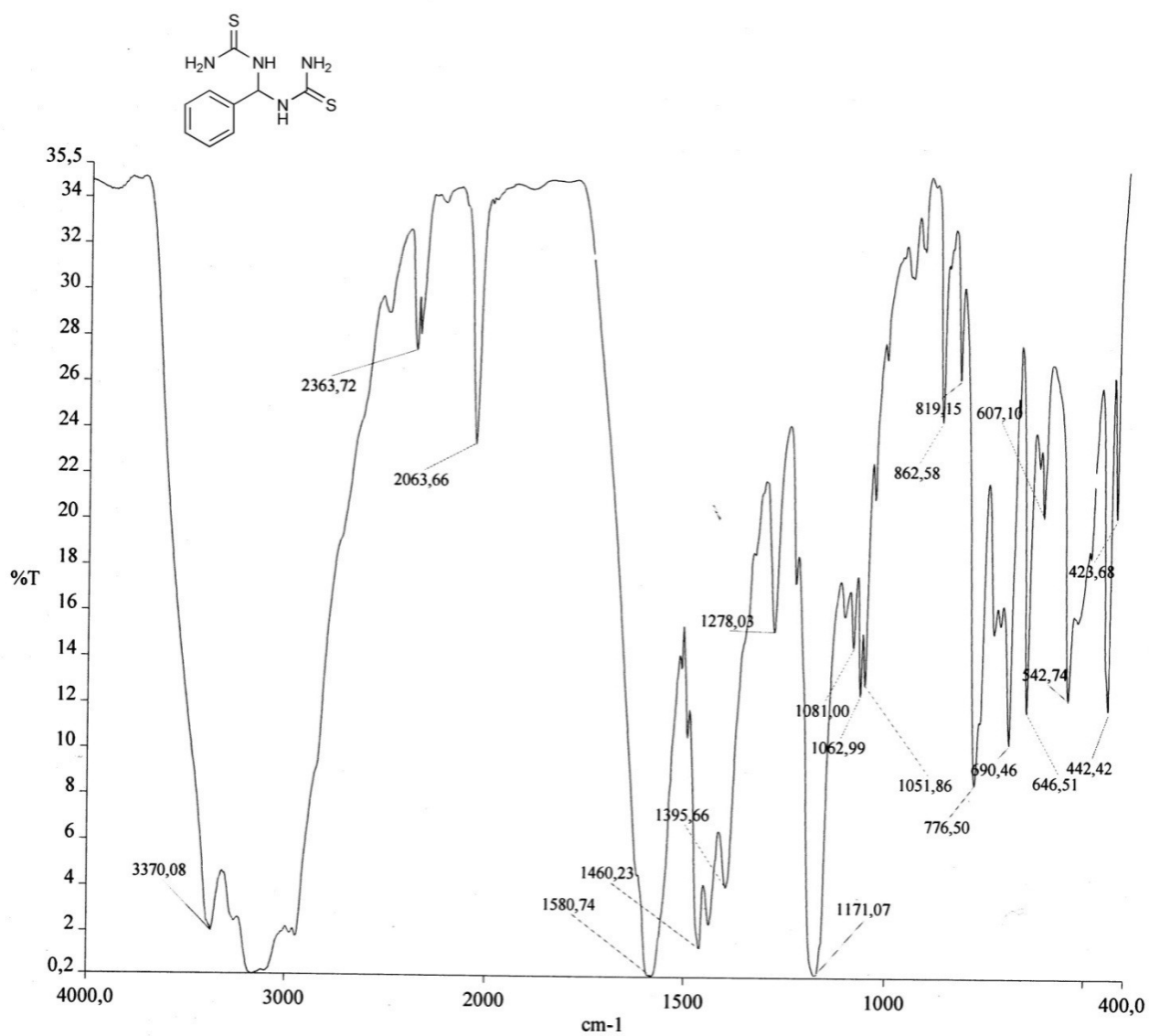
Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d^6) do composto **247**



