

Desenvolvimento de novos inibidores das proteínas quinases: um contributo para o tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica

Diogo Maria Trindade Fonseca Magalhães e Silva
Mestrado em Química
Departamento Química e Bioquímica
2014

Orientador

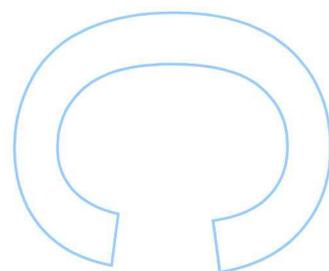
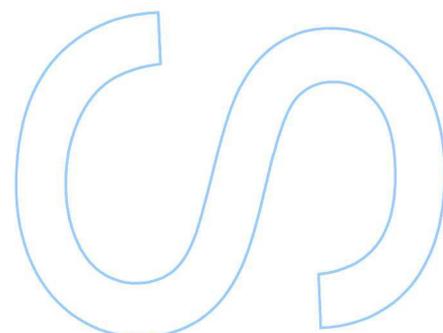
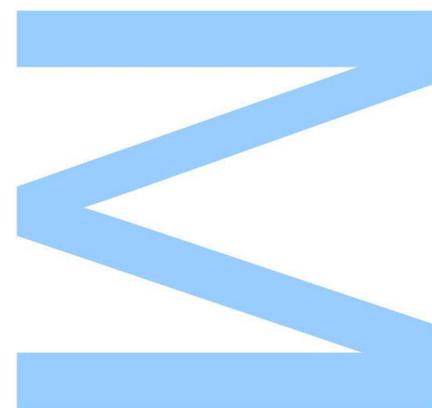
Maria Fernanda Martins Borges, Professora Associada.
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Orientador Externo

Ana Martínez, Professora de Investigação.
Instituto de Química Médica do Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid

Co-Orientador

Fernando Cagide
Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto

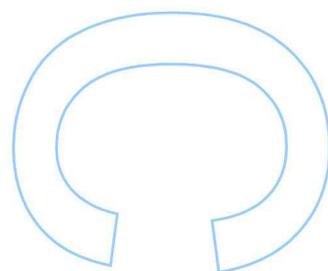
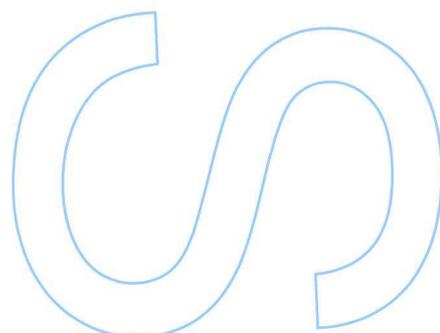
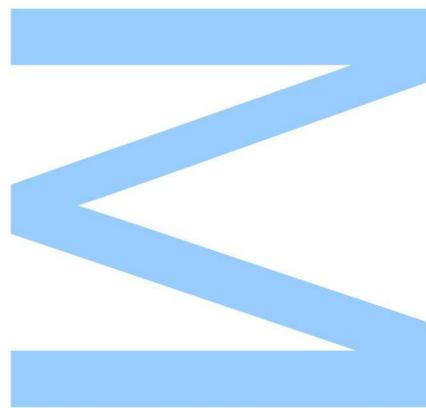




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



“Invictus”

“Da noite que me cobre,
Negra como um poço de alto a baixo,
Agradeço quaisquer deuses que existam
Pela minha alma inconquistável.

Na garra cruel da circunstância
Eu não recuei nem gritei.
Sob os golpes do acaso
Minha cabeça está sangrenta, mas ereta.

Além, deste lugar de fúria e lágrimas
Só o eminente horror matizado,
E, contudo a ameaça dos anos me
Encontra e encontrar-me-á, sem temor.

Não importa a estreiteza do portão,
Quão cheio de castigos o pergaminho (Caminho),
Sou o dono do meu destino:
Sou o capitão da minha alma”

William Ernest Henley, 1875

Agradecimentos

Antes de enumerar todos os agradecimentos às pessoas que tornaram possível o desenvolvimento desta tese, gostava de dedicá-la ao meu pai, Nuno Maria da Fonseca Magalhães e Silva, o qual foi diagnosticado com Esclerose Lateral Amiotrófica, levando ao seu falecimento no final do mês de Agosto de 2014. Desejo agradecer ao meu pai todo o amor, dedicação, simpatia, ternura, honestidade, humildade e carinho que me transmitiu enquanto era vivo, tendo, por isso, contribuído para a pessoa que sou hoje. Foi também ele que me levou a aceitar este projeto e desde já fica aqui a promessa de que irei continuar a investigar para a sua doença e tentar chegar aos melhores resultados possíveis, para que no futuro, haja esperança para as pessoas diagnosticadas com ELA.

Para além do meu pai, à minha mãe e ao meu irmão também agradeço todo o apoio durante todas as etapas da minha investigação e sempre me apoiaram e ajudaram em tudo aquilo que alcancei ao longo da minha vida. Ambos deram-me a possibilidade de ir para Madrid, em Erasmus Estágio, durante 5 meses e iniciar esta investigação, apesar da situação familiar em que nos encontrávamos. Ainda, gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio, enquanto estive em Madrid, mas também em Portugal.

Endereço também os meus sinceros agradecimentos ao Doutor Paulo Faria e à Doutora Sofia Seixas, os quais me orientaram e aconselharam sempre da melhor forma nestes últimos 6 anos, sem nunca menosprezar os objetivos aos quais me estava a propor. Aliás, foram eles que recomendaram eu ingressar no curso de Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, logo se não fossem eles eu não estaria aqui a entregar e defender este grande trabalho.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Fernanda Borges, em primeiro lugar, pela oportunidade de trabalhar no estrangeiro num centro de investigação autónomo e fazer investigação para a Esclerose Lateral Amiotrófica, uma vez que o meu pai teve esta doença. Em segundo lugar, pelo apoio constante e os saberes dados durante o desenvolvimento de todo o trabalho, mas também, em todos os problemas pessoais que tive durante o projeto, que infelizmente, acabam por ser a realidade da vida. Finalmente, e mais importante, obrigado por estar sempre com boa disposição fazendo com que cada dia de trabalho seja melhor e muito divertido.

Por sua vez, gostaria de agradecer à Professora Doutora Ana Martínez, chefe do grupo de Neurofármacos do Instituto de Química Médica-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, em Madrid, por me receber no seu grupo e pelo projeto que me foi atribuído. Da mesma forma, quero agradecer à Doutora Carmen Gil, ao Doutor Daniel Pérez, à Irene García e à Ana García por toda a ajuda em cada dia de trabalho, de modo a

entender como a empresa funcionava e por todo o conhecimento e experiência que adquiri enquanto estive em Madrid, o que me permitiu desenvolver muito, tanto em termos pessoais como profissionais.

Por outro lado, queria agradecer a todos os meus colegas de laboratório pela constante ajuda, pelas conversas e palavras de incentivo, pelos bons momentos partilhados, contribuindo assim para um excelente ambiente de trabalho no laboratório. Sobretudo, queria agradecer ao Doutor Fernando Cagide por toda a ajuda nas reações que realizei e pela transmissão do seu vasto conhecimento de síntese orgânica. Ainda, ao Professor Doutor Nuno Milhazes e à Doutora Alexandra Gaspar, um enorme obrigado por toda a ajuda, disponibilidade e paciência na parte do final do trabalho e por todas as palavras encorajadoras.

Finalmente, quero agradecer aos meus amigos André Bastos, Ricardo Nuno, Francisco Ribeiro, Nuno Teixeira, Jorge Vigário, José Cruz, João Barbosa, Diogo Ribeiro, Teresa Morais, Cristiana Duarte, Pedro Magalhães, Ricardo Taveira, João Pedro Monteiro, Carlos Figueiredo, João Almeida, Pedro Pereira, Olivia Castro, Diana Pereira, Rita Veloso, Maria Inês Guedes, Rui César, Miguel Santos, Sofia Ribeiro, Marco Sousa, Miguel Henrique, Ricardo Reis, Catarina Santos, Catarina Rocha, Pedro Pereira, Valdemar Sousa, Isabel Barbosa, Ricardo Carvalho, Filipe Aguiar, Cristóvão Reis, Inês Alçada, Sofia Alçada, João Correia, Maria Manuel Ferreira, José Pedro Vale, Sofia Martins e Ricardo Taveira todo o apoio e palavras que me dedicaram neste ano extremamente difícil. Sem vocês este grande trabalho não teria sido desenvolvido. As palavras referidas anteriormente para estes meus amigos estendem-se aos meus amigos que me possa ter esquecido de mencionar e que também deram um enorme contributo para o desenvolvimento desta dissertação. Especialmente, gostaria de agradecer à minha namorada Isabel Araújo que esteve sempre ao meu lado quando eu precisei e que tem passado comigo os momentos bons e os maus, mas sempre com palavras carinhosas, honestas, sinceras e verdadeiras que refletem o amor que tenho por ela.

Quero agradecer também aos meus companheiros de casa Gerardo Calle, Hakan Karaosman, Jaime Leon, Glenn Seagars, Bassem Je e Laurent Gina pelos 5 meses incríveis em Madrid, pelo apoio e incentivo constante, parecendo amizades de longa data. Sobretudo, ao Gerardo Calle e ao Jaime Leon que me visitaram no verão de 2014, numa altura complicada para mim, e nunca saíram da minha beira, nem mesmo na última noite deles no Porto. Ainda, agradeço também a todos amigos que fiz no meu Erasmus e com o quais tenho mantido contacto.

Em suma, um muito obrigado muito especial a todos vocês que tornaram a escrita e realização deste trabalho possível e fizeram uma homenagem muito especial ao meu pai.

Muito obrigado a todos!!

Resumo

As doenças neurodegenerativas (ND) como a doença de Parkinson, Alzheimer e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) ou doença de Lou Gehrig, são caracterizadas pelo desconhecimento da sua causa específica e variabilidade de sintomas clínicos. Contudo, considera-se que as ND possuem um denominador comum relacionado com a acumulação de proteínas específicas na forma de agregados insolúveis. Atualmente, uma parte da investigação na área das ND está focada no estudo da base molecular deste tipo de agregados e consequente identificação de novos alvos terapêuticos com vista ao desenvolvimento de soluções terapêuticas inovadoras.

A ELA é uma doença neurodegenerativa progressiva, para a qual não existe uma solução terapêutica, que afeta as células neuronais do cérebro e da medula espinhal. O processo de degeneração das células neuronais motoras tem como consequência, numa primeira fase, uma diminuição da capacidade de iniciar e controlar os movimentos, surgindo com o desenvolvimento da doença a paralisia progressiva associada e dificuldade em falar. Na maior parte dos casos, ocorre na fase terminal uma insuficiência respiratória, a qual costuma ser fatal. Saliencia-se que ao longo deste processo de degeneração a capacidade intelectual e cognitiva do paciente é preservada.

O riluzol, um inibidor da libertação do glutamato, é o único fármaco usado na terapia da ELA. No entanto, este não cura a doença mas reduz modestamente a sua progressão, aumentando desta forma a esperança média de vida do paciente em 2-3 meses. Tendo em conta o que foi referido, considera-se urgente a descoberta de novas soluções terapêuticas, nomeadamente, baseadas em novos alvos biológicos que permitam curar a doença ou prolongar a esperança média de vida dos pacientes com ELA.

Desta forma, os inibidores da proteína quinase Ciclo de Divisão Celular 7 (CDC7), responsável pela formação dos agregados proteicos de TAR DNA *binding protein* 43 (TDP-43) característicos da ELA, apresentam-se como candidatos promissores para o controlo da doença. Neste contexto refere-se o inibidor PHA767491, o qual diminui de forma efetiva a fosforilação da TDP-43. Contudo, a baixa permeabilidade celular deste composto estimula o desenvolvimento de fármacos com maior carácter lipofílico.

Neste contexto, o projeto desenvolvido nesta dissertação focou-se no desenvolvimento de novos inibidores seletivos da quinase CDC7, nomeadamente na síntese e caracterização de derivados da 6-mercaptopurina e da adenina, como um contributo para a descoberta de uma nova solução terapêutica para a ELA. Ainda, foi estudada a síntese de derivados do PHA767491 (PHABoc). Os derivados da 6-mercaptopurina (série A) foram sintetizados por uma reação de alquilação, em que se usou como agente alquilante

acetofenonas monobromadas com diversos padrões de substituição aromática. Os compostos obtidos foram posteriormente *N*-acilados (série B) numa reação que envolveu o uso de anidrido acético e trietilamina, à temperatura ambiente. Para obtenção dos derivados da adenina (série D), procedeu-se a uma reação de *N*-alquilação na posição 9 com o brometo de benzilo (**C**) e, posteriormente a uma reação de *N*-alquilação na posição 6, com duas acetofenonas monobromadas. Os derivados do PHABoc foram preparados em três passos sintéticos, envolvendo numa primeira fase a α -bromação da 4-acetilpiridina, seguida da síntese de pirrolopiridinonas e, por fim, uma etapa de *N*-acilação do sistema pirrólico.

A avaliação biológica efetuada referente aos derivados da 6-mercaptopurina permitiu obter resultados promissores no que diz respeito à sua atividade inibitória em relação à quinase CDC7. Salienta-se o derivado 2-((9*H*-purin-6-il)tio)-1-(naftaleno-1-il)etanona (**A2**) o qual apresentou uma atividade significativa. Os compostos testados até à data não revelaram atividade inibitória para as quinases CK-1 e GSK-3.

Abstract

Neurodegenerative diseases (ND) such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) or Lou Gehrig's disease, Parkinson's and Alzheimer's disease, are characterized by a lack of understanding their specific causes and a variability of clinical symptoms. However, it is considered that ND possesses a common denominator associated with the accumulation of specific proteins in the form of insoluble aggregates. Currently, some of the research in the ND area is focused on the study of the molecular basis of such aggregates and the consequent identification of new therapeutic targets that could lead to the development of innovative therapeutic approaches.

ALS is a progressive neurodegenerative disease which doesn't have a therapeutic solution and affects the neuronal cells in the brain and spinal cord. The progressive degeneration of the motor neurons cells results, in a first phase, in a decreased ability to initiate and control movements. Progressive paralysis and manifestation of speaking difficulties are symptoms in the initial stages of the disease, culminating in most cases by fatal respiratory failure. However, through the process of degeneration, the intellectual and cognitive ability of the patient is preserved.

Riluzole, a glutamate release inhibitor, is the only drug approved by the Food and Drug Administration (FDA) for ALS therapy. Nevertheless, it only reduces the progression of ALS modestly, increasing the average lifespan in 2-3 months. Accordingly, the discovery of new therapeutic solutions, based on new biological targets presents an urgent challenge for the development and discovery of a cure or to prolong the life expectancy of patients with ALS.

Thus, kinase inhibitors of Cell Division Cycle 7 (CDC7), responsible for the formation of protein aggregates of TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) characteristics of ALS, presents as promising candidates for disease control. As a matter of fact, inhibitor PHA767491 decreases the phosphorylation of the TDP-43 effectively. However, as this compound has a low cell permeability, it's necessary the development of new compounds with higher lipophilicity for the treatment of ALS.

In this context, the design developed in this work has focused on the development of new selective inhibitors of CDC7 kinase, namely the synthesis and characterization of derivatives of 6-mercaptapurine and adenine as a contribution to the discovery of a new therapeutic solution for ALS. Furthermore, the synthesis of derivatives of PHA767491 (PHABoc) was also studied. 6-mercaptapurine derivatives (A series) were synthesized by an alkylation reaction, in which was used as alkylating agents monobromide acetophenones with different aromatic substitution patterns. The obtained compounds were then *N*-acylated

(B series) in a reaction that involved the use of acetic anhydride and triethylamine at room temperature. To obtain adenine derivatives (D series), an *N*-alkylation reaction at position 9 with benzyl bromide (**C**) was performed and, subsequently, an *N*-alkylation reaction in position 6, using two monobromide acetophenones. PHABoc derivatives were prepared in three synthetic steps. A first step involving the α -bromination of 4-acetylpyridine, followed by the synthesis of pyrrolopyridinones and, finally, a step of *N*-acylation of the pyrrole system.

The biological evaluation concerning 6-mercaptopurine derivatives yielded promising results regarding its inhibitory activity towards kinase CDC7. Indeed, compound 2-((9*H*-purin-6-yl)thio)-1(naphthalene-1-yl)ethanone (**A2**) showed significant activity. The tested compounds didn't reveal inhibitory activity for CK-1 and GSK-3 kinases.

Palavras-Chave

- Doenças neurodegenerativas
- Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)
- Agregados proteicos
- Degradação proteica
- Proteínas quinases
- Ciclo de Divisão Celular 7 (CDC7)
- Inibidores das proteínas quinases
- PHA767491

Keywords

- Neurodegenerative diseases
- Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)
- Protein aggregates
- Protein degradation
- Protein kinases
- Cell Division Cycle 7 (CDC7)
- Protein kinases inhibitors
- PHA767491

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
Palavras-Chave	x
Keywords	xi
Índice	xii
Lista de Figuras e Anexos	xv
Lista de Tabelas	xix
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xx
1. Introdução	1
1.1. Doenças Neurodegenerativas	1
1.2. Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)	2
1.3. Fatores patológicos da ELA	3
1.3.1. Agregados proteicos na ELA	4
1.3.1.1. Agregados proteicos da proteína TDP-43	4
1.4. Terapia e novos alvos terapêuticos para a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) .	5
1.4.1. Proteínas quinases	6
1.4.1.1. Caseína Quinase 1 (CK-1)	6
1.4.1.2. Glicogénio Sintase Quinase 3 (GSK-3)	7
1.4.1.3. Ciclo de Divisão Celular 7 (CDC7)	8
1.5. O projeto	12
2. Discussão de Resultados	14
2.1. Obtenção dos derivados da 6-mercaptopurina	14
2.2. Obtenção dos derivados da adenina	17
2.3. Obtenção dos derivados do PHABoc	19
2.4. Elucidação estrutural dos compostos sintetizados	21

2.4.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear de ^1H	21
2.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 2D, de ^{13}C e DEPT	25
2.4.3. Espectroscopia de Massa de Impacto Eletrónico (EM-IE)	36
2.5. Avaliação da atividade biológica	37
3. Parte experimental	38
3.1. Reagentes e solventes.....	38
3.2. Instrumentação	40
3.3. Síntese de derivados da 6-mercaptopurina.....	40
3.3.1. Síntese da 2-((9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-metoxifenil)etanona (A1).....	41
3.3.2. Síntese da 2-((9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(naftaleno-1-il)etanona (A2).....	42
3.3.3. Síntese da 2-((9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-nitrofenil)etanona (A3)	43
3.3.4. Síntese da 2-((9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-clorofenil)etanona (A4).....	44
3.3.5. Síntese da 2-((9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(3-metoxifenil)etanona (A5).....	44
3.3.6. Síntese da 2-((9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-bromofenil)etanona (A6)	45
3.3.7. Síntese da 2-((9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-iodofenil)etanona (A7).....	46
3.3.7.1. Síntese da 2-bromo-4'-iodoacetofenona.....	46
3.3.7.2. Síntese da 2-((9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-iodofenil)etanona (A7)	47
3.3.8. <i>N</i> -acilação dos compostos da série A.....	48
3.3.8.1. Síntese do 2-((9-acetil-9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-metoxifenil)etanona (B1) ..	48
3.3.8.2. Síntese do 2-((9-acetil-9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(naftaleno-1-il)etanona (B2) ..	49
3.3.8.3. Síntese da 2-((9-acetil-9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-nitrofenil)etanona (B3).....	49
3.3.8.4. Síntese da 2-((9-acetil-9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-clorofenil)etanona (B4).....	50
3.3.8.5. Síntese da 2-((9-acetil-9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(3-metoxifenil)etanona (B5) ..	51
3.3.8.6. Síntese da 2-((9-acetil-9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-bromofenil)etanona (B6) ..	52
3.3.8.7. Síntese da 2-((9-acetil-9 <i>H</i> -purin-6-il)tio)-1-(4-iodofenil)etanona (B7)	53
3.4. Síntese de derivados da adenina	53
3.4.1. Síntese do <i>N</i> -9 <i>H</i> -benziladenina (C).....	53
3.4.2. Síntese do 2-((9-benzil-9 <i>H</i> -purin-6-il)amino)-1-(4-clorofenil)etanona (D1)	54
3.4.3. Síntese do 2-((9-benzil-9 <i>H</i> -purin-6-il)amino)-1-(naftaleno-2-il)etanona (D2) ..	54

3.5. Síntese de derivados do <i>tert</i>-butil 4-oxo-2-(piridin-4-il)-6,7-dihidro-1<i>H</i>-pirrolo[3,2-c]piridina-5(4<i>H</i>)-carboxilato (PHABoc)	55
3.5.1. Síntese da 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona	55
3.5.2. Síntese do <i>tert</i>-butil 4-oxo-2-(piridin-4-il)-6,7-dihidro-1<i>H</i>-pirrolo[3,2-c]piridina-5(4<i>H</i>)-carboxilato (PHABoc)	56
3.5.3. <i>N</i>-acilação do PHABoc	56
4. Considerações finais e perspetivas futuras	57
5. Referências	59
6. Anexos	62

Lista de Figuras e Anexos

Figura 1.1 - Estudo da mutação de TDP-43 na ELA por: a) imunohistoquímica; b) ampliação da Figura 1a); c) imunofluorescência. A coloração apresentada no estudo foi garantida por imunomarcagem de medula espinhal de humanos com ELA, usando um anti-corpo fosfo-específico de anti-TDP-43 [7]. A Figura 1.1a) e b), mostram inclusões redondas características (cor castanha) e, por sua vez, a Figura 1.1c) apresenta emarenhados desta proteína (cor vermelha) nos neurónios motores inferiores [7].	2
Figura 1.2 - Fórmula de estrutura do fármaco Riluzol, único aprovado pela FDA.	3
Figura 1.3 - Natureza multifatorial da patologia da Esclerose Lateral Amiotrófica.	3
Figura 1.4 - Constituição estrutural da proteína TAR DNA-binding protein 43. Reproduzido de [7].	4
Figura 1.5 - Elucidação do mecanismo patogénico da mutação de TDP-43: Em situações de <i>stress</i> (representado pelos símbolos de relâmpagos), a TDP-43 abandona o núcleo e acumula-se em grânulos de <i>stress</i> [11]. Na ausência destes fatores, a TDP-43 é libertada desses grânulos e regressa ao núcleo [11].	5
Figura 1.6 - Estrutura geral da família de amidas de <i>N</i> -benzotiazolil [18].	7
Figura 1.7 - Exemplos de inibidores da GSK-3 usados em estudos da ELA: a) epigallocatequina-3-galato; b) AR-A014418.	8
Figura 1.8 - Estrutura do complexo proteico CDC7/DBF4, bem como do centro ativo, com duas orientações tridimensionais (3D). Reproduzido de [19].	9
Figura 1.9 - Fórmula de estrutura dos inibidores da CDC7.	10
Figura 1.10 - Ligação do inibidor do tipo ATP competitivo XL413 com o centro ativo da quinase CDC7. Adaptado de [19].	11
Figura 1.11 - Ligação do inibidor do tipo ATP competitivo PHA767491 com o centro ativo da quinase CDC7. Reproduzido de [19].	11
Figura 1.12 - Representação esquemática da estratégia sintética aplicada na síntese dos derivados da 6-mercaptopurina. Reagentes e condições: a) K ₂ CO ₃ , DMF; b) anidrido acético, Et ₃ N, DMF anidro.	12
Figura 1.13 - Representação esquemática da estratégia sintética aplicada na síntese dos derivados da adenina. Reagentes e condições: a) NaH, Br-CH ₂ -Ph, DMF anidro; b) NaH, DMF anidro.	13

Figura 1.14 - Representação esquemática da estratégia sintética aplicada na síntese do PHABoc. Reagentes e condições: a) Br₂, CHCl₃ em refluxo; b) NH₄Ac, EtOH, temperatura ambiente c) AcCl, DMAP, Et₃N, DCM anidro.	13
Figura 2.1 - Representação esquemática da síntese dos derivados da série A da 6-mercaptopurina.	14
Figura 2.2 - Representação esquemática do mecanismo de formação dos derivados da 6-mercaptopurina da série A.	15
Figura 2.3 - Representação esquemática do processo de N-acilação dos compostos A4, A5 e A6 com K₂CO₃ e DMF.	16
Figura 2.4 - Representação esquemática da síntese dos derivados da 6-mercaptopurina da série B.	16
Figura 2.5 - Representação esquemática do mecanismo de formação dos derivados da 6-mercaptopurina da série B.	17
Figura 2.6 - Representação esquemática do processo de N-alkilação da adenina na posição 9.	18
Figura 2.7 - Representação esquemática do mecanismo de formação da N-9H-benziladenina.	18
Figura 2.8 - Representação esquemática do processo de N-alkilação da adenina na posição 6.	19
Figura 2.9 - Representação esquemática do processo de α-bromação da 4-acetilpiridina.	19
Figura 2.10 - Representação esquemática da síntese do PHABoc.	20
Figura 2.11 - Representação esquemática do mecanismo de formação do PHABoc. ...	20
Figura 2.12 - Representação esquemática do processo de N-acilação do PHABoc sintetizado.	20
Figura 2.13 - Espectro homonuclear de ¹H-¹H (COSY) do composto A1.	26
Figura 2.14 - Espectro heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC) do composto A1.	26
Figura 2.15 - Espectro heteronuclear ¹H-¹³C (HMBC) do composto A1.	27
Figura 2.16 - Espectro heteronuclear ¹H-¹³C (HMBC) do composto A1, ampliado de 6,0 a 9,0 ppm.	28
Figura 2.17 - Espectro homonuclear de ¹H-¹H (COSY) do composto A2.	29
Figura 2.18 - Espectro heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC) do composto A2.	29

Figura 2.19 - Espetro heteronuclear ^1H-^{13}C (HMBC) do composto A2.	30
Figura 2.20 - Espetro heteronuclear ^1H-^{13}C (HMBC) do composto A4.	31
Figura 2.21 - Fragmentação características dos derivados da 6-mercaptopurina.	36
Figura 2.22 - Fragmentação características do composto C sintetizado.	36
Figura 2.23 - Fórmula de estrutura do composto 2-(4-bromofenil)etanotioato de <i>S</i>-9H-purin-6-il.	37
Anexo 2.1 - HPLC-MS da reação da <i>N</i>-acilação em meio básico severo, em que o tempo de retenção 4,18 min corresponde ao produto pretendido e 3,88 min a reagente de partida: a) 70 horas à T_{amb} e 3 horas a 60 °C b) 82 horas à T_{amb} e 3 horas a 60 °C.	62
Anexo 2.2 - HPLC-MS dos produtos da <i>N</i>-acilação em meio básico severo com refluxo, em que o tempo de retenção 4,18 min corresponde ao produto pretendido e 3,88 min a reagente de partida: a) da reação à T_{amb}; b) após refluxo e processamento da reação.	63
Anexo 2.3 - Espetroscopia de RMN ^1H (CDCl_3) da fase orgânica da reação de <i>N</i>-acilação para obter B3, em que o sinal do CH_2 próximo de 5 ppm está destacado na caixa a preto.	63
Anexo 2.4 - Espetroscopia de RMN ^1H (CDCl_3) da fase orgânica da reação de <i>N</i>-acilação para obter B7.	64
Anexo 2.5 - Espetroscopia de RMN ^1H (CDCl_3) da fração orgânica da reação de <i>N</i>-alquilação na posição 6 para obter D1.	64
Anexo 2.6 - Espetroscopia de RMN ^1H (CDCl_3) da fase orgânica da reação de <i>N</i>-alquilação na posição 6 para obter D2, em que a caixa de cor preta evidencia a falta de prótons da parte aromática.	65
Anexo 2.7 - HPLC-MS dos produtos da reação de α-bromação da 4-acetilpiridina: a) reação 2; b) reação 5.	65
Anexo 2.8 - HPLC-MS dos produtos da reação do PHABoc: a) produto pouco concentrado e impuro; b) impuro.	66
Anexo 3.1 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A1: a) RMN ^1H (DMSO); b) de ^{13}C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.	68
Anexo 3.2 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A2: a) RMN ^1H (DMSO); b) de ^{13}C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.	70

Anexo 3.3 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A3: a) RMN ¹H (DMSO); b) de ¹³C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.	72
Anexo 3.4 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A4: a) RMN ¹H (DMSO); b) de ¹³C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.	74
Anexo 3.5 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A5: a) RMN ¹H (DMSO); b) de ¹³C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.	76
Anexo 3.6 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A6: a) RMN ¹H (DMSO); b) DEPT (DMSO); c) de ¹³C (DMSO); d) EM/IE.	78
Anexo 3.7 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A7: a) RMN ¹H (DMSO); b) DEPT (DMSO); c) de ¹³C (DMSO); d) EM/IE.	80
Anexo 3.8 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B1: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.	82
Anexo 3.9 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B2: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.	84
Anexo 3.10 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B4: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.	86
Anexo 3.11 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B5: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.	88
Anexo 3.12 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B6: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.	90
Anexo 3.13 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto C: a) RMN ¹H (DMSO); b) DEPT (DMSO); c) de ¹³C (DMSO); d) EM/IE.	92

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Resultados experimentais de RMN de ^1H dos derivados da 6-mercaptopurina (série A).....	23
Tabela 2.2 - Resultados experimentais de RMN de ^1H dos derivados da 6-mercaptopurina (série B).....	24
Tabela 2.3 - Resultados experimentais de RMN de ^1H da matéria-prima C obtida a partir da adenina.	25
Tabela 2.4 - Resultados experimentais de RMN de ^{13}C dos derivados da 6-mercaptopurina (série A).....	33
Tabela 2.5 - Resultados experimentais de RMN de ^{13}C dos derivados da 6-mercaptopurina (série B).....	34
Tabela 2.6 - Resultados experimentais de RMN de ^{13}C do composto C sintetizado.....	35
Tabela 2.7 - Resultados experimentais dos ensaios <i>in vitro</i> dos compostos sintetizados.	37
Tabela 3.1 - Condições experimentais das repetições da síntese da α -bromação da 4-acetilpiridina.....	55

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- **AcOEt** - Acetato de etilo
- **ATP** - Adenosina trifosfato
- **BHE** - Barreira hemato-encefálica
- **Boc** - *tert*-butiloxicarbonilo
- **CC** - Cromatografia em Coluna
- **CCF** - Cromatografia em Camada Fina
- **CDC7** - Ciclo de Divisão Celular 7
- **CDKs** - Proteínas quinases
- **CK-1** - Caseína Quinase 1
- **COSY** - *Homonuclear Correlation Spectroscopy*
- **K_i** - Constante de inibição
- **DCM** - Diclorometano
- **dd** - Duplo duplete
- **DEPT** - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
- **DMF** - *N,N*-Dimetilformamida
- **DMSO** - Dimetilsulfóxido
- **DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- **ELA** - Esclerose Lateral Amiotrófica
- **EM/IE** - Espectroscopia de massa por impacto eletrónico
- **FDA** - *Food and Drug Administration*
- **FUS** - Fusão no sarcoma
- **GSK-3** - Glicogénio Sintase Quinase 3
- **HMBC** - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- **HPLC-MS** - *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*
- **HSQC** - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
- **IC₅₀** - Concentração inibitória máxima de saturação de 50% da enzima
- **J** - Constante de acoplamento
- **m** - Multiplete
- **M⁺** - Ião molecular
- **MeOH** - Metanol
- **MHz** - Megahertz
- **m/z** - Relação massa/carga
- **ppm** - Partes por milhão

- **RMN** - Ressonância Magnética Nuclear
- **RMN ¹³C** - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
- **RMN ¹H** - Ressonância Magnética Nuclear do protão
- **RNA** - Ácido ribonucleico
- **s** - Singuleto
- **Ser/Thr** - serina/treonina
- **SNC** - Sistema Nervoso Central
- **SOD1** - Superóxido Dismutase 1
- **TDP-43** - TAR DNA *binding protein* 43
- **TMS** - Tetrametilsilano
- **Tyr** - tirosina
- **UV** - Luz ultravioleta
- **1D** - Monodimensionais
- **2D** - Bidimensionais
- **λ** - Comprimento de onda
- **δ** - Desvio químico, em ppm

1. Introdução

Neste Capítulo serão apresentados os aspetos gerais mais relevantes das doenças neurodegenerativas, com maior relevo para a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) ou doença de Lou Gehrig, bem como os fatores patológicos característicos desta doença. Ainda, será abordado terapias usadas na ELA, em especial, novos alvos terapêuticos como as proteínas quinases e o desenvolvimento de novos inibidores respetivos.

1.1. Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, Alzheimer, ELA, demência frontotemporal e a doença de Huntington estão associadas a várias condições patológicas relacionadas com o envelhecimento, mas também devido a uma progressiva disfunção e deterioração do Sistema Nervoso Central (SNC) [1]. Estas características levam a defeitos funcionais irremediáveis e, normalmente, fatais. Em cada doença referida, os sintomas clínicos estão relacionados com a área do SNC na qual é prevalente a morte de células neuronais [1]. A idade avançada é o maior fator de risco para o desenvolvimento de alterações neurodegenerativas e, devido ao aumento da esperança média de vida das pessoas, o tratamento dos pacientes com estas doenças tem como consequência um aumento significativo do impacto socioeconómico na sociedade [1]. Para além disso, estas englobam uma variedade de distúrbios neuropsiquiátricos e neurológicas com opções terapêuticas limitadas. Assim, tanto em termos médicos como económicos, é urgente a necessidade de identificar os mecanismos de neurodegeneração e desenvolver novos tratamentos para proteger os neurónios contra as alterações patológicas [1].

Em geral, a maior parte destas doenças apresentam uma diversidade de fenótipos clínicos, porém partilham uma característica comum, que se relaciona com a acumulação de proteínas específicas em agregados insolúveis [2]. A título de exemplo refere-se a β -amilóide em placas senis e tau em emaranhados neurofibrilares no caso da doença de Alzheimer, α -sinucleína em corpos e neuritos de Lewy na doença de Parkinson, agregados de TDP-43 na ELA e na degeneração dos lobos frontotemporais, inclusões ricas em poliglutamina na doença de Huntington e placas de prião na doença de Creutzfeldt-Jakob [2].

Considera-se, atualmente, que a identificação da base molecular destes agregados pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos e ao desenvolvimento de soluções terapêuticas inovadoras.

1.2. Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

Com uma incidência a nível mundial de 2,5 casos por 100,000 pessoas por ano e uma prevalência de 4-6 por 100,000, a ELA é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns e a mais corrente associada aos neurónios motores nos adultos [3]. A causa mais referenciada para justificar o aparecimento dos sintomas de fraqueza muscular generalizada, atrofia, deficiência na fala e na deglutição e progressiva paralisia é a degeneração continua dos neurónios motores superiores ao nível do córtex cerebral e neurónios motores inferiores ao nível do tronco cerebral da medula espinhal [3].

Com os movimentos musculares voluntários progressivamente afetados, os doentes em estágios mais avançados da doença podem ficar totalmente paralisados [4,5]. Salienta-se que ao longo deste processo de degeneração a capacidade intelectual e cognitiva do paciente é preservada [4,5]. Por isso, a doença tem um grande impacto psicológico, tanto para os pacientes como para os cuidadores [5].

A esperança média de vida em pacientes com ELA, após o início dos sintomas, é de 3-5 anos e a morte é, eventualmente, causada por insuficiência respiratória [4]. A maior parte dos pacientes é diagnosticada com a forma esporádica ou idiopática da ELA e cerca de 10% dos pacientes apresentam ELA familiar ou hereditária, causada por mutações em pelo menos um dos 32 genes conhecidos até à data, nomeadamente, a Superóxido Dismutase 1 (SOD1), a TAR DNA *binding protein* 43 (TDP-43, ver Figura 1.1), a fusão no sarcoma (FUS) e o C9ORF72 [1,3,4,6].

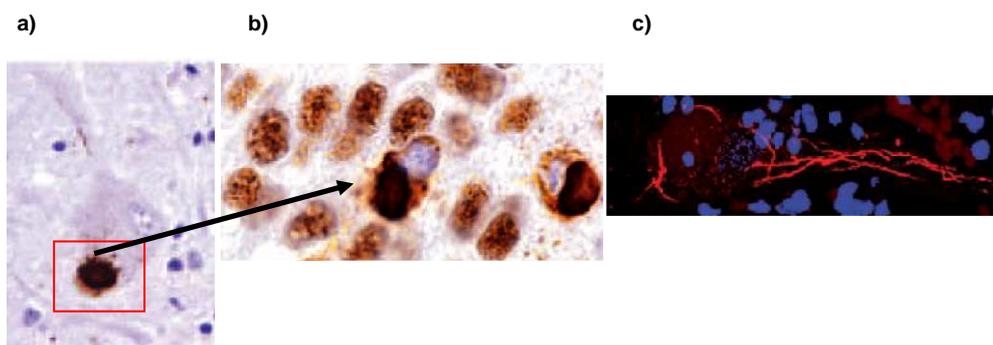


Figura 1.1 - Estudo da mutação de TDP-43 na ELA por: a) imunohistoquímica; b) ampliação da Figura 1a); c) imunofluorescência. A coloração apresentada no estudo foi garantida por imunomarcção de medula espinhal de humanos com ELA, usando um anti-corpo fosfo-específico de anti-TDP-43 [7]. A Figura 1.1a) e b), mostram inclusões redondas características (cor castanha) e, por sua vez, a Figura 1.1c) apresenta emarenhados desta proteína (cor vermelha) nos neurónios motores inferiores [7].

O único tratamento geralmente aceite para a doença é a administração do fármaco antiglutamato Riluzol [8].

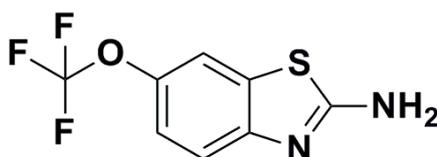


Figura 1.2 - Fórmula de estrutura do fármaco Riluzol, único aprovado pela FDA.

Está descrito que o consumo oral diário de 100 mg deste fármaco (ver Figura 1.2) prolonga a sobrevivência média dos pacientes por, aproximadamente, 2-3 meses e aumenta a probabilidade de sobrevivência, no primeiro ano, em 9 % [8]. Este fármaco pode diminuir a excitotoxicidade através da interrupção da transmissão glutamatérgica no SNC [9]. O riluzol é uma pequena molécula que modula o canal de glutamato do tipo NMDA, regulando a pressão intra-neuronal devida à concentração de cálcio [4]. Para além disso, possibilita a inibição da neurotransmissão glutamatérgica por interações com recetores de glutamato AMPA/cainato, melhora da captação de glutamato da fenda sináptica e inibição da libertação de glutamato e aspartato [9].

1.3. Fatores patológicos da ELA

A causa subjacente da ELA permanece incerta, mas uma relação entre fatores endógenos (genéticos, metabólicos) e fatores exógenos (ambiental, estilo de vida), parece estar envolvida no desenvolvimento da doença [4]. Desta forma, estão descritos uma grande variedade de mecanismos que estão relacionados com a patogénese da doença (ver Figura 1.3). Estes incluem a disfunção mitocondrial e do transporte axonal, a excitotoxicidade do glutamato, o *stress* oxidativo associado a processos microinflamatórios de origem diversa, a agregação proteica, entre outros [4,8]. Todos estes processos estão associados à disfunção muscular característica da ELA.

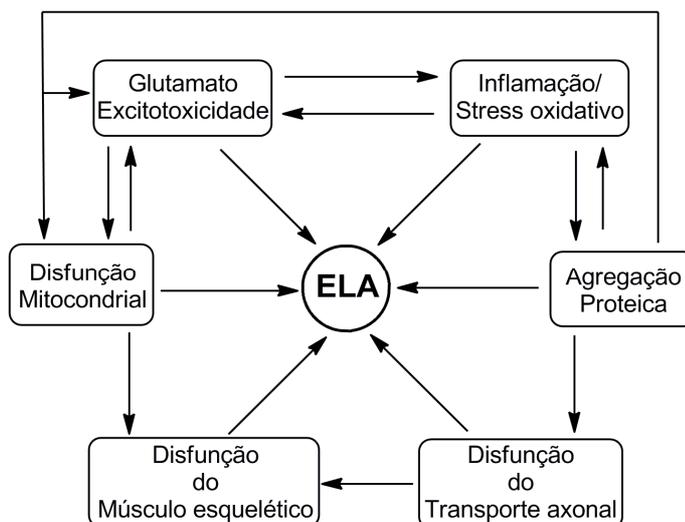


Figura 1.3 - Natureza multifatorial da patologia da Esclerose Lateral Amiotrófica.

1.3.1. Agregados proteicos na ELA

A ELA é caracterizada pela agregação de proteínas ubiquitinadas nos neurónios motores afetados [6]. Estudos recentes identificaram novos agregados celulares relacionados com a ELA, nomeadamente, o FUS, a TDP-43, OPTN, UBQLN2 e o produto da tradução de repetições intrónicas no gene C9ORF72 [6]. As mutações nos genes que codificam estas proteínas são encontradas num subgrupo de pacientes com esta doença (ELA familiar), indicando uma relação de causalidade com a patogénese da doença [6]. As características moleculares e distribuição de diferentes tipos de agregados proteicos na ELA foram também associadas a alterações genéticas específicas, as quais estão intimamente relacionadas com os efeitos dos processos celulares e patológicos subjacentes [6]. Assim, sugere-se que a formação de grânulos alterados de ácido ribonucleico (RNA) e a disfunção do sistema de controlo de qualidade das proteínas contribuem para a agregação proteica na ELA [6].

1.3.1.1. Agregados proteicos da proteína TDP-43

Em 2006, foi descoberta uma proteína nuclear com o peso molecular de 43 kDa, designada de TDP-43, a qual pertencente à família das ribonucleoproteínas heterogéneas [1,6,10,11]. Esta é uma proteína de ligação ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e ao RNA, formada por 414 aminoácidos com dois padrões de reconhecimento de RNA (RRM1 e RRM2) e um domínio rico em glicina que se localiza na posição C-terminal (ver Figura 1.4) [6,7,11,12]. É uma proteína com um papel significativo no metabolismo do RNA, incluindo processos de transcrição e transporte do RNA [1,6,10,11].

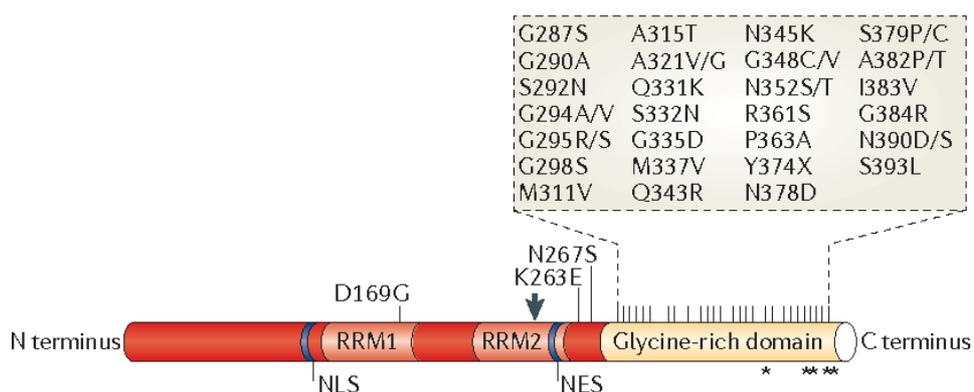


Figura 1.4 - Constituição estrutural da proteína TAR DNA-binding protein 43. Reproduzido de [7].

Quase todos os casos descritos de ELA associados a mutações de TDP-43 ocorrem dentro do domínio em que a glicina é predominante, sugerindo que a alteração da função deste domínio é suficiente para induzir neurodegeneração [6,7,11,12]. Sabe-se que 31 das

32 mutações associadas à ELA ocorrem neste local [6,7,11,12]. Nos doentes com esta patologia, ocorre uma deslocalização desta proteína do núcleo para o citoplasma [1,6,7,11,12].

O deslocamento da TDP-43 também leva à formação de grânulos de *stress*, devido a eventos como o *stress* oxidativo (ver Figura 1.5) [7,11]. Excesso de modificações pós-traducionais, como a fosforilação, leva ao aparecimento de agregados proteicos patológicos de TDP-43 no citoplasma, constituídos também pelos grânulos supracitados, provocando neurotoxicidade [7,11,12,16].