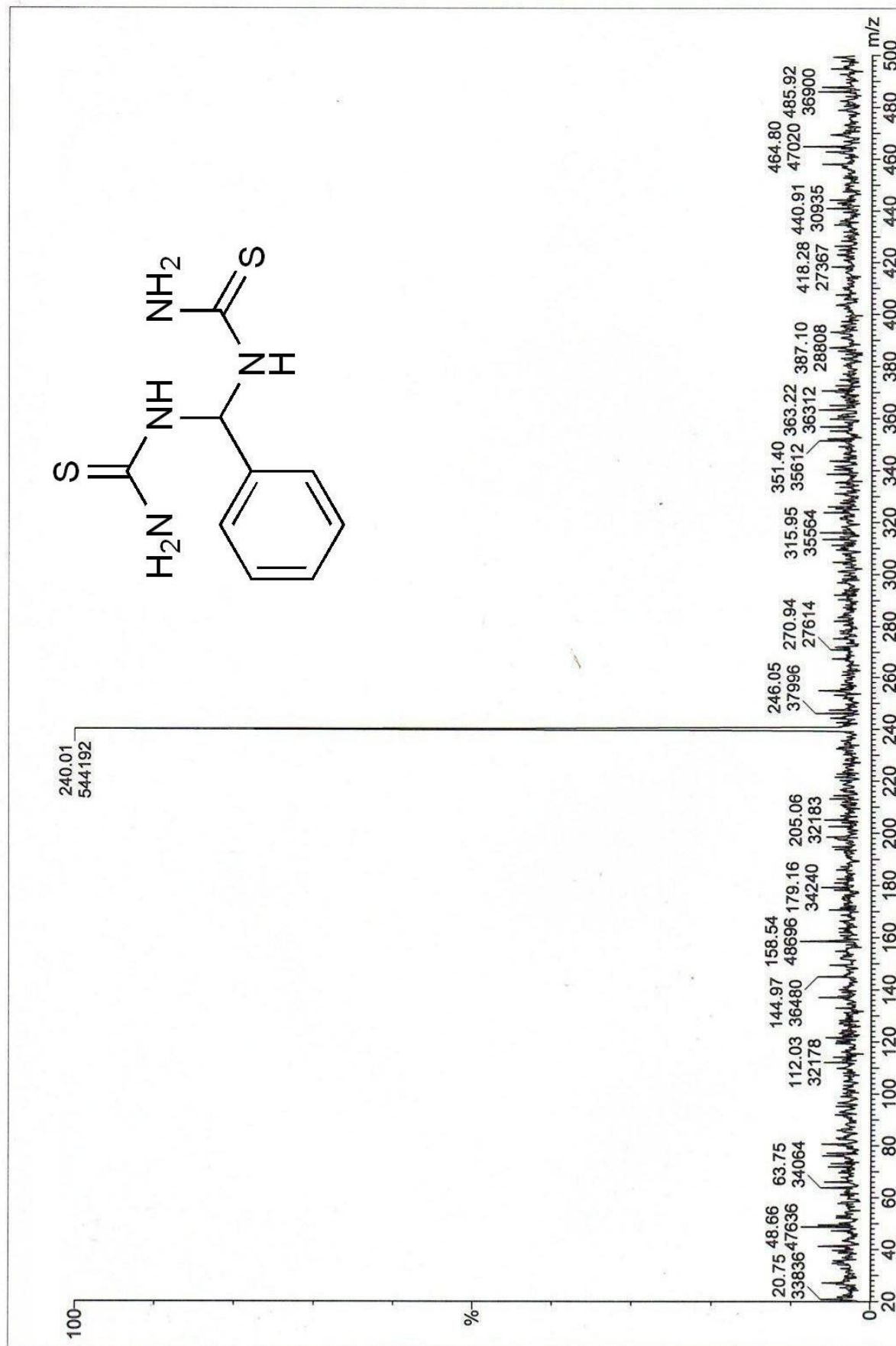
Espectro de H^1RMN (300 MHz, DMSO- d_6) do composto **204a**



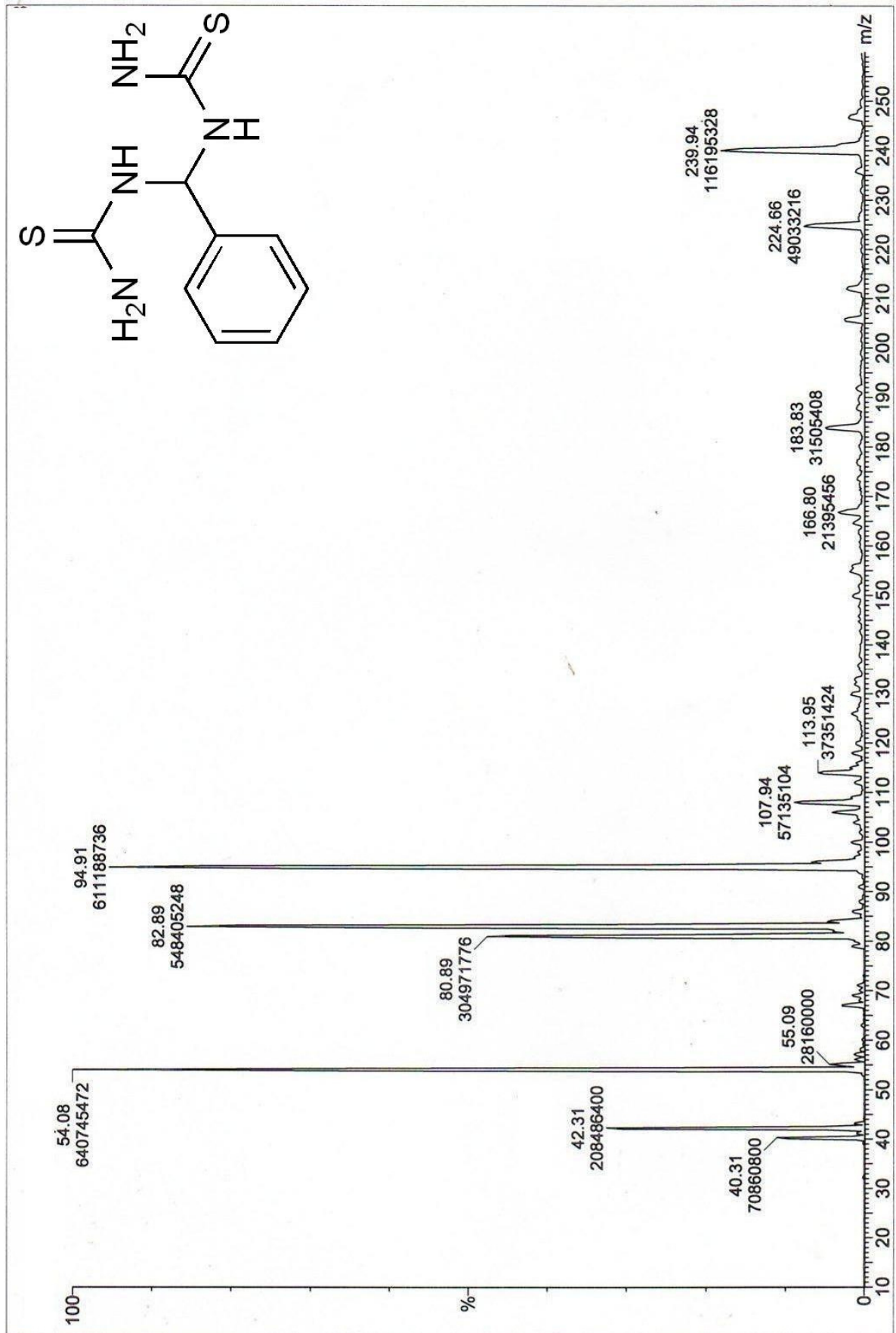