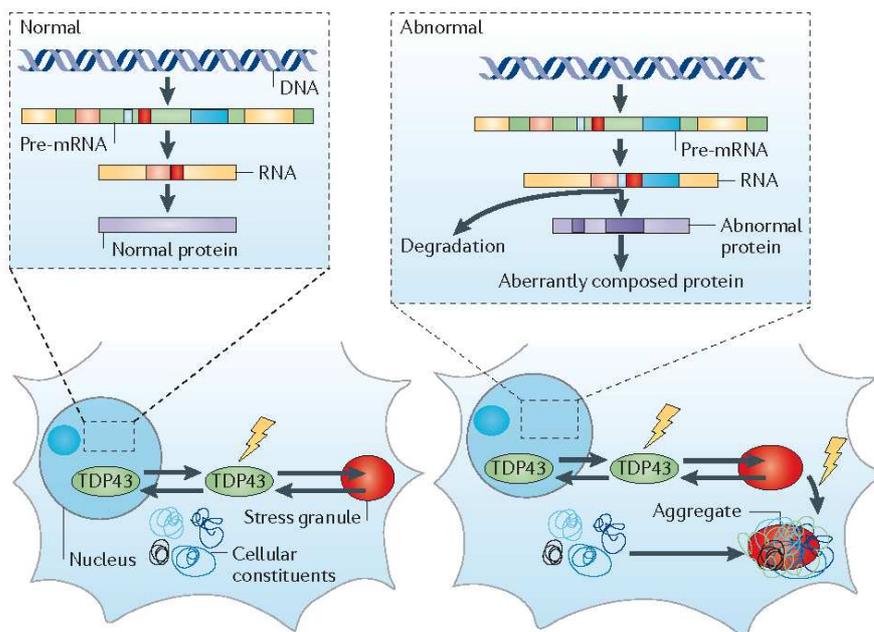


Figura 1.5 - Elucidação do mecanismo patogénico da mutação de TDP-43: Em situações de *stress* (representado pelos símbolos de relâmpagos), a TDP-43 abandona o núcleo e acumula-se em grânulos de *stress* [11]. Na ausência destes fatores, a TDP-43 é libertada desses grânulos e regressa ao núcleo [11].

1.4. Terapia e novos alvos terapêuticos para a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

Tal como foi supracitado, a etiologia da ELA é desconhecida e até ao momento não há tratamento eficaz para esta doença. Para além dos cuidados paliativos e terapia ocupacional, o único fármaco aprovado pela FDA é o riluzol (ver 1.2.).

Estudos recentes evidenciaram que a inibição de proteínas quinases, nomeadamente, a CK-1, a GSK-3 e também a CDC7, apresentam-se como novos alvos terapêuticos desta doença. Ainda, a terapia com células estaminais, através de transplantes, também tem sido recentemente descrita devido à potencialidade de estudar vários mecanismos responsáveis pela etiologia da ELA, apresentando-se como uma das estratégias terapêuticas mais promissoras [13,14]. A administração de vitamina D também tem sido estudada como terapia desta doença neurodegenerativa, a qual apresenta

resultados promissores, pois não só consegue atenuar o *stress* oxidativo, mas também a disfunção mitocondrial e a inflamação [8].

1.4.1. Proteínas quinases

O conjunto de proteínas quinases (CDKs) codificadas pelo genoma humano inclui mais de 500 genes, que podem ser específicas de serina/treonina (Ser/Thr) ou tirosina (Tyr), contudo, o cofactor de ATP liga-se em todas de uma forma muito semelhante [15,16,17,18]. Para além disso, todas utilizam o ATP na sua função de fosforilação fisiológica [17]. O desafio para o desenvolvimento de fármacos para as quinases está relacionado com a homologia no local de ligação de ATP, que constitui uma característica que define a maior parte destas proteínas [18]. As proteínas quinases regulam muitos processos celulares distintos como a proliferação, a diferenciação e a sinalização, por adição de grupos fosfato a substratos de proteínas específicas [15].

A fosforilação proteica reversível é a estratégia principal para o controlo da atividade das células eucarióticas. As vias de transdução de sinal mantêm o funcionamento da célula num estado estacionário equilibrado [15]. As doenças surgem quando a transdução é interrompida, removendo, desta forma, o controlo rigoroso que existe tipicamente nas funções celulares [15]. Doenças devastadoras como o cancro, auto-imunes, doenças neurológicas e relacionadas com hormonas podem ser provocadas por transdução de sinal anormal [15].

1.4.1.1. Caseína Quinase 1 (CK-1)

As caseína quinases são fosfotransferases de Ser/Thr, as quais são expressas em todos os organismos eucarióticos [15,17].

Para a CK-1, foram caracterizadas em diferentes organismos pelo menos sete isoformas (α , β , γ 1-3, δ e ϵ) [16,18]. Todas as isoformas referidas anteriormente são homólogas em relação aos seus domínios de quinase, no entanto, são distintas significativamente no comprimento e na sua estrutura primária do N-terminal e C-terminal dos domínios não-catalíticos [16].

Durante os últimos anos, vários estudos têm destacado a importância da caseína quinase 1 (CK-1) em doenças neurodegenerativas. A CK-1 foi a primeira quinase descrita como interveniente na fosforilação direta da TDP-43, tendo sido verificado o aumento da sua atividade no tecido da medula espinhal em doentes com ELA. Durante os últimos anos, vários estudos têm destacado a importância da CK-1 em doenças neurodegenerativas e foi descrito que 29 sítios distintos da TDP-43 recombinante são fosforilados por esta proteína

quinase [12,16,18]. Ainda, foi demonstrado que a CK-1δ fosforila muitos locais distintos da TDP-43 *in vitro* [18].

Esta descoberta levou à procura e desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos destacando-se, a título de exemplo, alguns derivados do tipo amida baseados no núcleo *N*-benzotiazolil (ver Figura 1.6), os quais revelaram, em ensaios celulares, ser inibidores potentes da CK-1δ, inibindo a fosforilação da TDP-43 [18].

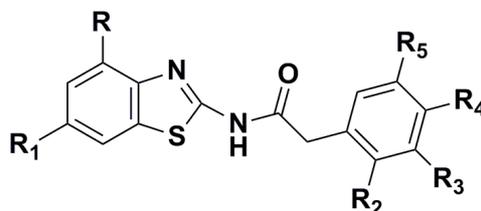


Figura 1.6 - Estrutura geral da família de amidas de *N*-benzotiazolil [18].

Ainda, neste estudo foi demonstrado que este tipo de derivados são inibidores potentes, do tipo competitivo, do centro ativo de ATP (IC_{50} na ordem de grandeza do nanomolar) e seletividade sobre um painel de 456 quinases [18]. O estudo da permeabilidade destes compostos através da barreira hemato-encefálica (BHE) foi efetuado através de sistemas miméticos do tipo PAMPA, tendo os resultados preliminares permitido concluir que os compostos possuem capacidade para atravessar a referida barreira. De salientar que o estudo do seu efeito protetor em relação à neurotoxicidade de hTDP-43, aplicando o modelo de *Drosophila*, revelou serem considerados candidatos promissores para estudos *in vivo* posteriores, tendo como objetivo o tratamento de patologias proteicas relacionadas com a TDP-43 em humanos, como a ELA [18].

1.4.1.2. Glicogénio Sintase Quinase 3 (GSK-3)

A GSK-3 é uma quinase de Ser/Thr multifuncional e ubiquitária, tendo sido originalmente identificada como um regulador do metabolismo do glicogénio [4]. A GSK-3 desempenha um papel crucial na regulação de diversas vias de sinalização celular, nomeadamente, em processos de inflamação e proliferação, através da fosforilação de vários substratos [4,17]. Nos mamíferos, estão presentes duas isoformas da GSK-3 codificadas por genes distintos: a GSK-3α e a GSK-3β [4]. A GSK-3β é particularmente abundante no SNC e fosforila diretamente várias proteínas associadas a microtúbulos neuronais, envolvidas na estabilização dos microtúbulos. Por esta razão reconhece-se que a sua atividade anormal está associada à génese de várias doenças neurodegenerativas [4]. Estudos efetuados em tecidos provenientes de pacientes com ELA, relativamente a tecidos de pacientes com outras doenças neurodegenerativas, por técnicas de análise proteómica,

evidenciaram que a ELA está associada a uma elevada expressão e/ou ativação de diversas proteínas quinases, nomeadamente, a GSK-3 α e GSK-3 β [4].

De forma a estudar o papel da GSK-3 β na génese da ELA realizaram-se diversas experiências, em neurónios motores e no único modelo de rato disponível até à data (G93A-SOD1), com inibidores da enzima referida [4].

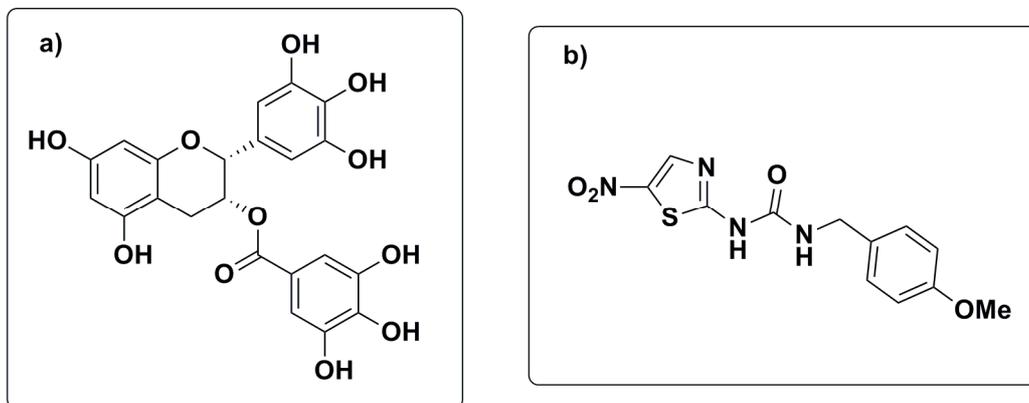


Figura 1.7 - Exemplos de inibidores da GSK-3 usados em estudos da ELA: a) epigallocatequina-3-galato; b) AR-A014418.

Dos estudos efetuados, concluiu-se que a epigallocatequina-3-galato (ver Figura 1.7a) previne a apoptose induzida pelo *stress* oxidativo dos neurónios motores transfectados com o gene mutado G93A-SOD1 por ação da GSK-3 β [4]. Este composto também evidenciou possuir propriedades neuroprotectoras, no modelo de rato usado, atrasando o aparecimento dos sintomas e prolongando a duração dos mesmos, tendo sido proposto a existência de uma inter-relação com alterações de alguns sinais intracelulares, nomeadamente, com a GSK-3 β [4]. As evidências experimentais permitiram propor a GSK-3 β como alvo terapêutico para a ELA e o desenvolvimento de inibidores desta enzima como uma solução terapêutica promissora [4].

Acresce-se ainda referir que estes dados foram também corroborados pelos estudos realizados com o composto AR-A014418 (ver Figura 1.7b), o qual é um inibidor específico da GSK-3 β . No modelo referido anteriormente verificou-se que este tipo de inibidor retarda o aparecimento dos sintomas da doença, observando-se efeitos benéficos ao nível da atividade motora, alterando, deste modo, o progresso da doença [4]. Verificou-se ainda que o inibidor possuía efeitos neuroprotetores, por ações diretas ou indiretas durante o processo de inibição da GSK-3 [4].

1.4.1.3. Ciclo de Divisão Celular 7 (CDC7)

A CDC7 é uma quinase do tipo Ser/Thr, a qual é conservada desde as leveduras até aos seres humanos, e essencial para a ativação do processo de replicação de DNA, durante

a fase S do ciclo celular. Esta quinase apresenta como funções o controlo intra-S-fase, coesão dos cromossomas e a saída de mitose e meiose [19,20]. A sua atividade é controlada por meio da ligação ao seu ativador, DBF4, cuja abundância não é uniforme durante o ciclo celular [19].

A CDC7 e o DBF4 formam um complexo proteico (ver Figura 1.8) que, por vezes, está sobre-expresso em muitos tipos de cancro e linhas celulares tumorais [19].

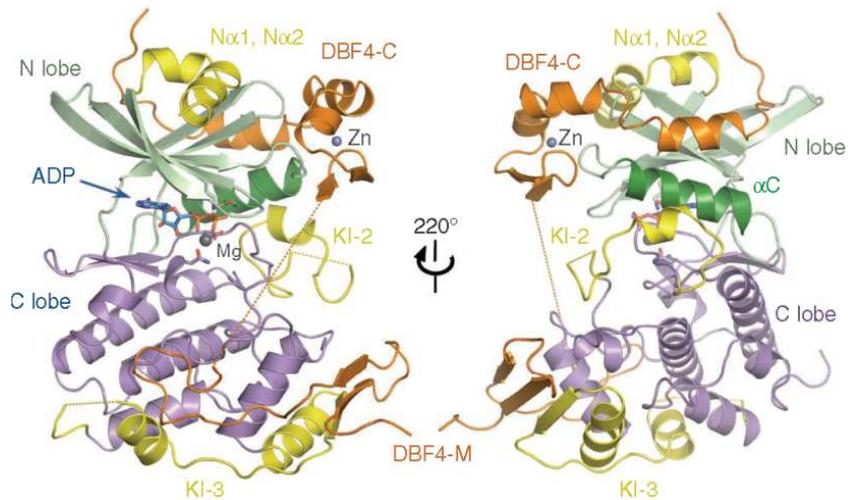


Figura 1.8 - Estrutura do complexo proteico CDC7/DBF4, bem como do centro ativo, com duas orientações tridimensionais (3D). Reproduzido de [19].

Hiperatividade por parte das quinases ocorre tanto em cancros como em doenças neurodegenerativas [21]. Os agregados proteicos de TDP-43 hiperfosforilados são característicos da ELA e da degeneração do lobo frontotemporal [21]. Desta forma, proteínas quinases específicas que estão envolvidas na formação destes agregados, são candidatos a alvos terapêuticos, nomeadamente, através do desenvolvimento de inibidores das mesmas (ver Figura 1.9) [21].

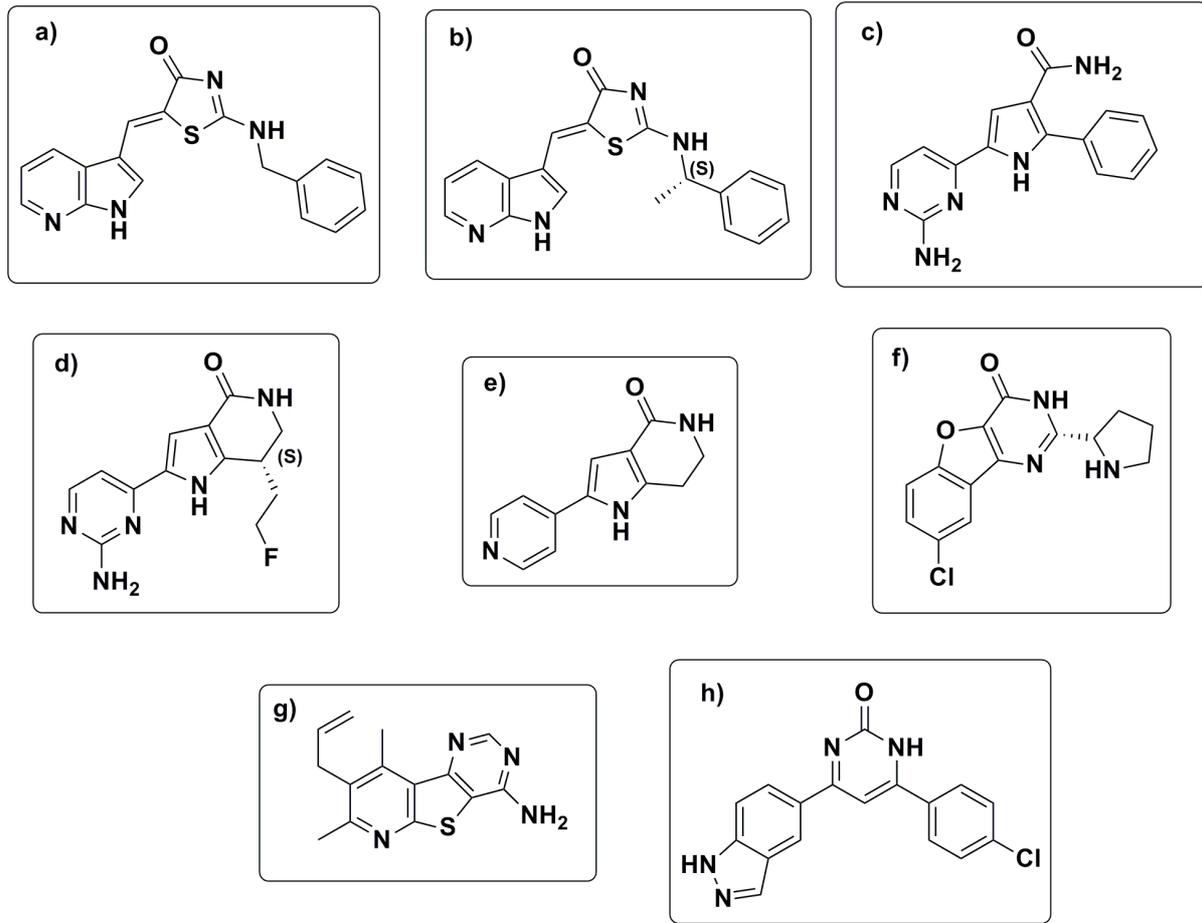


Figura 1.9 - Fórmula de estrutura dos inibidores da CDC7.

Dos diversos tipos de inibidores da CDC7 desenvolvidos até à data salientamos os seguintes: A) derivados do 7-azaindole (ver Figura 1.9a e b, respetivamente) os quais revelaram ser potentes inibidores da CDC7, do tipo competitivo, do centro ativo de ATP [22]; B) derivados do pirrol (ver Figura 1.9c, d e e) [23,24]. Um destes derivados apresentou um perfil bioquímico e propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) semelhantes ao PHA767491 descrito a seguir, e uma eficácia *in vivo* superior [23]; C) derivados da benzofuranopirimidona, como por exemplo, o composto XL413 (ver Figura 1.9f). O XL413 revelou ser um potente e seletivo inibidor da CDC7, do tipo competitivo, do centro ativo de ATP (ver Figura 1.10) [25].

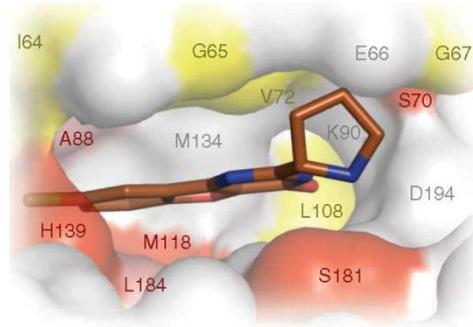


Figura 1.10 - Ligação do inibidor do tipo ATP competitivo XL413 com o centro ativo da quinase CDC7. Adaptado de [19].

D) derivados de piridotienopirimidinas (ver Figura 1.9g). [26]; E) derivados do 4-(1*H*-indazol-5-il)-6-fenilpirimidin-2(1*H*)-ona (ver Figura 1.9h) [27]. F) derivados da pirrolopiridinonas, como por exemplo, o PHA767491 (ver Figura 1.9e). Este composto revelou ser um potente inibidor da CDC7 do tipo competitivo, do centro ativo de ATP (ver Figura 1.11), com um IC_{50} de 10 nM e um valor de constante K_i de 3 nM. Ainda, apresenta uma seletividade superior a 20 vezes em comparação com um painel de outras quinases [28].

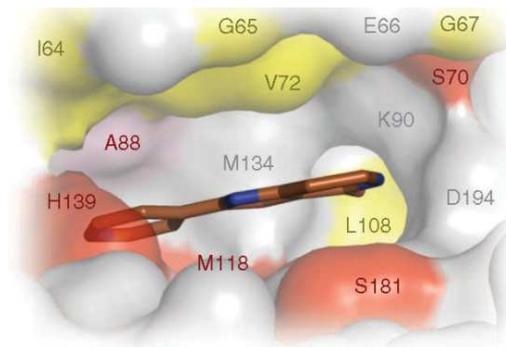


Figura 1.11 - Ligação do inibidor do tipo ATP competitivo PHA767491 com o centro ativo da quinase CDC7. Reproduzido de [19].

De referir que se verificou que no processo de inibição da referida proteína quinase ocorria uma redução significativa da fosforilação da TDP-43 [21]. Este composto é caracterizado por um baixo peso molecular (cerca de 200), uma boa solubilidade em água (>225 μ M a pH 7) e estabilidade metabólica. Contudo apresenta uma baixa permeabilidade celular no ensaio PAMPA [28].

1.5. O projeto

O projeto desenvolvido nesta dissertação teve como objetivo a descoberta de novos inibidores das quinases e/ ou melhoria das propriedades de inibidores já descritos como um contributo para o tratamento da ELA. Neste contexto, a síntese e caracterização de novas moléculas pequenas baseadas na estrutura da 6-mercaptapurina e da adenina foi realizada com sucesso. A síntese de derivados do PHA767491 (PHABoc) também foi estudada.

Relativamente à obtenção dos derivados baseados na 6-mercaptapurina (ver Figura 1.12) realizou-se duas sínteses sucessivas: uma de alquilação do tiol com acetofenonas com um padrão de substituição aromático distinto (série A) e, subsequente, à *N*-acilação na posição 9 dos derivados referidos (série B).

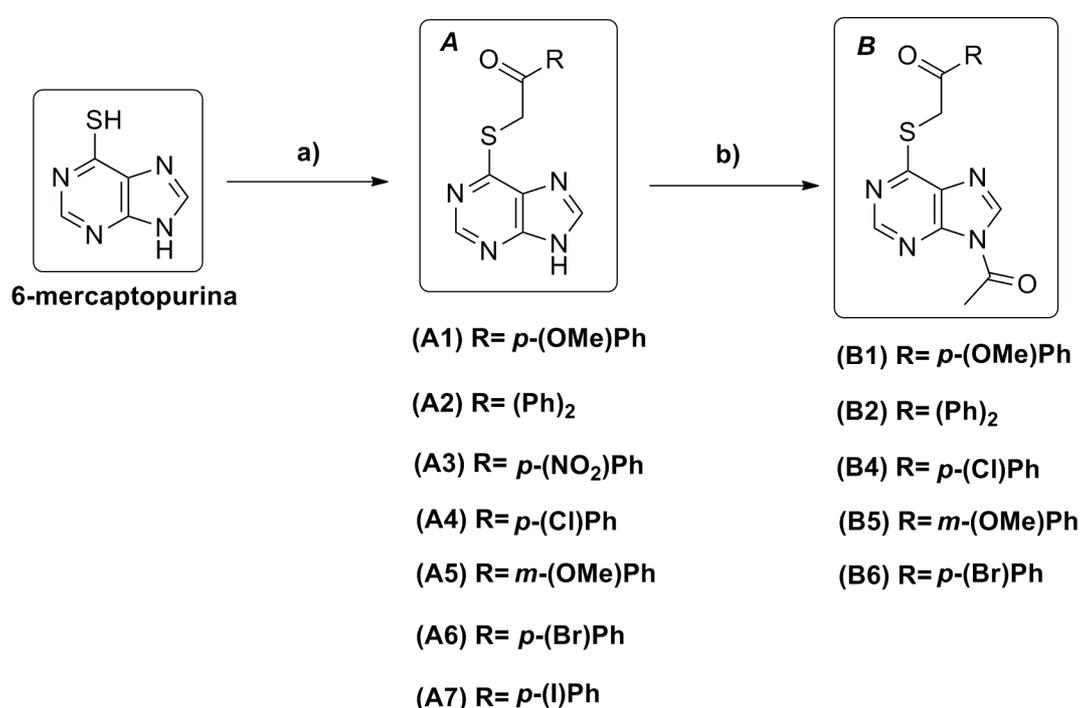


Figura 1.12 - Representação esquemática da estratégia sintética aplicada na síntese dos derivados da 6-mercaptapurina. Reagentes e condições: a) K₂CO₃, DMF; b) anidrido acético, Et₃N, DMF anidro.

Para obtenção dos derivados da adenina foi proposta a realização de uma primeira etapa para sintetizar a matéria-prima **C** (*N*-alquilação na posição 9 com brometo de benzilo), com posterior obtenção dos compostos procedentes da *N*-alquilação na posição 6, conforme ilustrado na Figura 1.13.

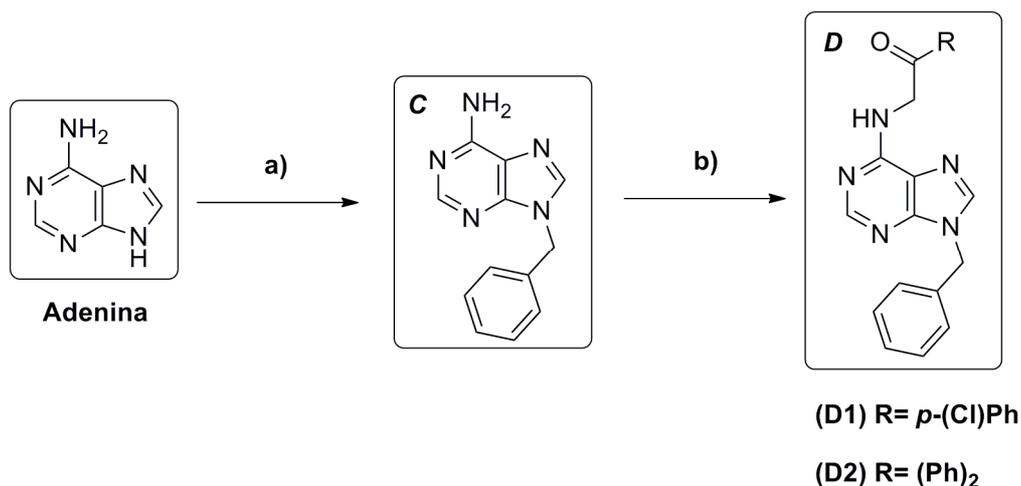


Figura 1.13 - Representação esquemática da estratégia sintética aplicada na síntese dos derivados da adenina. Reagentes e condições: a) NaH, Br-CH₂-Ph, DMF anidro; b) NaH, DMF anidro.

Em relação aos derivados do PHABoc, foi estabelecida uma estratégia sintética em três etapas: a primeira correspondente à α -bromação da 4-acetilpiridina, a segunda para a síntese de pirrolopiridinonas e, por último, a *N*-acilação do pirrol, conforme ilustrado na Figura 1.14.

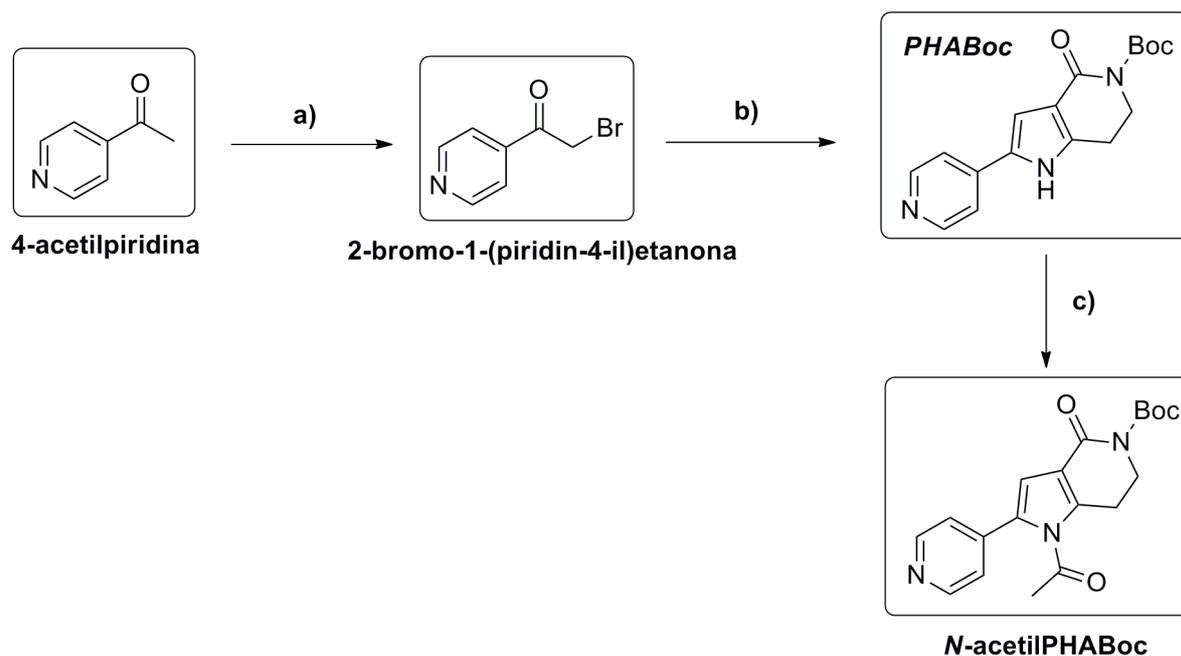


Figura 1.14 - Representação esquemática da estratégia sintética aplicada na síntese do PHABoc. Reagentes e condições: a) Br₂, CHCl₃ em refluxo; b) NH₄Ac, EtOH, temperatura ambiente c) AcCl, DMAP, Et₃N, DCM anidro.

2. Discussão de Resultados

Neste Capítulo são apresentadas as estratégias sintéticas usadas nos processos de obtenção dos derivados da 6-mercaptapurina, da adenina e do PHABoc, assim como os resultados obtidos na sua caracterização estrutural utilizando as técnicas de espectroscopia de RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT) e 2D (HSQC, HBMC, COSY) e de EM-IE. Por fim, são apresentados os resultados obtidos até à data da avaliação da atividade biológica dos derivados sintetizados.

2.1. Obtenção dos derivados da 6-mercaptapurina

Para a síntese dos derivados da 6-mercaptapurina (série A) delineou-se a estratégia sintética apresentada na Figura 2.1.

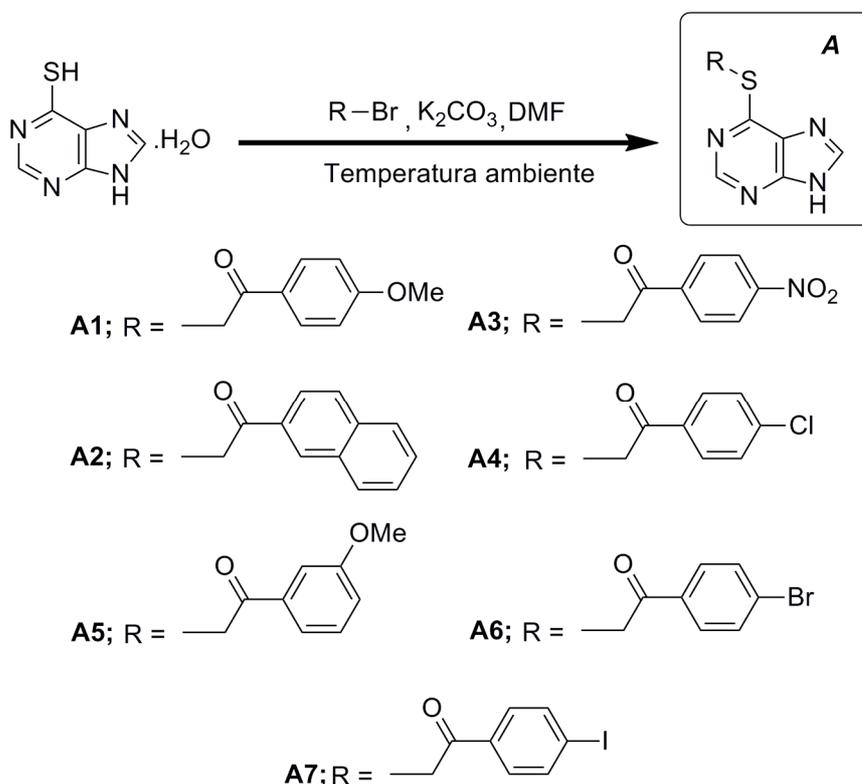


Figura 2.1 - Representação esquemática da síntese dos derivados da série A da 6-mercaptapurina.

Neste processo sintético foi realizada a alquilação do tiol com acetofenonas com padrões de substituição aromática distintos, através de uma base inorgânica (K_2CO_3). Como os tióis são mais ácidos do que os álcoois [29,30], logo, a base vai remover o próton do grupo mercapto, como esquematizado na Figura 2.2.

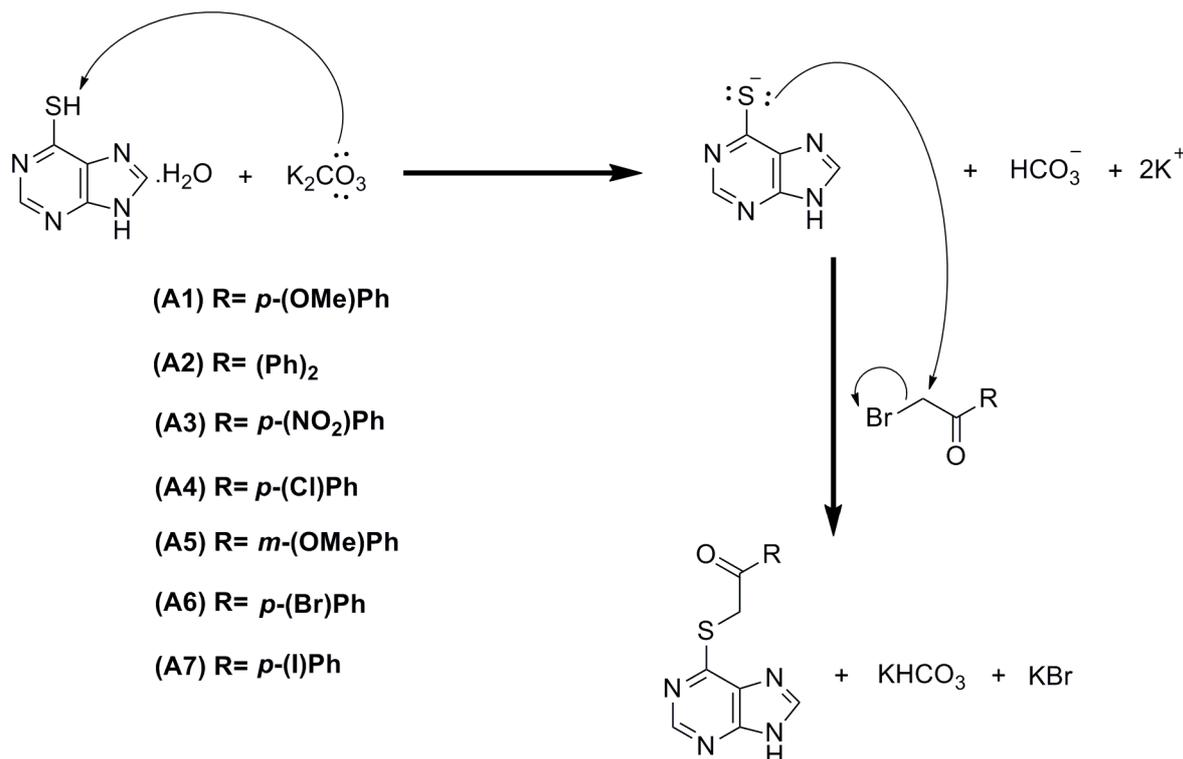


Figura 2.2 - Representação esquemática do mecanismo de formação dos derivados da 6-mercaptopurina da série A.

Nesta primeira fase obtém-se um nucleófilo, o que possibilita uma reação de substituição nucleofílica na posição α das acetofenonas monobromadas utilizadas na obtenção desta série. Com esta reação, obtiveram-se os derivados da 6-mercaptopurina, com designação de **A1** a **A7**, correspondente à acetofenona monobromada usada, com rendimentos moderados. Os rendimentos obtidos foram de 46%, 28%, 25%, 66%, 55%, 42% e 9,0%, referentes aos compostos **A1**, **A2**, **A3**, **A4**, **A5**, **A6** e **A7**, respetivamente. A diminuição de rendimento observada para o composto **A7** deve estar relacionada com a etapa de purificação por CC através do equipamento Biotage Isolera Prime, usando como eluente DCM:MeOH (9:1).

Após a síntese da série A, procedeu-se à *N*-acilação da mesma (série B). Com este objetivo, foram realizados diversos processos de síntese, cujos procedimentos estão descritos na literatura (ver Figura 2.3) [31,32,33], os quais envolveram o uso de bases diferentes.

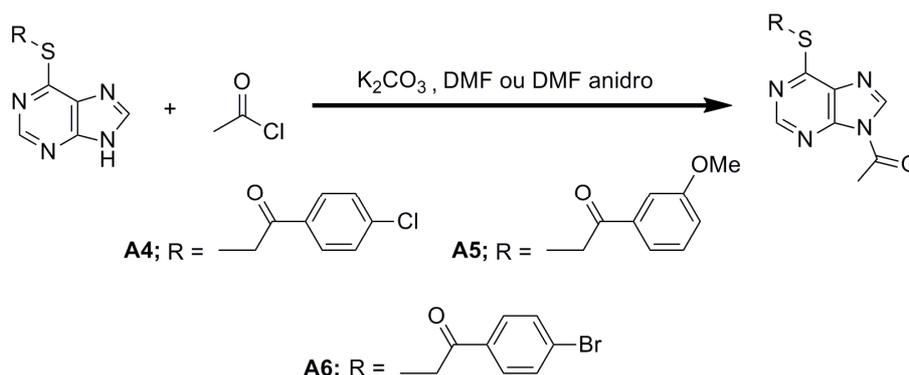


Figura 2.3 - Representação esquemática do processo de *N*-acilação dos compostos A4, A5 e A6 com K_2CO_3 e DMF.

Na síntese descrita na Figura 2.3, usou-se como base K_2CO_3 em DMF e o reagente acilante foi o cloreto de acetilo (AcCl). A reação decorreu à temperatura ambiente e/ou com aquecimento ($60\text{ }^\circ\text{C}$ ou refluxo). Esta reação corresponde a realizar uma proteção do grupo amino da posição 9, formando-se uma acetamida, tal como pode ser realizada para os álcoois de acordo com a literatura [29,30]. Nestas condições reacionais observou-se a degradação do produto pretendido (ver Anexo 2.1). Por outro lado, o uso de aquecimento também provoca os mesmos resultados (ver Anexo 2.2).

Em alternativa, foi efetuada uma síntese em que a base e o agente acilante são distintos, nomeadamente, trietilamina e anidrido acético, respetivamente. A reação decorreu à temperatura ambiente, sendo possível obter com sucesso os derivados da série B da 6-mercaptopurina (ver Figura 2.4).

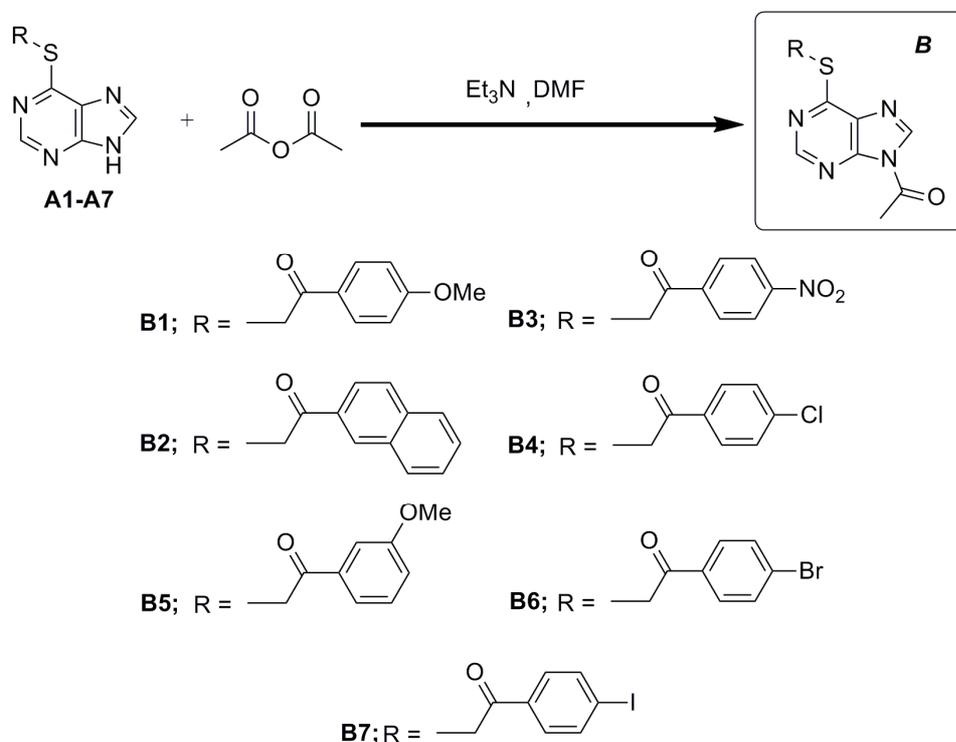


Figura 2.4 - Representação esquemática da síntese dos derivados da 6-mercaptopurina da série B.

O mecanismo pelo qual a reação ocorre está descrito na Figura 2.5. O azoto do núcleo da purina com o par de eletrões não-ligante, tem carácter nucleofílico, promovendo um ataque ao grupo carbonilo do anidrido acético, de forma a preparar uma acetamida que protege o grupo amino [29,30]. De salientar, que a trietilamina, dadas as suas propriedades básicas, vai remover o protão, neutralizando a carga gerada pelo primeiro passo mecanístico.

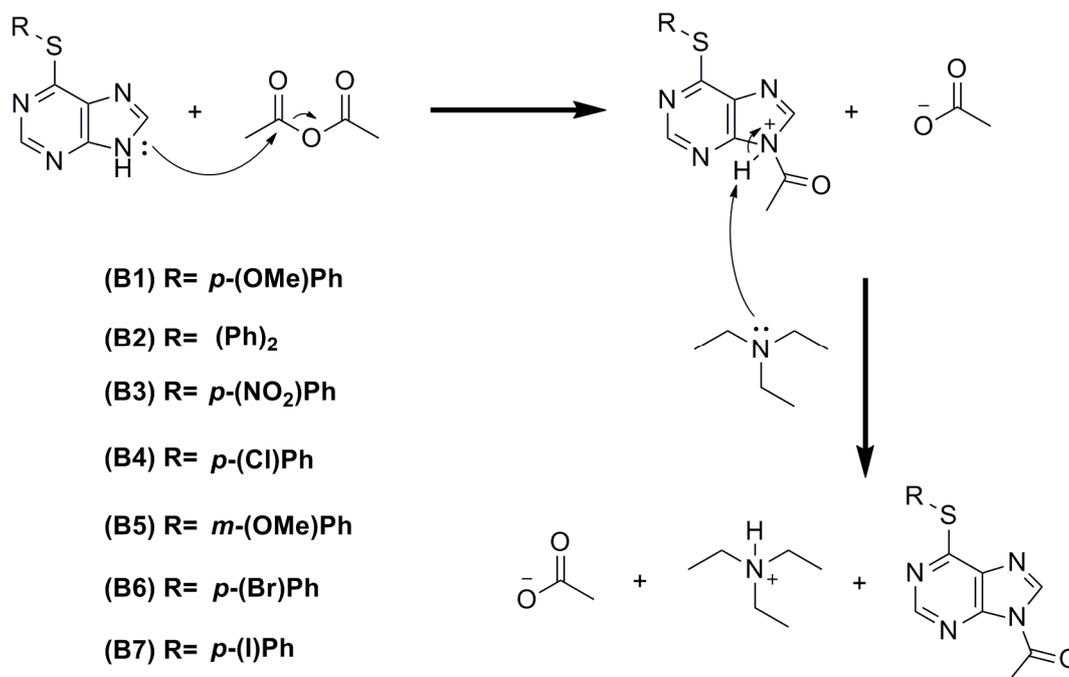


Figura 2.5 - Representação esquemática do mecanismo de formação dos derivados da 6-mercaptopurina da série B.

Através desta via sintética, sintetizaram-se cinco compostos acetilados na posição 9 (série B), os quais foram designados de **B1** a **B7**, em função do derivado da série A utilizado. Os rendimentos obtidos foram 38%, 72%, 40%, 87% e 24%, relativos aos compostos **B1**, **B2**, **B4**, **B5** e **B6**, respetivamente. Os rendimentos dos compostos **B2** e **B5** são, provavelmente, mais elevados que os restantes devido a uma simplificação no processo da reação.

Durante o período de execução deste projeto não foi possível obter o composto **B3** e **B7**. Após purificação, os produtos da reação não apresentaram as características pretendidas (ver Anexo 2.3 e 2.4, respetivamente).

2.2. Obtenção dos derivados da adenina

Para a síntese dos derivados da adenina (série D), procedeu-se em primeiro lugar à síntese da matéria-prima *N*-9*H*-benziladenina (composto **C**), a qual envolveu uma reação de *N*-alquilação na posição 9 com brometo de benzilo, conforme ilustrado na Figura 2.6.