Espectro de C¹³RMN (75 MHz, DMSO-d⁶) do composto **204a**



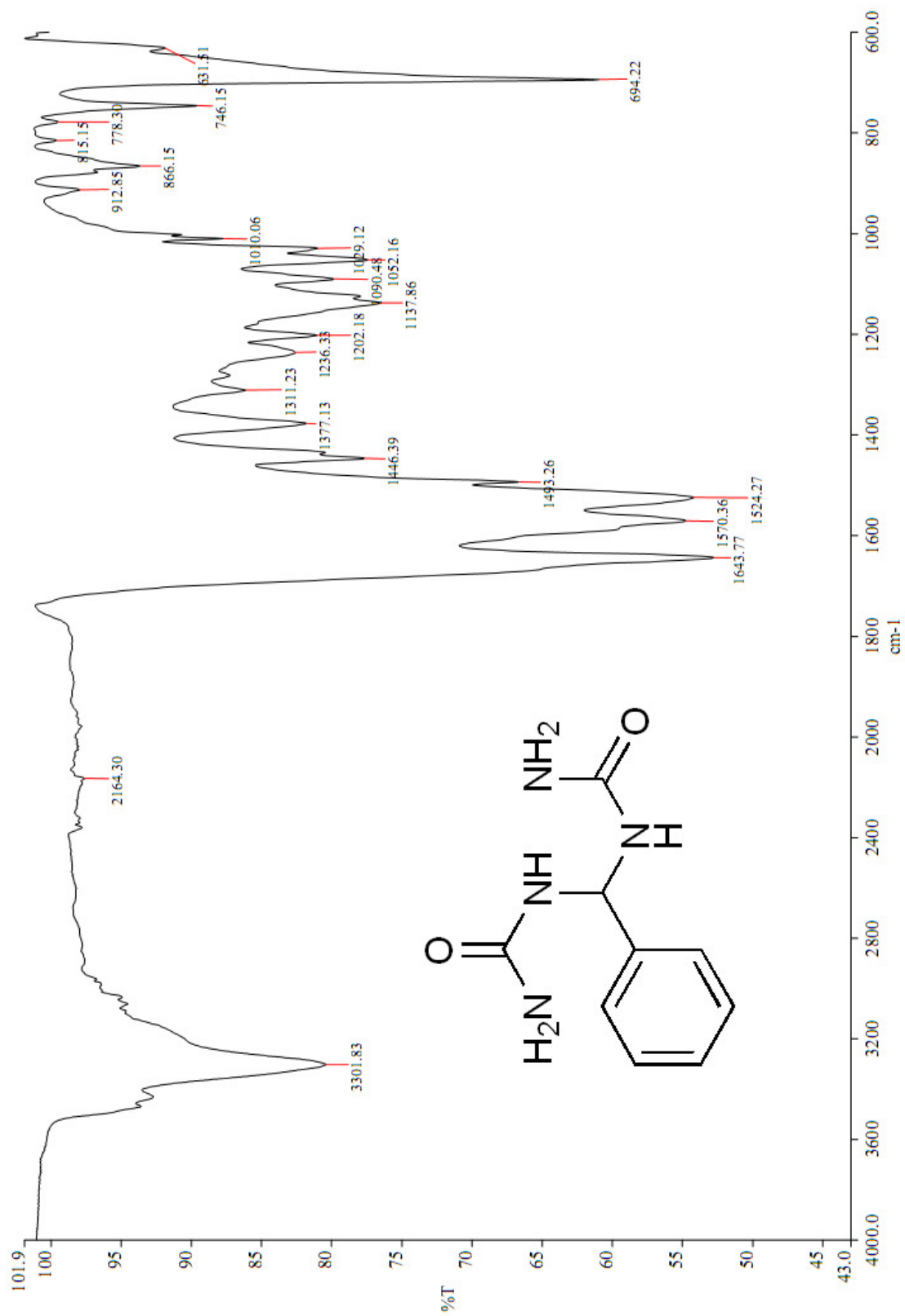
Espectro de IV (KBr) do composto **204a**



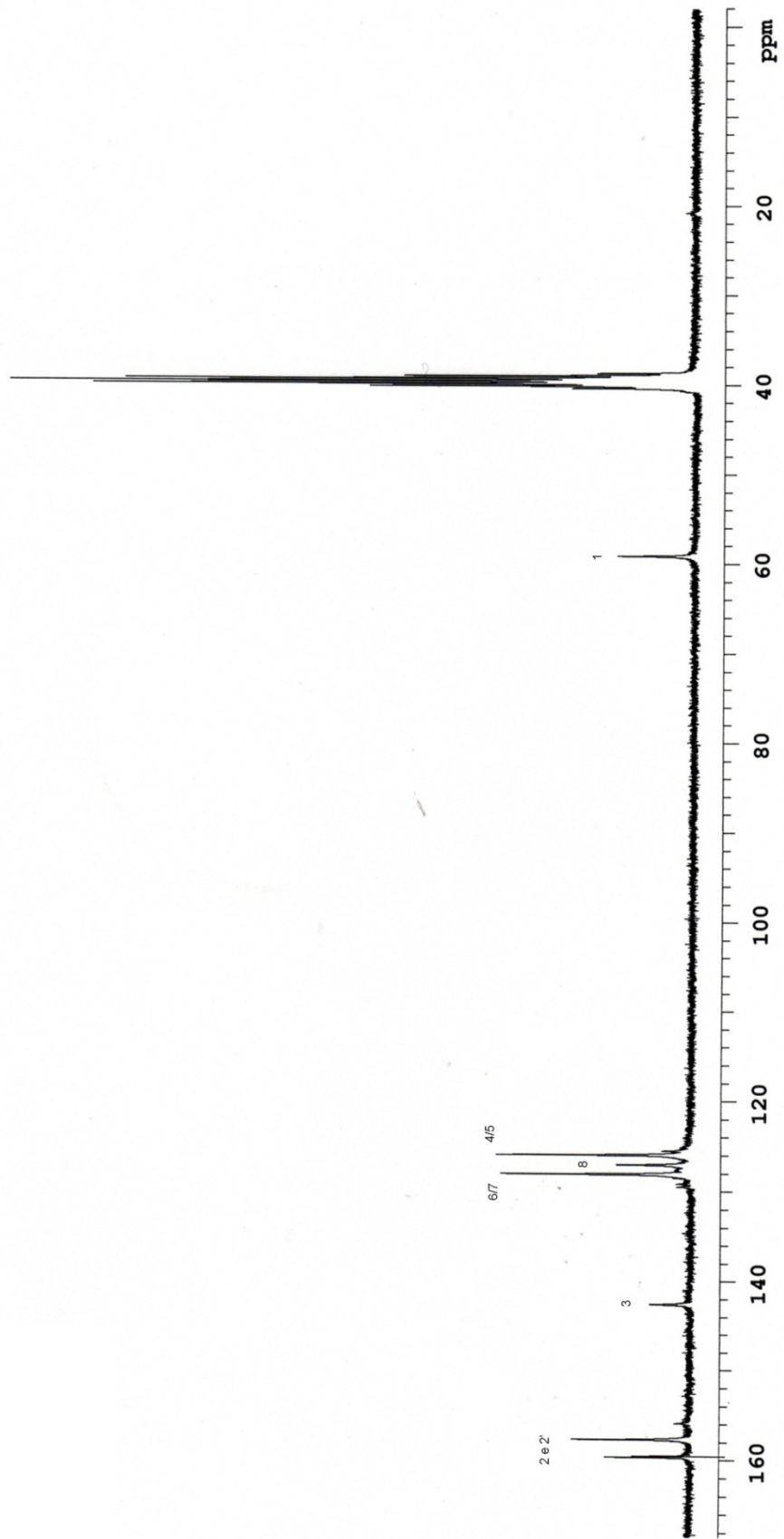
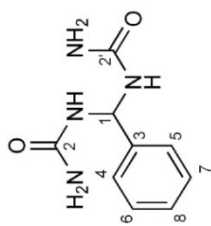
Espectro de Massas (SCAN