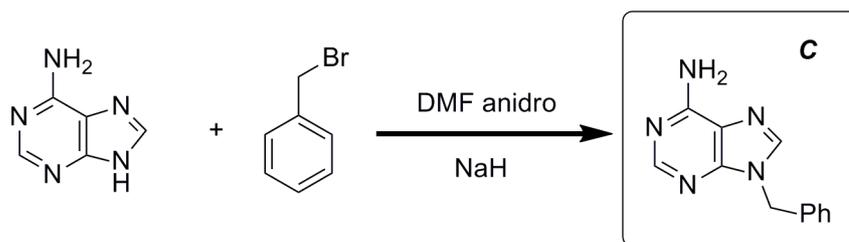


Figura 2.6 - Representação esquemática do processo de *N*-alquilação da adenina na posição 9.

Nesta reação foi usada como base NaH, a qual vai remover o protão do azoto do núcleo da purina, cujo pKa é inferior ao da amina primária (ver Figura 2.7).

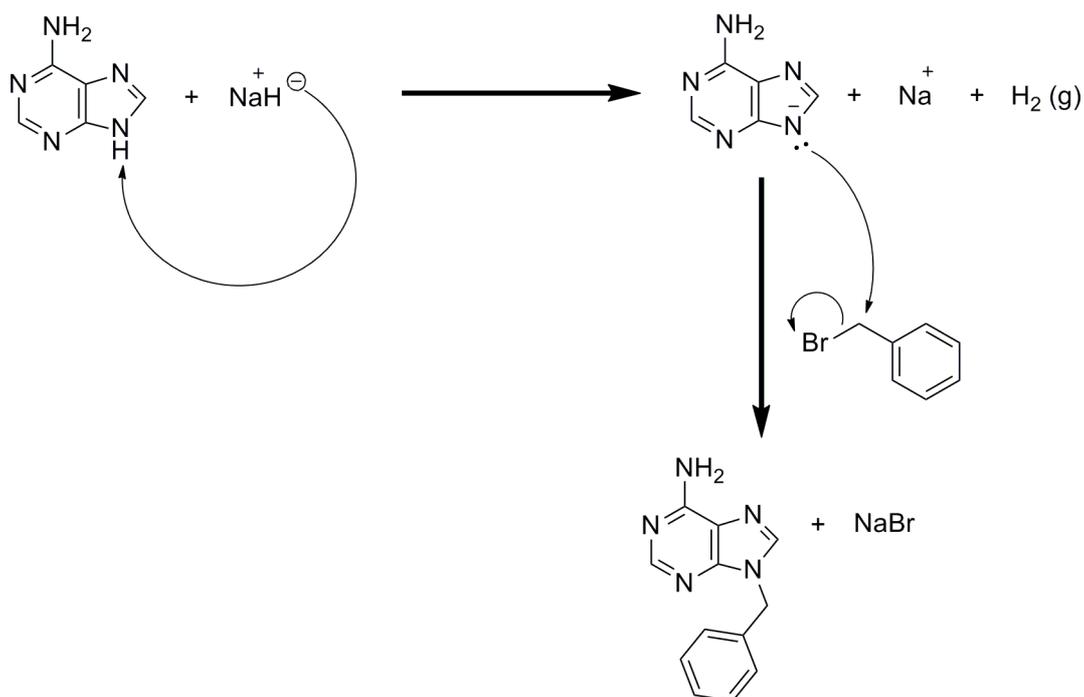


Figura 2.7 - Representação esquemática do mecanismo de formação da *N*-9*H*-benziladenina.

Tendo em conta que as amins são bons nucleófilos, dá-se a reação de substituição nucleofílica com o brometo de benzilo [34]. Assim, formou-se o composto desejado (**C**) com um rendimento moderado (24%), a qual foi, posteriormente, *N*-alquilada com duas acetofenonas monobromadas (2-bromo-4'-cloroacetofenona e 2-(bromoacetil)naftaleno), conforme ilustrado na Figura 2.8.

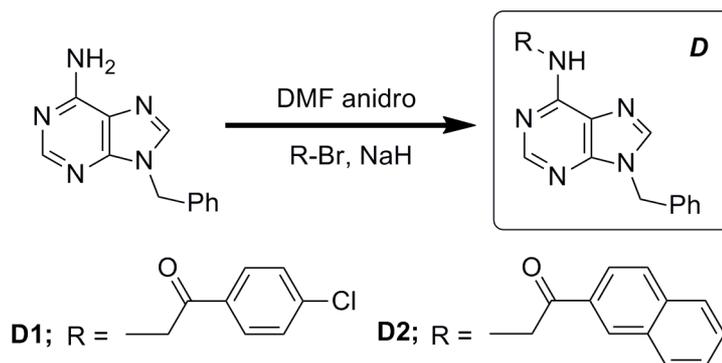


Figura 2.8 - Representação esquemática do processo de *N*-alquilação da adenina na posição 6.

O mecanismo subjacente a esta reação é idêntico ao descrito na Figura 2.7. Através desta estratégia sintética não foram obtidos os derivados **D1** e **D2**. O insucesso da reação pode estar relacionado com a insolubilidade relativa e dificuldades no processo de purificação da matéria-prima nas condições reacionais usadas (ver Anexo 2.5 e 2.6).

Estes resultados sugerem que a *N*-alquilação da amina primária nestas condições não foi melhor estratégia para se obter estes derivados. Provavelmente, o NaH não consegue remover o protão do grupo amino da posição 6 à temperatura ambiente. De forma a preparar estes derivados terá que se tentar elaborar outras estratégias sintéticas e/ou alterar as condições experimentais, como a temperatura, para modificar a cinética desta reação.

2.3. Obtenção dos derivados do PHABoc

A escolha das etapas sintéticas a seguir discriminadas para a síntese de derivados do PHABoc teve em atenção os resultados do ensaio PAMPA para o PHA767491. Assim, pretende-se estudar qual o efeito na permeabilidade celular através de alterações na lipofília da molécula e, por outro lado, verificar se as restantes propriedades físico-químicas se mantêm ideais.

Desta forma, para a síntese dos derivados do PHABoc, primeiramente, efetuou-se a α -bromação da 4-acetilpiridina, tal como se encontra apresentado na Figura 2.9.

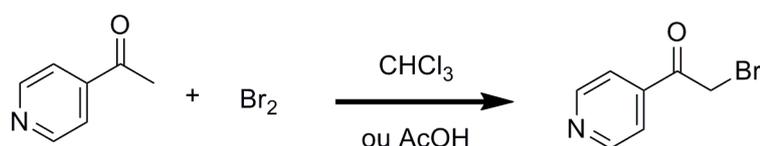
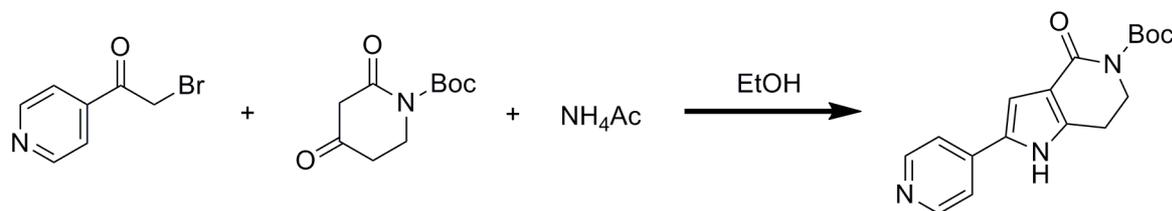


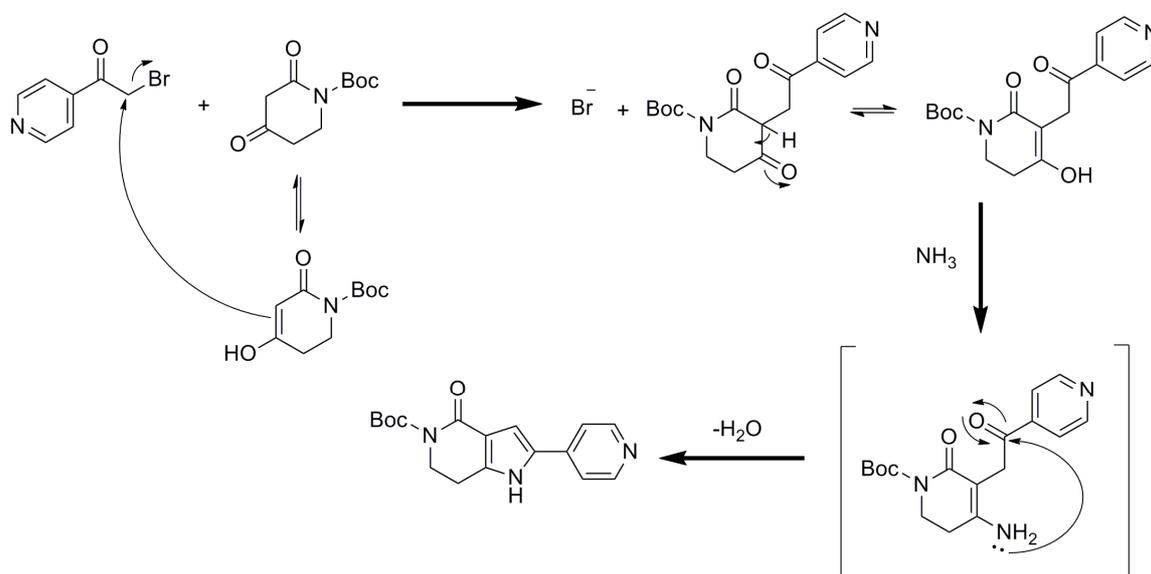
Figura 2.9 - Representação esquemática do processo de α -bromação da 4-acetilpiridina.

Ao longo do processo de preparação da 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona, os compostos obtidos correspondiam ao produto pretendido. No entanto, o seu estado de pureza não possibilitou a sua caracterização completa (ver Anexo 2.7). Não obstante, como

se tratava de um intermediário para obter o PHABoc, este foi utilizado na síntese seguinte (ver Figura 2.10). De forma a ter quantidade de composto suficiente para a realização da síntese seguinte, a reação foi repetida várias vezes.

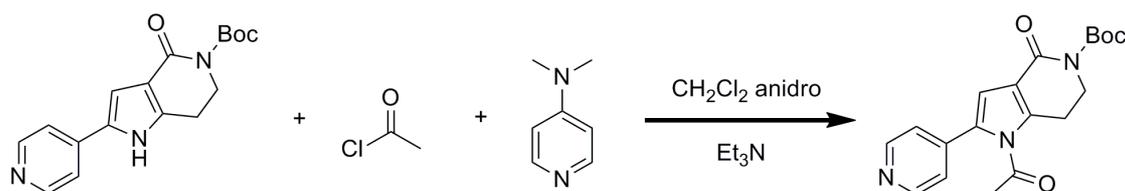


Nesta reação, o primeiro passo mecanístico corresponde ao ataque nucleofílico por parte do alceno, formado por tautómeria, à 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanonato representado na Figura 2.11.



Em seguida, o amoníaco proveniente do acetato de amónio, ataca o grupo carbonilo, formando-se uma enamina, de acordo com o que se encontra descrito na literatura [29,34]. Seguidamente, ocorre um processo de ciclização, que após uma desidratação dá origem ao pirrol pretendido.

Para a síntese dos derivados do PHABoc procedeu-se à *N*-acilação do pirrol do composto sintetizado anteriormente, conforme apresentado na Figura 2.12.



A obtenção do derivado do PHABoc pretendido não foi bem sucedida. Tal pode dever-se ao facto de o tempo de reacção (15 minutos) entre o 2,4-dioxopiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo e o 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona não ser suficiente. Assim, provavelmente, formou-se pouco composto pretendido, visto que o primeiro passo mecanístico da reacção de síntese do PHABoc (ver Figura 2.11) corresponde ao ataque do alceno, formado por tautómeria, à 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona. Também o 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona encontrava-se impuro e a mistura reacional tinha muitos componentes, segundo as TLCs correspondentes a esta síntese. Consequentemente, estes fatores dificultam a purificação por coluna. Após a purificação por coluna, todas as frações obtidas com o produto pretendido encontravam-se impuras, segundo os HPLC-MS destas sínteses (ver Anexo 2.8). Posteriormente, misturou-se todas as frações obtidas das sínteses do PHABoc, que por HPLC-MS, tinham o produto pretendido (ver Anexo 2.8) para realizar a *N*-acilação do pirrol (ver Figura 2.12), sendo pouca quantidade (120 mg). Desta forma, não foi possível fazer eficazmente a *N*-acilação do PHABoc porque utilizou-se pouca quantidade de reagente de partida e que possuía impurezas.

2.4. Elucidação estrutural dos compostos sintetizados

Nesta parte da dissertação é apresentada a elucidação estrutural dos compostos sintetizados e a discussão dos resultados da análise espectroscópica relativos aos mesmos.

2.4.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Os resultados experimentais de RMN de ^1H dos derivados da 6-mercaptopurina (série A e B) encontram-se evidenciados nas Tabelas 2.1 e 2.2, onde estão apresentados os desvios químicos correspondentes aos prótons, bem como a multiplicidade dos sinais e respetivas constantes de acoplamento.

A partir dos espectros de RMN de ^1H dos compostos sintetizados é possível identificar os sinais característicos de alguns prótons evidenciados em ambas as séries A e B, nomeadamente:

- Em todas os derivados sintetizados os prótons H(8) e H(2) possuem maiores valores de desvio químico e correspondem aos prótons da estrutura central usada, neste caso, 6-mercaptopurina;
- O próton H(9), correspondente à amina secundária é variável, surgindo em todos os espectros da série D a 13,5 ppm, com a exceção dos compostos **A6** e **A7**.

- Os prótons H(4'), H(5'), H(7') e H(8') apresentam sempre um duplo duplete (com valores de constante de acoplamento de cerca de 12,0; 4,0 Hz e 8,0; 4,0 Hz), porém, tal não acontece para os compostos **A2** e **A5** devido ao facto de a cadeia lateral ser distinta das restantes acetofenonas. Pelos valores das suas constantes de acoplamento, é possível evidenciar a presença do sistema *para*, contudo como estes não se mantêm constantes para os compostos **A1** e **A3**, pode-se considerar estes sinais como multipletos;
- Em todas os derivados sintetizados o próton H(1') aparece no espectro próximo de 5,0 ppm, o que comprova a alquilação do tiol com as acetofenonas usadas;
- Para os compostos **A1** e **A5** surge também a 3,8 ppm o sinal característico do grupo metoxilo na posição *para* e *meta*, respetivamente;
- Após a comparação dos espectros da série A e B, comprova-se a alquilação da amina secundária na posição 9 com o grupo acetilo porque o sinal do H(9) desaparece e surge o sinal do H(9b) próximo de 3,0 ppm;
- A partir dos espectros dos compostos **A2** e **A5** pode-se comprovar que a parte aromática é distinta da restante série, contudo, esta parte também é mantida após a inserção do grupo acetilo na posição 9 da série A, formando os compostos **B2** e **B5** pretendidos.

De um modo geral, a introdução do grupo acetilo na estrutura das purinas utilizadas não afeta a tendência dos valores de desvio químico de cada próton individualmente.

Tabela 2.1 - Resultados experimentais de RMN de ¹H dos derivados da 6-mercaptopurina (série A).

Compostos	OCH ₃	H(1')	H(5')	H(7')	H(4')	H(8')	H(6')	H(9')	H(11')	H(12')	H(8)	H(2)	H(9)	
A1	δ (ppm)	3,83	4,96	7,05	7,05	8,04	8,04	-	-	-	-	8,42	8,53	13,51
	Integ.	3H	2H	2H	2H	2H	2H	-	-	-	-	1H	1H	1H
	Mult.	s	s	dd	dd	dd	dd	-	-	-	-	s	s	s
	J(Hz)	-	-	12.0;4.0	12.0;4.0	8.0;4.0	8.0;4.0	-	-	-	-	-	-	-
A2	δ (ppm)	-	5,18	-	7,66	8,87	7,66	8,04	8,04	8,04	8,16	8,46	8,56	13,57
	Integ.	-	2H	-	2H	1H	2H	3H	3H	3H	1H	1H	1H	1H
	Mult.	-	s	-	m	s	m	m	m	m	dd	s	s	s
	J (Hz)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.0;4.0	-	-	-
A3	δ (ppm)	-	5,05	8,30	8,30	8,37	8,37	-	-	-	-	8,44	8,51	13,55
	Integ.	-	2H	2H	2H	2H	2H	-	-	-	-	1H	1H	1H
	Mult.	-	s	dd	dd	dd	dd	-	-	-	-	s	s	s
	J (Hz)	-	-	12.0;4.0	12.0;4.0	8.0;4.0	8.0;4.0	-	-	-	-	-	-	-
A4	δ (ppm)	-	5,01	7,63	7,63	8,08	8,08	-	-	-	-	8,45	8,53	13,54
	Integ.	-	2H	2H	2H	2H	2H	-	-	-	-	1H	1H	1H
	Mult.	-	s	dd	dd	dd	dd	-	-	-	-	s	s	s
	J (Hz)	-	-	8.0;4.0	8.0;4.0	8.0;4.0	8.0;4.0	-	-	-	-	-	-	-
A5	δ (ppm)	3,80	5,01	-	7,46	7,52	7,66	7,23	-	-	-	8,44	8,54	13,53
	Integ.	3H	2H	-	1H	1H	1H	1H	-	-	-	1H	1H	1H
	Mult.	s	s	-	dd	s	d	d	-	-	-	s	s	s
	J (Hz)	-	-	-	8.0;8.0	-	8.0;4.0	8.0;4.0	-	-	-	-	-	-
A6	δ (ppm)	-	5,02	7,80	7,80	8,02	8,02	-	-	-	-	8,45	8,54	-
	Integ.	-	2H	2H	2H	2H	2H	-	-	-	-	1H	1H	-
	Mult.	-	s	dd	dd	dd	dd	-	-	-	-	s	s	-
	J (Hz)	-	-	8.0;4.0	8.0;4.0	8.0;4.0	8.0;4.0	-	-	-	-	-	-	-
A7	δ (ppm)	-	4,96	7,98	7,98	7,85	7,85	-	-	-	-	8,42	8,52	-
	Integ.	-	2H	2H	2H	2H	2H	-	-	-	-	1H	1H	-
	Mult.	-	s	dd	dd	dd	dd	-	-	-	-	s	s	-
	J (Hz)	-	-	8.0;4.0	8.0;4.0	8.0;4.0	8.0;4.0	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2.2 - Resultados experimentais de RMN de ¹H dos derivados da 6-mercaptopurina (série B).

Compostos	C(9b)	OCH ₃	H(1')	H(5')	H(7')	H(4')	H(8')	H(6')	H(9')	H(11')	H(12')	H(8)	H(2)	
B1	δ (ppm)	3,03	3,92	4,90	7,00	7,00	8,10	8,10	-	-	-	-	8,70	8,72
	Integ.	3H	3H	2H	2H	2H	2H	2H	-	-	-	-	1H	1H
	Mult.	s	s	s	dd	dd	dd	dd	-	-	-	-	s	s
	J (Hz)	-	-	-	12,0;4,0	12,0;4,0	12,0;4,0	12,0;4,0	-	-	-	-	-	-
B2	δ (ppm)	3,01	-	5,04	-	7,62	8,66	7,62	7,92	8,11	7,92	8,01	8,69	8,71
	Integ.	3H	-	2H	-	2H	1H	2H	2H	1H	2H	1H	1H	1H
	Mult.	s	-	s	-	m	s	m	m	dd	m	dd	s	s
	J (Hz)	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0;4,0	-	8,0;4,0	-	-
B4	δ (ppm)	3,01	-	4,85	7,50	7,50	8,03	8,03	-	-	-	-	8,69	8,69
	Integ.	3H	-	2H	2H	2H	2H	2H	-	-	-	-	1H	1H
	Mult.	s	-	s	dd	dd	dd	dd	-	-	-	-	s	s
	J (Hz)	-	-	-	12,0;4,0	12,0;4,0	8,0;4,0	8,0;4,0	-	-	-	-	-	-
B5	δ (ppm)	3,03	3,89	4,92	-	7,45	7,60	7,71	7,19	-	-	-	8,71	8,72
	Integ.	3H	3H	2H	-	1H	1H	1H	1H	-	-	-	1H	1H
	Mult.	s	s	s	-	dd	m	dd	dd	-	-	-	s	s
	J (Hz)	-	-	-	-	8,0	-	8,0;4,0	8,0;4,0	-	-	-	-	-
B6	δ (ppm)	3,01	-	4,84	7,66	7,66	7,95	7,95	-	-	-	-	8,68	8,69
	Integ.	3H	-	2H	2H	2H	2H	2H	-	-	-	-	1H	1H
	Mult.	s	-	s	dd	dd	dd	dd	-	-	-	-	s	s
	J (Hz)	-	-	-	8,0;4,0	8,0;4,0	8,0;4,0	8,0;4,0	-	-	-	-	-	-

Por outro lado, os resultados experimentais de RMN de ^1H da matéria-prima **C** obtida estão apresentados na Tabela 2.3, onde estão destacados os desvios químicos correspondentes aos prótons, bem como a multiplicidade dos sinais e respetivas constantes de acoplamento.

Tabela 2.3 - Resultados experimentais de RMN de ^1H da matéria-prima **C** obtida a partir da adenina.

Composto	H(1')	NH ₂	H(3')	H(4')	H(5')	H(6')	H(7')	H(8)	H(2)
δ (ppm)	5,37	7,22	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32	8,15	8,25
C Integ.	2H	2H	5H	5H	5H	5H	5H	1H	1H
Mult.	s	s	m	m	m	m	m	s	s
J (Hz)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A partir dos resultados experimentais do RMN de ^1H da *N*-alquilação da adenina na posição 9 (**C**), pode-se identificar os sinais característicos de alguns prótons evidenciados em ambas as séries A e B, os quais foram descritos posteriormente, nomeadamente:

- Os prótons H(8) e H(2) possuem valores de desvio químico mais elevados e correspondem aos prótons da estrutura central usada, neste caso, adenina;
- O próton H(1') aparece no espetro próximo de 5,0 ppm, assim como, os prótons H(3') a H(7') na parte aromática correspondente ao grupo fenilo, o que comprova que a *N*-alquilação foi bem sucedida com o brometo de benzilo.

2.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 2D, de ^{13}C e DEPT

De forma a identificar-se e correlacionar os resultados experimentais dos desvios químicos obtidos no RMN de ^1H e ^{13}C , apresentam-se abaixo os espetros homonucleares de ^1H - ^1H (COSY) e heteronucleares ^1H - ^{13}C (HMBC e HSQC) dos compostos **A1** e **A2**, que serviram de base para a atribuição dos sinais correspondentes dos compostos com as acetofenonas com sistema *para* e naftilo, respetivamente.

Na Figura 2.13 está representado o espetro homonuclear de ^1H - ^1H (COSY) do composto **A1**, cujo RMN de ^1H se encontra referenciado ao longo dos eixos, horizontal e vertical, sendo expresso em valores de desvios químicos em ppm.

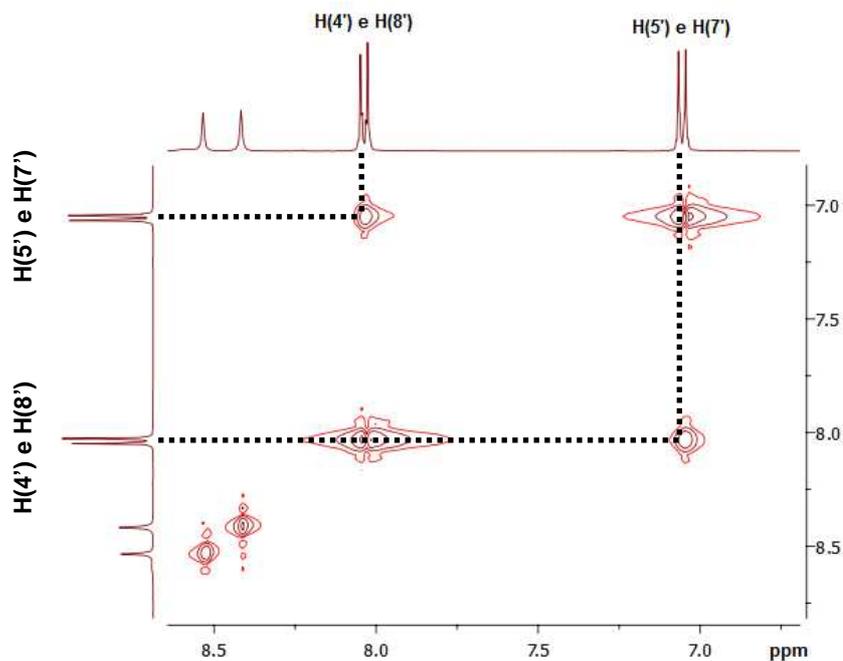


Figura 2.13 - Espectro homonuclear de ^1H - ^1H (COSY) do composto **A1**.

Através da análise da Figura 2.13, identificou-se a correlação entre os prótons do sistema *para* aromático do composto **A1**, mais propriamente, o H(4'), H(5'), H(7') e o H(8').

O espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) representado na Figura 2.14 é relativo ao composto **A1**, sendo traçados os desvios químicos dos átomos de carbono ao longo do eixo vertical e os desvios químicos dos prótons ao longo do eixo horizontal.

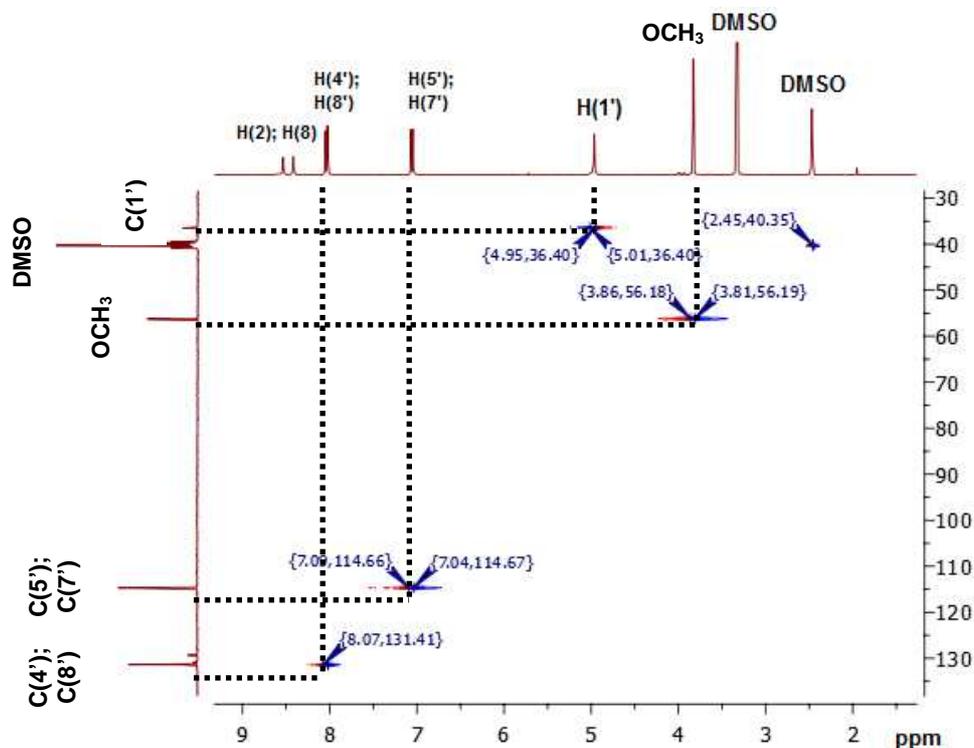


Figura 2.14 - Espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) do composto **A1**.

Este tipo de espectro bidimensional permitiu confirmar que os protões a $\delta 3,83$ ppm estão correlacionados com o carbono a $\delta 56,3$ ppm, assim como o protão a $\delta 4,96$ ppm está correlacionado com o carbono a $\delta 36,5$ ppm, correspondendo ao grupo metoxilo e ao grupo metileno (OCH_3 e $\text{H}(1')$), respetivamente. Da mesma forma, as posições 5' e 7' do sistema *para* foram verificadas pela correlação entre os protões a $\delta 7,05$ ppm e o pico de carbono a $\delta 114,7$ ppm, mas também, a correlação entre os protões a $\delta 8,04$ ppm e os respetivos carbonos a $\delta 131,4$ ppm. Assim, a última correlação referida anteriormente corresponde aos protões e carbonos da posição 4' e 8'.

Através dos dados obtidos no espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) do composto **A1**, apresentado na Figura 2.15, foi possível verificar quais os grupos que estão próximos uns dos outros pela correlação do RMN de ^1H , que se encontra referenciado ao longo do eixo horizontal, e o RMN de ^{13}C , que se encontra ao longo do eixo vertical, dados em desvios químicos (ppm).

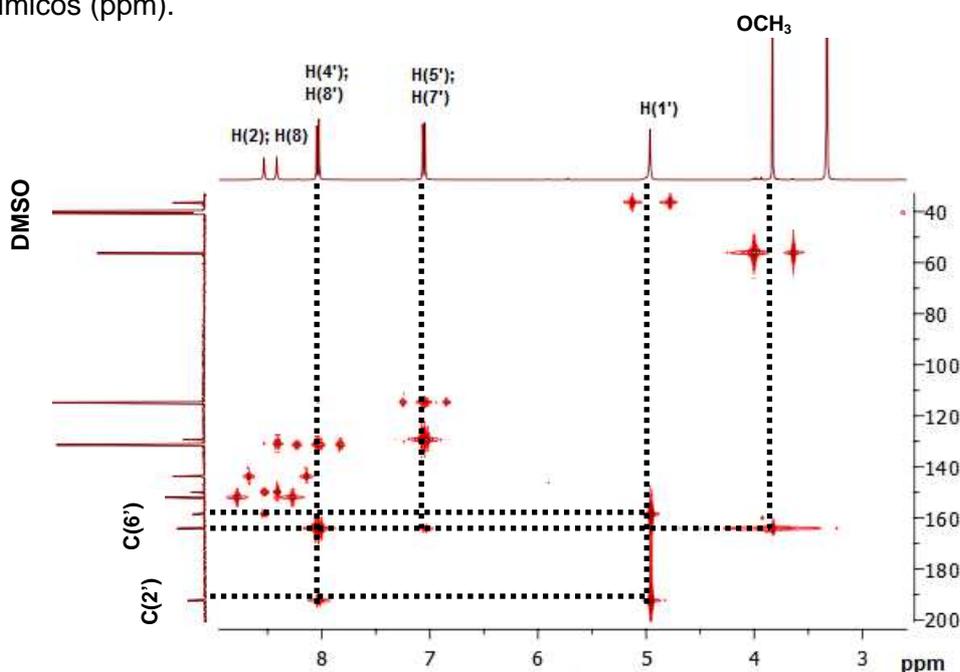


Figura 2.15 - Espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) do composto **A1**.

De acordo com o espectro de HMBC (Figura 2.15) do composto **A1** foi possível concluir que os protões do grupo OCH_3 apresentam correlação com o carbono $\text{C}(6')$. Para além disso, este está correlacionado com os carbonos do sistema *para* $\text{C}(5')$ e $\text{C}(7')$ ($\delta 114,7$ ppm), $\text{C}(4')$ e $\text{C}(8')$ ($\delta 131,4$ ppm), os quais estão associados aos protões correspondentes. Ainda, é possível constatar que o $\text{H}(1')$ está correlacionado com o grupo carbonilo $\text{C}(2')$ e com o carbono quaternário $\text{C}(6)$, próximo de 158 ppm.

De acordo com o espectro de HMBC ampliado (ver Figura 2.16) do composto **A1** foi possível concluir que os protões do sistema aromático apresentam correlação com o carbono $\text{C}(6')$, mas também, com dois carbonos a cerca de 130 ppm. Dada a intensidade

para a correlação do carbono a 129,3 ppm com os prótons H(5') e H(7'), pode-se afirmar que está correlacionado com o carbono quaternário C(3'). Ainda, é possível constatar que o H(8) está correlacionado com este carbono, ao contrário do H(2), logo os carbonos corresponderam a 143,7 e 152,0 ppm, respetivamente, sendo que H(2) também está associado a C(6). O C(5), a 130,9 ppm está associado ao H(8) e ao H(4') e H(8'). Os prótons H(2) e H(8) ainda estão correlacionados com outro carbono quaternário a 149 ppm (C(4)).

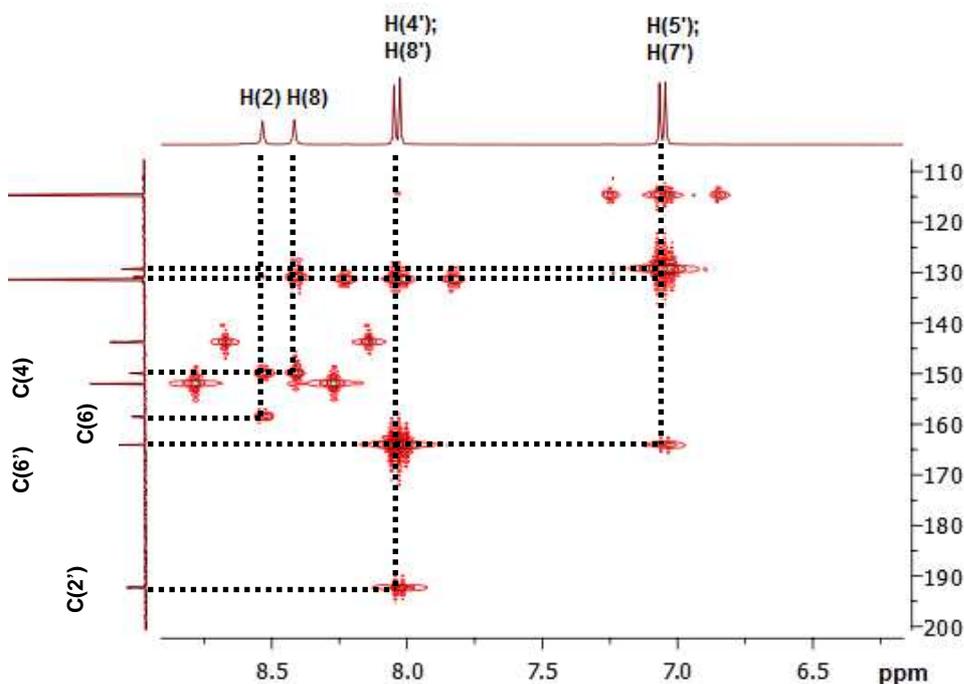


Figura 2.16 - Espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) do composto **A1**, ampliado de 6,0 a 9,0 ppm.

Já para o composto **A2**, a atribuição dos carbonos e prótons da estrutura central foi realizada tendo por base a análise efetuada para o composto **A1**. Posto isto, de seguida é descrita a análise dos espectros bidimensionais do composto **A2**, tendo em conta a cadeia lateral distinta dos restantes derivados.

Na Figura 2.17 está representado o espectro homonuclear de ^1H - ^1H (COSY) do composto **A2**, cujo RMN de ^1H se encontra referenciado ao longo dos eixos, horizontal e vertical, sendo expresso em valores de desvios químicos em ppm.

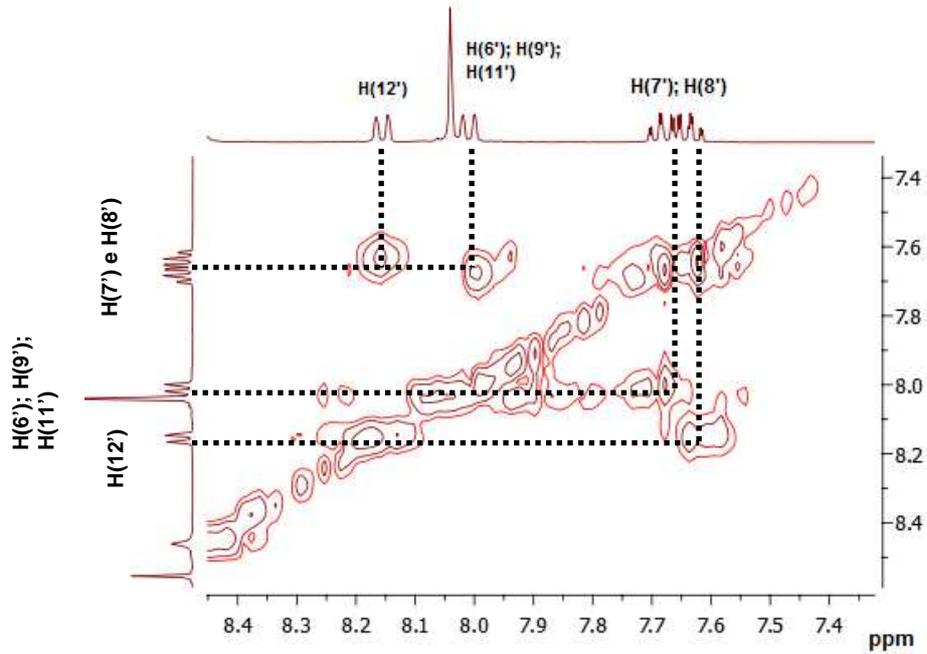


Figura 2.17 - Espectro homonuclear de ^1H - ^1H (COSY) do composto **A2**.

Através da análise da Figura 2.17, a correlação entre os prótons do sistema naftílico aromático do composto **A2**, mais propriamente, o H(6'), H(7'), H(8'), H(9'), H(11') e H(12'), foi identificada.

O espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) relativo ao composto **A2** está representado na Figura 2.18, sendo traçados os desvios químicos dos átomos de carbono ao longo do eixo vertical e os desvios químicos dos prótons ao longo do eixo horizontal.

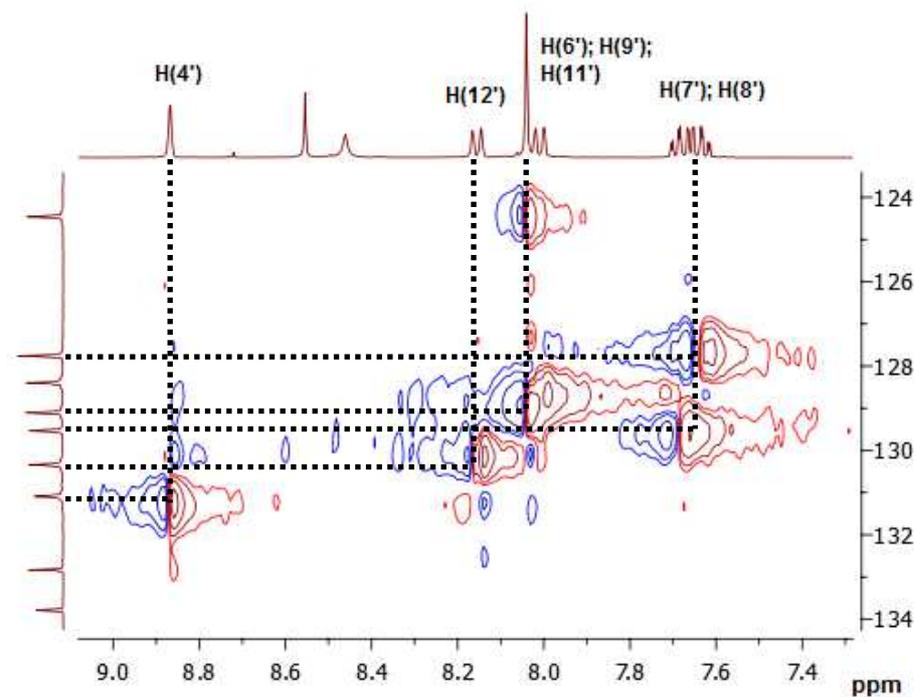


Figura 2.18 - Espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) do composto **A2**.

Este tipo de espectro bidimensional permitiu confirmar que o protão a $\delta 8,87$ ppm está correlacionado com o carbono a $\delta 131,1$ ppm, correspondendo ao protão e carbono (4'). Da mesma forma, confirmou-se que o carbono a 130,3 ppm possui correlação com o protão a $\delta 8,16$ ppm, isto é, C(12') e H(12'). De igual modo confirmou-se que os protões a $\delta 8,04$ ppm estão associados aos carbonos que surgem a $\delta 124,5$ ppm, $\delta 128,4$ ppm e $\delta 129,1$ ppm, ou seja, os C(9'), C(6') e C(11'). Finalmente, os carbonos a 127,8 ppm e 129,5 ppm estão associados ao multiplete próximo de 7,6 ppm, logo correspondem aos protões e carbonos 7' e 8'.

Através dos dados obtidos no espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) do composto **A2**, apresentado na Figura 2.19, foi possível verificar quais os grupos que estão próximos uns dos outros pela correlação do RMN de ^1H , que se encontra referenciado ao longo do eixo horizontal, e o RMN de ^{13}C , que se encontra ao longo do eixo vertical, dados em desvios químicos (ppm).

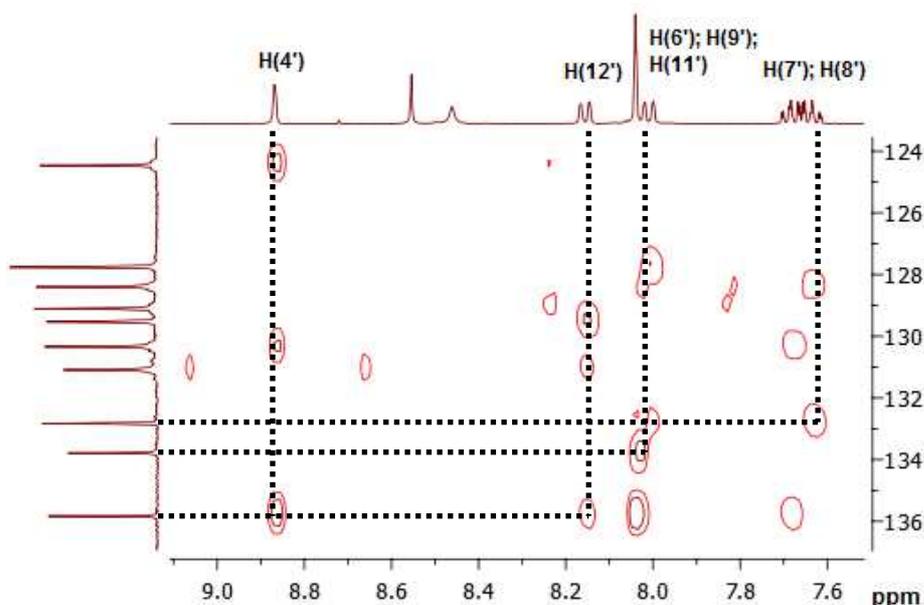


Figura 2.19 - Espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) do composto **A2**.

A partir desta Figura foi possível atribuir corretamente os carbonos quaternários da cadeia lateral através das interações com os carbonos secundários. Logo, o carbono a 135,8 ppm corresponde ao C(3') porque este interage muito com o protão H(4') e também sente o protão H(12'), ao contrário dos restantes carbonos quaternários. O carbono a 133,8 ppm sente muito os protões H(6'), H(9') e H(11'), sendo que o mesmo não acontece para o carbono a 132,8 ppm, que interage mais com os protões H(7') e H(8') do que com os protões supracitados. Desta forma, o C(10') corresponde ao 133,8 ppm e o C(5') a 132,8 ppm.

Na Figura 2.20 está representado o espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) do composto **A4**. Desta forma, foi possível verificar a sobreposição do sinal do C(5) com carbonos aromáticos da cadeia lateral, nomeadamente, o C(4') e o C(8'), pela correlação do RMN de ^1H , que se encontra referenciado ao longo do eixo horizontal, e o RMN de ^{13}C , que se encontra ao longo do eixo vertical, dados em desvios químicos (ppm).