ES+) do composto **204a**



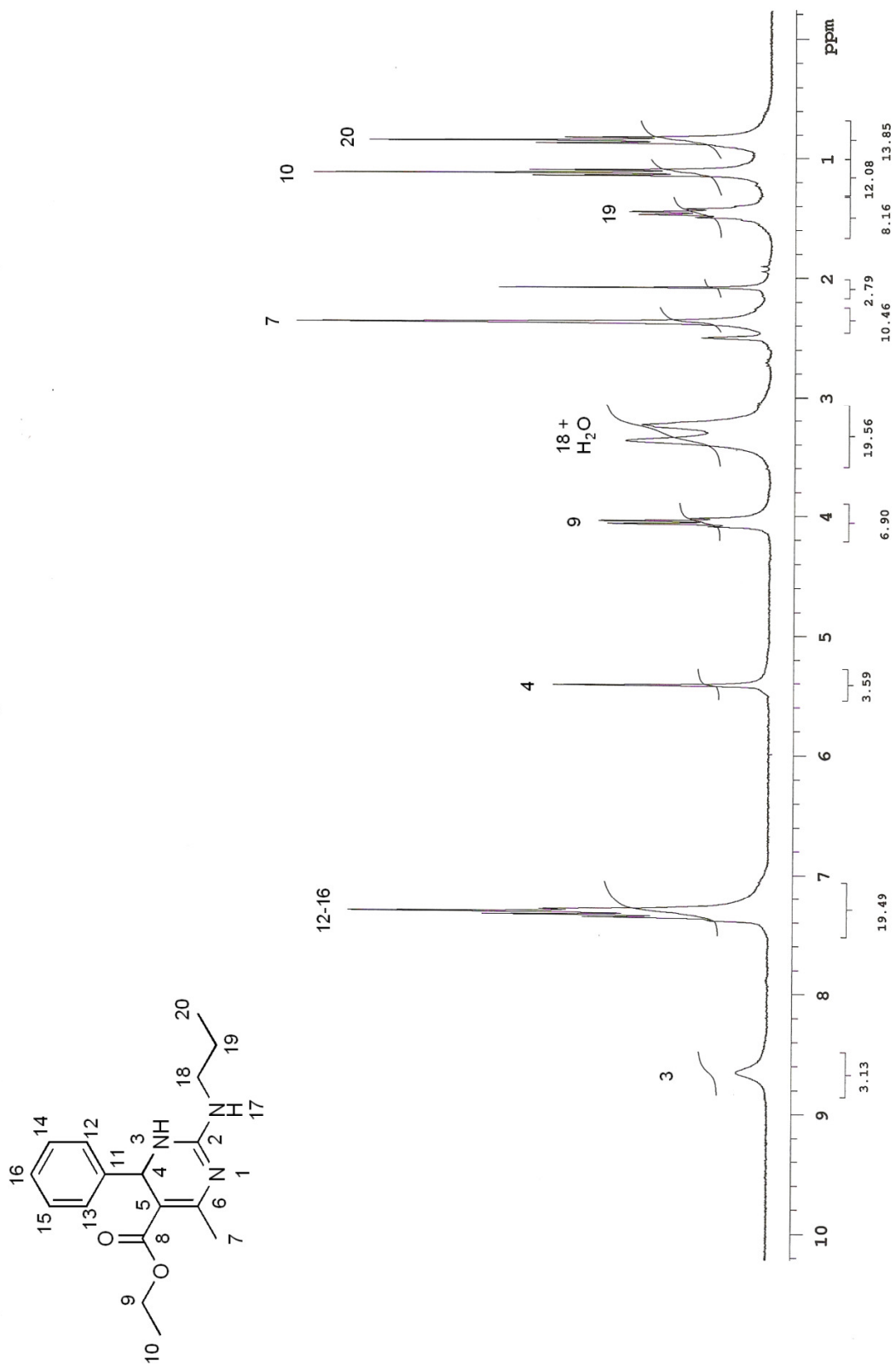
Espectro de Massas (MS2 ES+, fragmentação) do composto **204a**