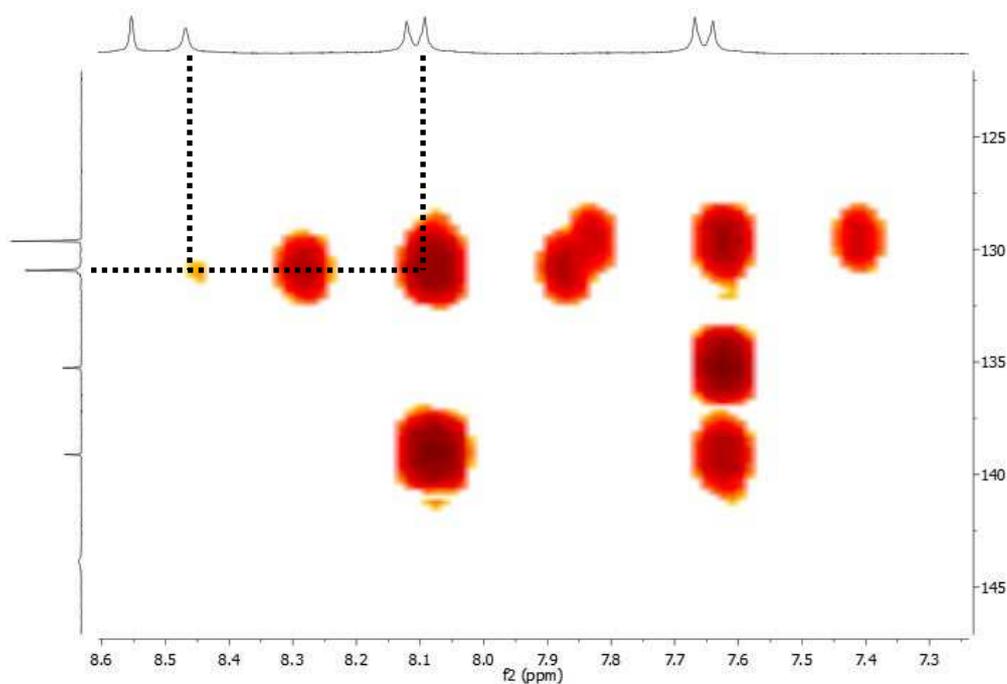


Figura 2.20 - Espectro heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) do composto **A4**.

Assim, após a análise dos espectros bidimensionais, os resultados experimentais de RMN de ^{13}C , evidenciados nas Tabelas 2.4 a 2.6, relativos aos derivados da 6-mercaptapurina da série A e B e da matéria-prima derivada da adenina sintetizada, permitiram confirmar a identidade dos compostos sintetizados, indicando-se os desvios químicos (δ) em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Os resultados referentes ao DEPT foram incluídos nos desvios químicos de ^{13}C , sendo apresentados a sublinhado. De acordo com os resultados experimentais apresentados concluiu-se que:

- Os carbonos C(8) e C(2) do composto **C** sintetizado apresentam desvios químicos de δ 141 e δ 153 ppm, os quais respondem por DEPT.
- O carbono C(1') aparece no espectro entre 45,0 e 50,0 ppm;
- A partir da análise dos resultados de DEPT e de ^{13}C foi possível identificar os sinais respeitantes aos carbonos aromáticos C(2') (δ 138 ppm), C(3') e C(7') (δ 128,0 ppm), C(5') (δ 128,2 ppm), C(4') e C(6') (δ 129 ppm), assim como os carbonos quaternários da purina, nomeadamente, o C(4) (δ 150 ppm), C(5) (δ 119 ppm) e C(6) (δ 157 ppm).

- Ao comparar-se os desvios químicos dos carbonos C(8) e C(2) das duas séries (A e B) com o composto **C**, pode-se constatar que estes coincidem com os da série B e, por sua vez, são distintos na série A (δ 144 ppm e δ 152 ppm), comprovando que a inserção do grupo acetilo ou benzilo afeta os desvios químicos destes carbonos;
- Em relação aos carbonos quaternários, o C(5) aparece no espectro entre 131 e 133 ppm para a série A e B, respetivamente, o qual está inserido no sinal de cerca de 130 ppm, como se pode constatar pela Figura 4.12. Os restantes carbonos quaternários não sofrem grandes variações nos desvios químicos.
- Na série A e B, o carbono C(1') aparece no espectro próximo de 36 ppm, o que comprova a natureza da ligação distinta do composto **C** e a formação da série A;
- Os carbonos C(4') e C(8') e C(5') e C(7') apresentam iguais desvios químicos em todos os compostos, exceto nos compostos **A2**, **A5**, **B2** e **B5** devido ao facto de a cadeia lateral ser distinta das restantes acetofenonas. Logo, é possível evidenciar a presença do sistema *para*, contudo, para estes compostos também é possível atribuir todos os carbonos aromáticos;
- Para os compostos **A1**, **A5**, **B1** e **B5** surge também a 55 ppm o sinal característico do carbono do grupo metoxilo na posição *para* e *meta*, respetivamente;
- Após a comparação dos espectros da série A e B, comprova-se a alquilação da amina secundária na posição 9 com o grupo acetilo porque surge o sinal do C(9b) e o sinal do C(9a), a 25 e 168 ppm, respetivamente;
- Ainda, o C(2') é comum às duas séries e surge a 192 ppm;

Tabela 2.4 - Resultados experimentais de RMN de ¹³C dos derivados da 6-mercaptopurina (série A).

Carbonos/δ (ppm)	Compostos						
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
C(2')	192,3	193,9	193,7	193,2	193,8	193,2	193,7
C(1')	36,5	37,0	37,3	36,9	37,0	<u>36,6</u>	<u>36,5</u>
OCH ₃	56,3	-	-	-	56,1	-	-
C(3')	129,3	135,8	141,5	135,3	137,9	135,4	135,6
C(4')	131,4	131,1	124,6	130,9	113,4	<u>130,8</u>	<u>130,5</u>
C(5')	114,7	132,8	130,4	129,6	160,1	<u>132,4</u>	<u>138,3</u>
C(6')	164,1	128,4	151,9	139,1	120,2	128,1	102,5
C(7')	114,7	129,5	130,4	129,6	130,7	<u>132,4</u>	<u>138,3</u>
C(8')	131,4	127,8	124,6	130,9	121,5	<u>130,8</u>	<u>130,5</u>
C(9')	-	124,5	-	-	-	-	-
C(10')	-	133,8	-	-	-	-	-
C(11')	-	129,1	-	-	-	-	-
C(12')	-	130,3	-	-	-	-	-
C(2)	152,0	152,0	150,7	151,9	151,9	<u>151,7</u>	<u>151,7</u>
C(4)	149,9	150,0	150,0	149,9	149,9	-	153,7
C(5)	130,9	130,3	130,8	130,9	130,7	130,8	130,5
C(6)	158,5	158,3	158,0	158,2	158,2	-	157,2
C(8)	143,7	143,9	143,9	143,9	143,8	-	<u>143,9</u>

Tabela 2.5 - Resultados experimentais de RMN de ^{13}C dos derivados da 6-mercaptopurina (série B).

Carbonos/ δ (ppm)	Compostos				
	B1	B2	B4	B5	B6
C(2')	191,3	192,6	191,8	192,7	192,1
C(1')	<u>36,3</u>	<u>36,6</u>	<u>36,3</u>	<u>36,6</u>	<u>36,3</u>
C(9b)	<u>25,1</u>	<u>25,1</u>	<u>25,1</u>	<u>25,1</u>	<u>25,1</u>
C(9a)	167,5	167,6	167,6	167,6	167,6
OCH ₃	<u>55,6</u>	-	-	<u>55,5</u>	-
C(3')	128,8	135,8	134,2	137,2	134,7
C(4')	<u>130,9</u>	<u>130,4</u>	<u>129,9</u>	<u>129,8</u>	<u>130,0</u>
C(5')	<u>114,0</u>	132,2	<u>129,1</u>	160,7	<u>132,1</u>
C(6')	164,0	<u>129,7</u>	141,1	<u>112,8</u>	128,9
C(7')	<u>114,0</u>	<u>127,0</u>	<u>129,1</u>	<u>120,1</u>	<u>132,1</u>
C(8')	<u>130,9</u>	<u>128,8</u>	<u>129,9</u>	<u>121,1</u>	<u>130,0</u>
C(9')	-	<u>127,9</u>	-	-	-
C(10')	-	132,2	-	-	-
C(11')	-	<u>128,7</u>	-	-	-
C(12')	-	<u>124,1</u>	-	-	-
C(2)	<u>152,8</u>	<u>152,8</u>	<u>152,8</u>	<u>152,8</u>	<u>152,8</u>
C(4)	147,7	147,6	147,7	147,7	147,8
C(5)	132,3	133,0	132,3	132,3	132,4
C(6)	161,2	160,9	160,6	159,9	160,6
C(8)	<u>140,9</u>	140,8	<u>140,2</u>	<u>141,0</u>	<u>141,1</u>

Tabela 2.6 - Resultados experimentais de RMN de ^{13}C do composto C sintetizado.

Carbonos/ δ (ppm)	Composto
	C
C(1')	<u>46,6</u>
C(5)	119,2
C(3')	<u>128,0</u>
C(7')	<u>128,0</u>
C(5')	<u>128,2</u>
C(4')	<u>129,1</u>
C(6')	<u>129,1</u>
C(2')	137,6
C(8)	<u>141,3</u>
C(4)	150,0
C(2)	<u>153,1</u>
C(6)	156,5

2.4.3. Espectroscopia de Massa de Impacto Eletrónico (EM-IE)

As purinas são uma classe de compostos com padrões de fragmentação característicos descritos na literatura no que se refere à sua caracterização estrutural por espectroscopia de massa por impacto electrónico [15]. Nas Figuras 2.21 e 2.22 apresentam-se as principais vias de fragmentação das purinas usadas. Os espectros de massa dos derivados de purinas sintetizados mostram, para além dos picos típicos da estrutura em si, a evidência de fragmentos correspondentes à perda dos substituintes dos compostos sintetizados, seja ele um grupo benzilo ou um grupo acetilo.

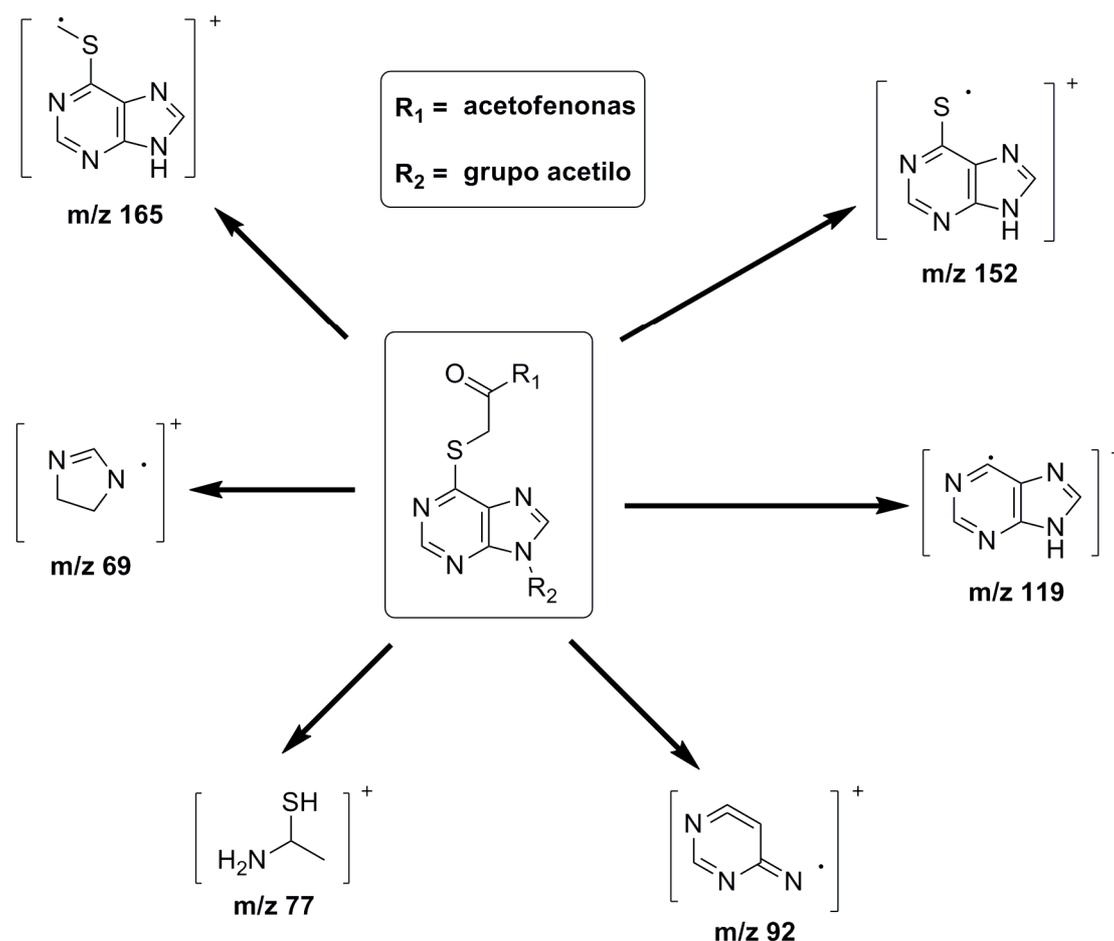


Figura 2.21 - Fragmentação características dos derivados da 6-mercaptapurina.

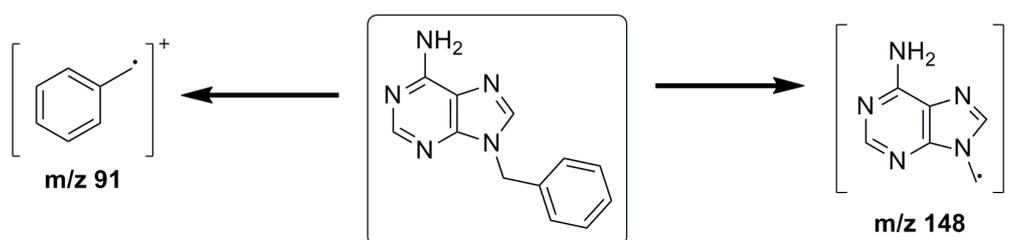


Figura 2.22 - Fragmentação características do composto C sintetizado.

No caso do composto **C** também houve um fragmento de m/z 182 que não se conseguiu atribuir a estrutura correta, o qual pode estar associado a um fragmento de rutura da base púrica e um rearranjo molecular. Ainda, surgem fragmentos nos espetros de massa dos compostos sintetizados que correspondem à quebra da ligação α -carbonilo.

2.5. Avaliação da atividade biológica

A avaliação da atividade biológica dos compostos sintetizados foi realizada no Instituto de Química Médica-CSIC em Madrid. Os resultados experimentais são medidos em termos do IC_{50} . A atividade, em ensaio *in vitro*, obtida para o 2-(4-bromofenil)etanotioato de *S*-9*H*-purin-6-il (26% para uma concentração de 10 μ M para a quinase CDC7, ver Figura 2.23), foi usada como termo de comparação com os compostos sintetizados.

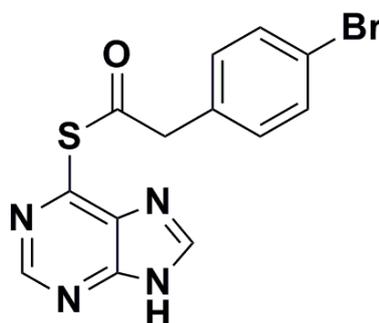


Figura 2.23 - Fórmula de estrutura do composto 2-(4-bromofenil)etanotioato de *S*-9*H*-purin-6-il.

Na Tabela 2.7 estão apresentados os resultados experimentais dos ensaios *in vitro* realizados.

Tabela 2.7 - Resultados experimentais dos ensaios *in vitro* dos compostos sintetizados.

Compostos	IC_{50} CDC7 (μ M)	IC_{50} CK-1 (μ M)	IC_{50} GSK-3 (μ M)
A1	>10 (2,0%)	>10	>10
A2	>10 (30%)	>10	>10
A3	>10 (25%)	>10	>10
A4	>10 (0,33%)	>10	>10
A5	>10 (12%)	>10	>10

Pela análise da Tabela 2.7, pode constatar-se que a posição *para* da cadeia lateral é relevante para a atividade. Quando os compostos apresentam grupos pouco volumosos na posição *para*, como o grupo metoxilo (**A1**) e o cloro (**A4**), há uma grande perda da atividade. Já a inibição da CDC7 por parte do composto **A3**, com a inserção do grupo NO_2 na posição *para*, é quase igual à do 2-(4-bromofenil)etanotioato de *S*-9*H*-purin-6-il. Por sua vez, tendo o

grupo naftilo na cadeia lateral (**A2**) a percentagem de inibição aumenta ligeiramente. Por outro lado, observa-se uma diminuição da atividade quando se adiciona substituintes na posição *meta* da cadeia lateral, nomeadamente, o grupo metoxilo (**A5**). Em relação às proteínas quinases CK-1 e GSK-3, os valores de IC_{50} obtidos permitem concluir que os derivados sintetizados até ao momento não inibem estas enzimas. Os resultados experimentais destes ensaios relativos aos compostos **A7**, **B1**, **B2**, **B4**, **B5**, **B6** e **C** ainda se encontram em aquisição no Instituto de Química Médica-CSIC.

3. Parte experimental

Neste Capítulo são referidos os reagentes e solventes utilizados, a instrumentação a que se recorreu para caracterizar os compostos sintetizados, o procedimento sintético, bem como a caracterização estrutural dos compostos obtidos. A caracterização estrutural dos compostos obtidos é apresentada no Capítulo 6 (ver Anexo 3.1 a 3.13). O estudo do progresso das reações realizadas foi feito por HPLC-MS e/ou cromatografia em camada fina (CCF).

3.1. Reagentes e solventes

Durante a parte da dissertação em Madrid, a 4-acetilpiridina (97%), o 2,4-dioxopiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo, o acetato de amónio ($\geq 98\%$), a trietilamina (Et_3N , $\geq 99\%$), a 4-dimetilaminopiridina (99%), o cloreto de acetilo ($AcCl$, 98%), o 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (97%), o 2-bromo-2'-acetonafona (99%), o 2-bromo-4'-cloroacetofenona (98%), o 2-bromo-3'-metoxiacetofenona (98%), 2-bromo-4'-nitroacetofenona (95%), 2,4'-dibromoacetofenona ($>98,0\%$) e a 4-iodoacetofenona (98%) foram obtidos à Sigma-Aldrich. O bromo (99,6%), de qualidade *para análise*, foi obtido à Acros Organics. A adenina (assay $\geq 99\%$ para HPLC) foi obtida à Fluka Analytical. O brometo de benzilo foi obtido à Fluka (99% assay GC). A 6-mercaptopurina monohidratada ($>98,0\%$) foi adquirido à Tokyo Chemical Industry. O amoníaco (solução aquosa a 30% m/m), o cloreto de sódio ($NaCl$), o hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e o carbonato de potássio (K_2CO_3) foram obtidos à Panreac, enquanto que o sulfato de magnésio ($MgSO_4$) anidro, de qualidade *extra pura*, foi adquirido à Scharlau. As tamises moleculares foram obtidas à Sigma-Aldrich.

O éter etílico ($\geq 99,8\%$) e o diclorometano anidro ($\geq 99,8\%$) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. A *N,N*-dimetilformamida (DMF), o DMF anidro (com tamises moleculares), o etanol, de qualidade *analítica*, o ácido acético glacial, de qualidade *extra pura*, foram adquiridos à Scharlau. O clorofórmio ($CHCl_3$), de qualidade *para análise*, foi adquirido à Merck. A sílica

gel 60 (0,040-0,063 mm), de qualidade *para colunas cromatográficas*, foi obtido à Merck. A areia do mar lavada foi obtida à Quality Chemicals. Na CCF usaram-se placas pré-revestidas de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck) de espessura 0,2 mm. As reações foram controladas por CCF (gele de sílica, DCM:MeOH (10:1); CHCl₃:MeOH (10:1); AcOEt:Hexano (10:1); DCM:EtOH (10:1)). Os cromatogramas obtidos foram revelados por ação da luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda (λ) 254 e/ou 366 nm. O dimetilsulfóxido (DMSO-d₆, com um grau de deuteração igual ou superior a 99,96%) foi adquirido à Euriso-top. O clorofórmio deuterado (CDCl₃, grau de deuteração de 99,96% e 0,03% v/v de Tetrametilsilano - TMS) foi adquirido à Sigma-Aldrich. O hexano, o metanol (MeOH), o acetato de etilo (AcOEt) e o diclorometano (DCM), de qualidade *para HPLC*, foram adquiridos à Lab-Scan *analytical sciences*. Nas extrações líquido-líquido utilizou-se água ultrapura (destilada, 15 M Ω .cm⁻¹).

No período da dissertação que se realizou no Porto, a adenina (99%), o brometo de benzilo (99%), o 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (97%), o 2-(bromoacetil)naftaleno (98%), o 2-bromo-4'-cloroacetofenona (98%), o 2-bromo-3'-metoxiacetofenona (98%), o 2-bromo-4'-nitroacetofenona (95%) e a 4-iodoacetofenona (98%) foram obtidos à Alfa Aesar. O hidreto de sódio (NaH, óleo mineral a 60% m/m), a trietilamina ($\geq 99\%$), 2,4'-dibromoacetofenona ($>98\%$), o bromo, de qualidade *para reagente*, o K₂CO₃ e a 4-(dimetilamino)piridina ($\geq 99\%$) foram obtidos à Sigma-Aldrich. A 6-mercaptapurina monohidratada ($>98,0\%$) foi adquirido à TCI Europa. O anidrido acético foi obtido à Panreac. O MgSO₄ anidro foi obtido à Acofarma. O ácido clorídrico (HCl, 36,5%-38%) foi adquirido à Scharlau, enquanto que o NaHCO₃ foi obtido à Panreac e o sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro, de qualidade *para análise*, foi obtido à Carlo Erba Reagents. O CHCl₃ e o éter de petróleo 40-65 °C, de qualidade *para análise*, Carlo Erba Reagents. A DMF, de qualidade *para reagente*, foi obtida à Scharlau. O DMF anidro (99,8%) e o éter etílico foram obtidos à Sigma-Aldrich. O AcOEt, o DCM e a acetona foram obtidos à LaborSpirit, Lda. O hexano, o CHCl₃ e o MeOH foram adquiridos à Valente & Ribeiro, Lda. A gel de sílica 60 (0,040-0,063 mm), de qualidade *para cromatografia*, foram obtidos à Carlo Erba Reagents. As colunas pré-empacotadas com sílica (Biotage SNAP Ultra Sil 10g) para o equipamento Biotage Isolera Prime foram adquiridas à Biotage. Na CCF usaram-se placas pré-revestidas de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck) de espessura 0,2 mm. As reações foram controladas por CCF (gele de sílica, DCM:MeOH (9:1); Acetona:MeOH (9:1)). Os cromatogramas obtidos foram revelados por ação da luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda (λ) 254 e/ou 366 nm. O clorofórmio-d₁ (CDCl₃, grau de deuteração 99,96% e 0,03% v/v TMS), o metanol-d₄ (MeOD, grau de deuteração de 99,8% e 0,03% v/v de TMS), bem como o DMSO-d₆ (grau de deuteração de 99,96% e 0,03% v/v de TMS) foram adquiridos à Deutero. Nas extrações líquido-líquido utilizou-se água ultrapura (destilada, 15 μ S.cm⁻¹).