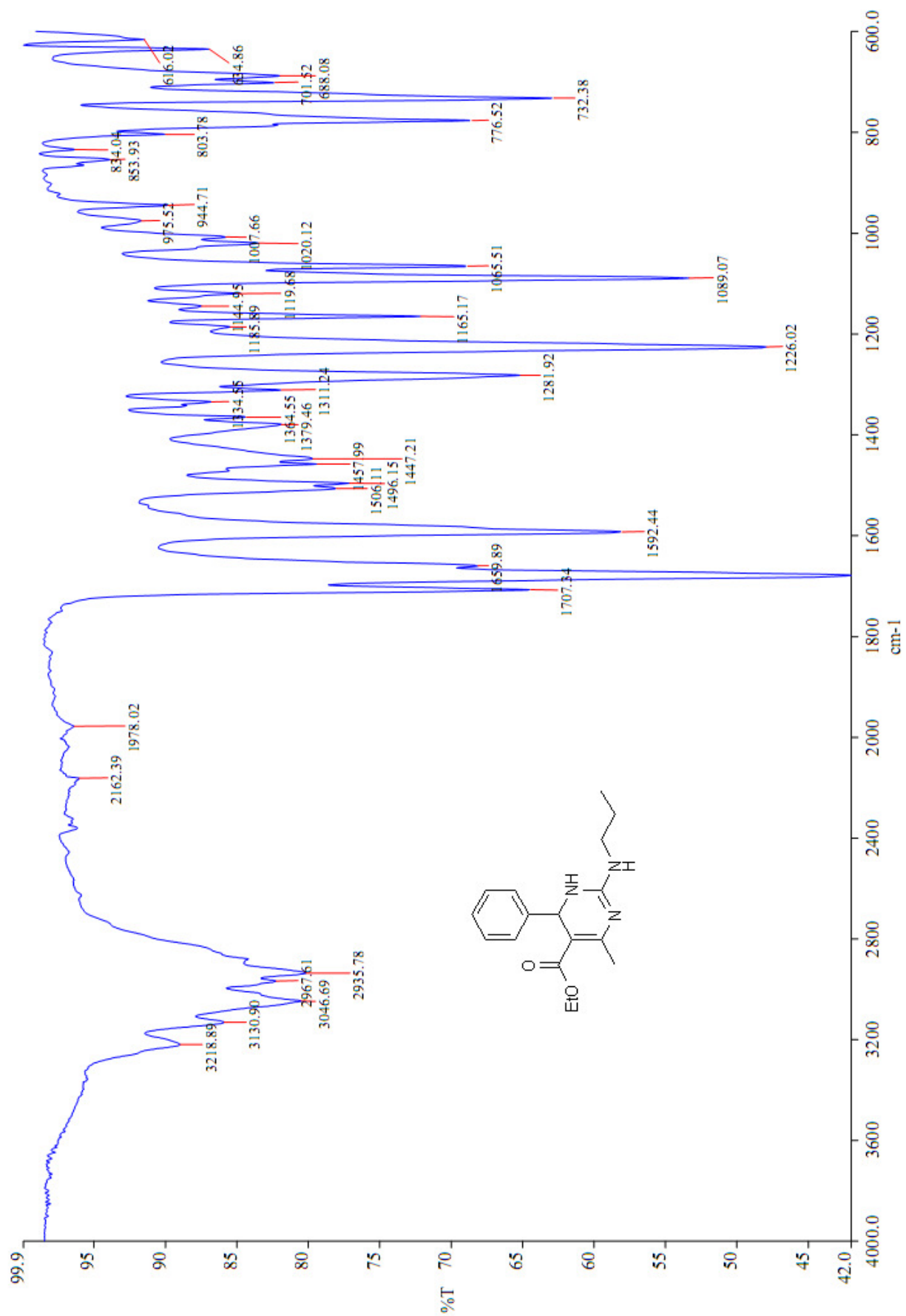
Espectro de IV (ATR) do composto **204b**



Espectro de C^{13}RMN (75 MHz, DMSO-d_6) do composto **204b**



Espectro de H¹RMN (300 MHz, DMSO-d⁶) do composto **250**



Espectro de IV (ATR) do composto **250**