3.2. Instrumentação

As pesagens foram efetuadas em balanças *Kern ABS* e *Mettler AE240*. Os compostos foram secos numa estufa de vácuo *Vacuum Oven Mti Corporation*.

A determinação dos pontos de fusão foi realizada através do equipamento *Mettler Toledo* ou *Stuart Scientific* da *Bibby Scientific*. O intervalo de temperatura de medição usado foi 50-250 °C, com uma rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrómetro *Varian Inova-400* ou *Varian Mercury-400* à temperatura ambiente. Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT foram obtidos num aparelho *Bruker Avance III 400*, à temperatura ambiente. Como referência interna usou-se TMS. Nos espectros de RMN de ¹H, registados a 400 MHz, indica-se o desvio químico (δ) em partes por milhão (ppm), o número de prótons, a multiplicidade e a(s) constante(s) de acoplamento. Os espectros de RMN de ¹³C e DEPT foram registados a 100 MHz, sendo os desvios químicos (δ) indicados em partes por milhão (ppm); os dados de DEPT estão incluídos nos valores de ¹³C (valores de δ sublinhados). Os espectros bidimensionais (2D) de COSY foram registados a 400 MHz, enquanto que, os de HBMC e HSQC foram adquiridos a 400 e 100 MHz.

A análise elementar foi efetuada através de um analisador *LECO-932* (*LECO Corporation*).

Os cromatogramas de HPLC-MS foram realizados com o cromatógrafo *Waters* com um detetor de diodos integrados (2998 PDA) e um espectrómetro de massa quadrupolar (3100 *Mass Detector*). A fase móvel usada foi água/acetoneitrilo (gradiente de eluição: 15-95%), durante 5 minutos. O varrimento no UV foi de 230 a 400 nm.

Os espectros de massa (EM) foram obtidos num espectrómetro *Hewlett-Packard 5988A* de impacto electrónico (IE) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela e referidos em m/z (% relativa).

A purificação de alguns compostos foi efetuada através do equipamento *Biotage Isolera Prime*.

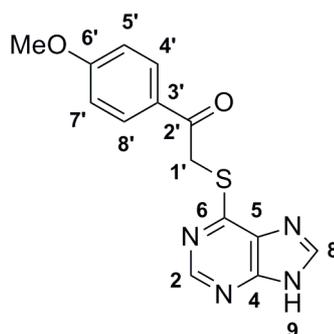
3.3. Síntese de derivados da 6-mercaptopurina

Os derivados pretendidos foram obtidos usando como material de partida a 6-mercaptopurina e uma série de acetofenonas monobromadas (série A). Os procedimentos experimentais foram adaptados da literatura [35,36].

3.3.1. Síntese da 2-((9H-purin-6-il)tio)-1-(4-metoxifenil)etanona (A1)

Num balão de fundo redondo de 100 mL, dissolveu-se a 6-mercaptopurina monohidratada (0,30 g; 1,8 mmol) em 25 mL de DMF e adicionou-se o K_2CO_3 (0,25 g; 1,8 mmol). A reação foi agitada durante 2 horas, à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma solução de 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (0,40 g; 1,7 mmol), em 3 mL de DMF, sob as mesmas condições experimentais, prolongando-se a reação por 22 horas. Após a reação, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em 100 mL de AcOEt. Efetuou-se uma extração líquido-líquido com água (3x100 mL) e secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro. Após filtração e evaporação do AcOEt, obteve-se um sólido amarelo esbranquiçado, o qual foi seco em estufa de vácuo e identificado como o composto **A1** (m = 0,233 g).

Rendimento: 46%; **Ponto de Fusão:** 200-203°C;



RMN de 1H (DMSO): δ = 3,83 (3H, s, OCH_3); 4,96 (2H, s, H(1')); 7,05 (2H, dd, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(5') e H(7')); 8,04 (2H, dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(4') e H(8')); 8,42 (1H, s, H(8)); 8,53 (1H, s, H(2)); 13,51 (1H, s, H(9)).

RMN de ^{13}C (DMSO): δ = 36,5 C(1'); 56,3 OCH_3 ; 114,7 C(5') e C(7'); 129,3 C(3'); 130,9 C(5); 131,4 C(4') e C(8'); 143,7 C(8); 149,9 C(4); 152,0 C(2); 158,5 C(6); 164,1 C(6'); 192,3 C(2').

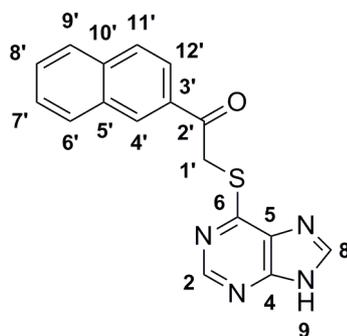
Análise Elementar (C₁₄H₁₂N₄O₂S): Teórico %C 55.99, %H 4.03, %N 18.65, %S 10.68; Experimental %C 55.72, %H 4.08, %N 18.54, %S 10.51.

EM/IE m/z (int.rel.): 300 (M^{+} , 3); 136 (14); 135 (100); 92 (18); 77 (20). **HPLC:** pureza 97,55%.

3.3.2. Síntese da 2-((9H-purin-6-il)tio)-1-(naftaleno-1-il)etanona (A2)

Pesou-se a 6-mercaptopurina monohidratada (0,30 g; 1,8 mmol) para um balão de fundo redondo de 100 mL e dissolveu-se em 25 mL de DMF. Adicionou-se K_2CO_3 (0,25 g; 1,8 mmol) e a reação foi agitada durante 2 horas, à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma solução de 2-bromo-2'-acetonafona (0,44 g; 1,8 mmol), em 3 mL de DMF, sob as mesmas condições experimentais, prolongando-se a reação por 78 horas. Após a reação, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em 100 mL de AcOEt. Efetuou-se uma extração líquido-líquido com água com NaCl (3x100 mL) e secou-se a fase orgânica com $MgSO_4$ anidro. Após filtração e evaporação do AcOEt, obteve-se um sólido amarelo que foi designado como o composto **A2** ($m = 0,159$ g).

Rendimento: 28%; **Ponto de Fusão:** 202-204 °C;



RMN de 1H (DMSO): $\delta =$ 5,18 (2H, s, H(1')); 7,66 (2H, m, H(7'), H(8')); 8,04 (3H, m, H(6'), H(9'), H(11')); 8,16 (1H, dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(12')); 8,46 (1H, s, H(8)); 8,56 (1H, s, H(2)); 8.87 (1H, s, H(4')); 13,57 (1H, s, H(9)).

RMN de ^{13}C (DMSO): $\delta =$ 37,0 C(1'); 124,5 C(9'); 127,8 C(8'); 128,4 C(6'); 129,1 C(11'); 129,5 C(7'); 130,3 C(5) e C(12'); 131,1 C(4'); 132,8 C(5'); 133,8 C(10'); 135,8 C(3'); 143,9 C(8); 150,0 C(4); 152,0 C(2); 158,3 C(6); 193,9 C(2').

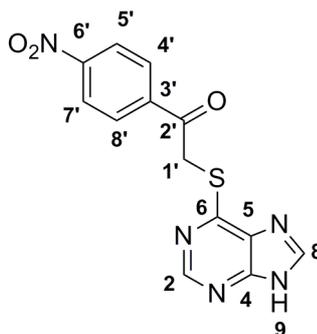
Análise Elementar (C₁₇H₁₂N₄OS): Teórico %C 63.73, %H 3.78, %N 17.49, %S 10.01; Experimental %C 63.56, %H 4.02, %N 17.21, %S 9.89.

EM/IE m/z (int.rel.): 320 (M^+ , 18); 288 (11); 200 (16); 171 (15); 165 (12); 156 (19); 155 (100); 152 (45); 128 (23); 127 (92); 126 (22); 119 (17); 85 (10); 77 (11); 71 (18); 70 (11); 64 (22); 57 (17). **HPLC:** pureza 95,51%.

3.3.3. Síntese da 2-((9H-purin-6-il)tio)-1-(4-nitrofenil)etanona (A3)

Dissolveu-se a 6-mercaptopurina monohidratada (0,31 g; 1,8 mmol) em 25 mL de DMF num balão de fundo redondo de 100 mL e adicionou-se K_2CO_3 (0,24 g; 1,8 mmol). A reação foi colocada em agitação durante 2 horas, à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma solução de 2-bromo-4'-nitroacetofenona (0,43 g; 1,8 mmol), em 3 mL de DMF, sob as mesmas condições experimentais, prolongando-se a reação por 20 horas. Após a reação, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em 100 mL de AcOEt. Efetuou-se uma extração líquido-líquido com água com NaCl (3x100 mL) e secou-se a fase orgânica com $MgSO_4$ anidro. Após filtração e evaporação do AcOEt, procedeu-se à purificação por coluna (CC) usando como eluente, DCM:MeOH (20:1). Desta forma, obteve-se um sólido castanho escuro, que após secagem na estufa de vácuo, foi designado como composto **A3** (m = 0,143 g).

Rendimento: 25%; **Ponto de Fusão:** 153-155 °C;



RMN de 1H (DMSO): δ = 5,05 (2H, s, H(1')); 8,30 (2H, dd, J_1 = 12.0 Hz, J_2 = 4.0 Hz, H(5'), H(7')); 8,37 (2H, dd, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 4.0 Hz, H(4'), H(8')); 8,44 (1H, s, H(8)); 8,51 (1H, s, H(2)); 13,55 (1H, s, H(9)).

RMN de ^{13}C (DMSO): δ = 37,3 C(1'); 124,6 C(4') e C(8'); 130,4 C(5') e C(7'); 130,8 C(5); 141,5 C(3'); 143,9 C(8); 150,0 C(4); 150,7 C(2); 151,9 C(6'); 158,0 C(6); 193,7 C(2').

Análise Elementar (C₁₃H₉N₅O₃S): Teórico %C 49.52, %H 2.88, %N 22.21, %S 10.17;

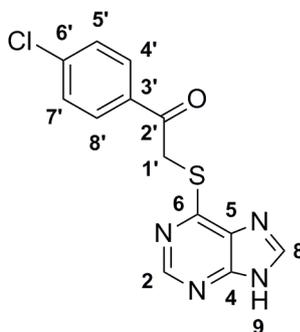
Experimental %C 49.24, %H 3.02, %N 22.36, %S 9.98.

EM/IE m/z (int.rel.): 315 (M^{+} , 10); 283 (53); 282 (11); 255 (18); 165 (100); 161 (30); 152 (64); 150 (50); 125 (10); 120 (11); 119 (32); 106 (21); 104 (33); 92 (19); 76 (26); 65 (11); 64 (11). **HPLC:** pureza >99%.

3.3.4. Síntese da 2-((9H-purin-6-il)tio)-1-(4-clorofenil)etanona (A4)

Num balão de fundo redondo de 100 mL, dissolveu-se a 6-mercaptopurina monohidratada (0,30 g; 1,8 mmol) em 25 mL de DMF. Posteriormente, adicionou-se o K_2CO_3 (0,25 g; 1,8 mmol) e a reação foi colocada em agitação durante 2 horas, à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma solução de 2-bromo-4'-cloroacetofenona (0,41 g; 1,8 mmol), em 3 mL de DMF, sob as mesmas condições experimentais, prolongando-se a reação por 18 horas. Após a reação, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em 100 mL de AcOEt. Efetuou-se uma extração líquido-líquido com água com NaCl (3x100 mL) e secou-se a fase orgânica com $MgSO_4$ anidro. Após filtração e evaporação do AcOEt, obteve-se o composto de cor amarela que foi identificado como **A4** ($m = 0,363$ g).

Rendimento: 66%; **Ponto de Fusão:** 204-207 °C;



RMN de 1H (DMSO): $\delta = 5,01$ (2H, s, H(1')); 7,63 (2H, dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(5') e H(7')); 8,08 (2H, dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(4') e H(8')); 8,45 (1H, s, H(8)); 8,53 (1H, s, H(2)); 13,54 (1H, s, H(9)).

RMN de ^{13}C (DMSO): $\delta = 36,9$ C(1'); 129,6 C(5') e C(7'); 130,9 C(4') e C(8') e C(5); 135,3 C(3'); 139,1 C(6'); 143,9 C(8); 149,9 C(4); 151,9 C(2); 158,2 C(6); 193,2 C(2').

Análise Elementar (C₁₃H₉ClN₄OS): Teórico %C 51.23, %H 2.98, %N 18.38, %S 10.52; Experimental %C 50.97, %H 2.75, %N 18.09, %S 10.32.

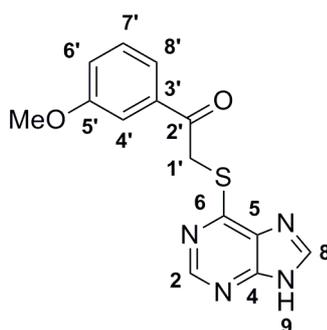
EM/IE m/z (int.rel.): 304 (M^{+} , 9); 165 (39); 152 (11); 141 (33); 139 (100); 119 (16); 113 (12); 111 (39); 75 (18). **HPLC:** pureza 99,08%.

3.3.5. Síntese da 2-((9H-purin-6-il)tio)-1-(3-metoxifenil)etanona (A5)

Colocou-se a 6-mercaptopurina monohidratada (0,30 g; 1,8 mmol) num balão de fundo redondo de 100 mL e adicionou-se 25 mL de DMF. De seguida, adicionou-se K_2CO_3

(0,25 g; 1,8 mmol) e a reação foi colocada em agitação durante 2 horas, à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma solução de 2-bromo-3'-metoxiacetofenona (0,40 g; 1,8 mmol), em 3 mL de DMF, sob as mesmas condições experimentais, prolongando-se a reação por 20 horas. Após a reação, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em 100 mL de AcOEt. Efetuou-se uma extração líquido-líquido com água com NaCl (3x100 mL) e secou-se a fase orgânica com MgSO₄ anidro. Após filtração e evaporação do AcOEt, obteve-se o composto de cor castanha e que foi identificado como **A5** (m = 0,297 g).

Rendimento: 55%; **Ponto de Fusão:** 188-193 °C;



RMN de ¹H (DMSO): δ= 3,80 (3H, s, OCH₃); 5,01 (2H, s, H(1')); 7,23 (1H, dd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 4.0 Hz, H(6')); 7,46 (1H, dd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 8.0 Hz, H(7')); 7,52 (1H, s, H(4')); 7,66 (1H, dd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 4.0 Hz, H(8')); 8,44 (1H, s, H(8)); 8,54 (1H, s, H(2)); 13,53 (1H, s, H(9)).

RMN de ¹³C (DMSO): δ= 37,0 C(1'); 56,1 OCH₃; 113,4 C(4'); 120,2 C(6'); 121,5 C(8'); 130,7 C(7') e C(5); 137,9 C(3'); 143,8 C(8); 149,9 C(4); 151,9 C(2); 158,2 C(6); 160,1 C(5'); 193,8 C(2').

Análise Elementar (C₁₄H₁₂N₄O₂S): Teórico %C 55.99, %H 4.03, %N 18.65, %S 10.68; Experimental %C 55.87, %H 4.00, %N 18.52, %S 10.39.

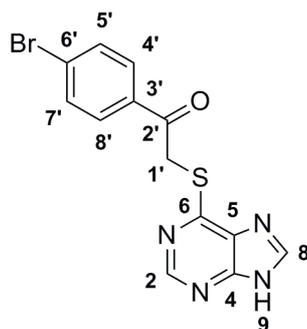
EM/IE m/z (int.rel.): 300 (M⁺, 22); 165 (20); 136 (16); 135 (100); 107 (30); 92 (18); 77 (20); 69 (19). **HPLC:** pureza 98,37%.

3.3.6. Síntese da 2-((9H-purin-6-il)tio)-1-(4-bromofenil)etanona (A6)

Num balão de fundo redondo de 100 mL, dissolveu-se a 6-mercaptopurina monohidratada (0,30 g; 1,8 mmol) em 25 mL de DMF e adicionou-se o K₂CO₃ (0,24 g; 1,8 mmol). A reação foi colocada em agitação durante 2 horas, à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma solução de 2,4'-dibromoacetofenona (0,49 g; 1,8 mmol), em 3 mL de DMF, sob as mesmas condições experimentais, prolongando-se a reação por 26 horas.

Após a reação, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em 100 mL de AcOEt. Efetuou-se uma extração líquido-líquido com água (3x100 mL) e secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro. Após filtração e evaporação do AcOEt, obteve-se um sólido de cor amarela que foi seco em estufa de vácuo, sendo identificado como o composto **A6** (m = 0,261 g).

Rendimento: 42%; **Ponto de Fusão:** 207-212 °C;



RMN de ¹H (DMSO): δ= 5,02 (2H, s, H(1')); 7,80 (2H, dd, J1 = 8.0 Hz, J2 = 4.0 Hz, H(5') e H(7')); 8,02 (2H, dd, J1 = 8.0 Hz, J2 = 4.0 Hz, H(4') e H(8')); 8,45 (1H, s, H(8)); 8,54 (1H, s, H(2)).

RMN de ¹³C (DMSO): δ= 36,6 C(1'); 128,1 C(6'); 130,8 C(4') e C(8') e C(5); 132,4 C(5') e C(7'); 135,4 C(3'); 151,7 C(2); 193,3 C(2').

EMIE m/z (int.rel.): 481 (18); 349 (M⁺, 3); 348 (14); 319 (21); 304 (15); 292 (12); 213 (37); 187 (14); 185 (55); 183 (43); 165 (40); 157 (12); 155 (11); 135 (12); 131 (10); 120 (13); 119 (12); 92 (15); 91 (100); 69 (20).

3.3.7. Síntese da 2-((9H-purin-6-il)tio)-1-(4-iodofenil)etanona (**A7**)

Para a obtenção do composto **A7** foi necessário sintetizar a matéria-prima 2-bromo-4'-iodoacetofenona. Os procedimentos experimentais foram adaptados da literatura [37,38].

3.3.7.1. Síntese da 2-bromo-4'-iodoacetofenona

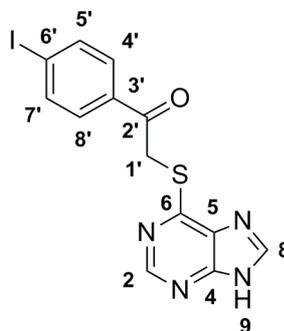
Dissolveu-se a 4-iodoacetofenona (0,51 g; 2,1 mmol) e o bromo (0,10 mL; 2,0 mmol) em 9 mL de CHCl₃, mantendo-se a reação com agitação à temperatura ambiente, durante 2 horas. Após a reação, adicionou-se 50 mL de CHCl₃ e efetuou-se uma extração líquido-líquido com NaHCO₃ 5 % (m/m) (2x50 mL). De seguida, secou-se a fase orgânica com

Na₂SO₄ anidro. Após filtração e evaporação do solvente, lavou-se com éter de petróleo para obter-se um sólido castanho claro.

3.3.7.2. Síntese da 2-((9H-purin-6-il)tio)-1-(4-iodofenil)etanona (A7)

Dissolveu-se a 6-mercaptopurina monohidratada em 25 mL de DMF (0,31 g; 1,8 mmol) e adicionou-se K₂CO₃ (0,25 g; 1,8 mmol). Colocou-se a reação em agitação durante 2 horas, à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma solução de 2-bromo-4'-iodoacetofenona (0,57 g; 1,8 mmol), em 3 mL de DMF, sob as mesmas condições experimentais, prolongando-se a reação por 17 horas. Após a reação, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em 100 mL de AcOEt. Efetuou-se uma extração líquido-líquido com água (3x100 mL) e secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro. Após filtração e evaporação do AcOEt, procedeu-se à purificação por CC do produto usando como eluente DCM:MeOH (9:1), através do equipamento Biotage Isolera Prime. As frações que continham o produto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. Surgiu, assim, um sólido laranja que foi colocado a secar em estufa de vácuo e identificado como o composto **A7** (m = 61,8 mg).

Rendimento: 9,0%; **Ponto de Fusão:** 192-194 °C;



RMN de ¹H (DMSO): δ= 4,96 (2H, s, H(1')); 7,85 (2H, dd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 4.0 Hz, H(4') e H(8')); 7,98 (2H, dd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 4.0 Hz, H(5') e H(7')); 8,42 (1H, s, H(8)); 8,52 (1H, s, H(2)).

RMN de ¹³C (DMSO): δ= 36,5 C(1'); 102,5 C(6'); 130,5 C(4') e C(8') e C(5); 135,6 C(3'); 138,3 C(5') e C(7'); 143,9 C(8); 151,7 C(2); 153,7 C(4); 157,2 C(6); 193,7 C(2').

EMIE m/z (int.rel.): 396 (M⁺, 21); 231 (100); 203 (20); 165 (55).

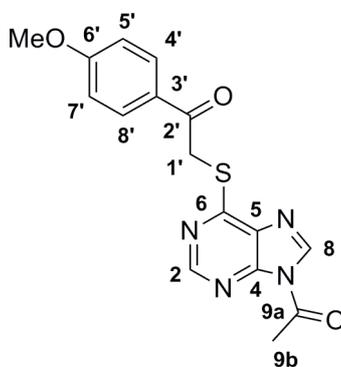
3.3.8. N-acilação dos compostos da série A

Assim, após a obtenção dos compostos da série A, procedeu-se à respetiva N-acilação, conforme um procedimento descrito na literatura [39].

3.3.8.1. Síntese do 2-((9-acetil-9H-purin-6-il)tio)-1-(4-metoxifenil)etanona (B1)

Pesou-se o composto **A1** (0,20 g; 0,66 mmol) para um balão de fundo redondo de 100 mL e colocou-se sob atmosfera inerte. Dissolveu-se o composto em 3,3 mL de DMF anidro e adicionou-se anidrido acético (126 μ L; 1,3 mmol) e Et₃N (186 μ L; 1,3 mmol), respetivamente. Colocou-se a reação com agitação e à temperatura ambiente durante 3 horas. Após a reação, adicionou-se 50 mL de DCM, efetuou-se uma extração líquido-líquido com HCl 1 M (1x50 mL) e com uma solução saturada de NaHCO₃ (3x50 mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Posteriormente, efetuou-se uma lavagem do produto usando como solvente uma mistura de éter etílico:MeOH e colocou-se o composto obtido a secar na estufa de vácuo. Desta forma, obteve-se um sólido castanho claro que foi designado como o composto **B1** (m = 86,1 mg).

Rendimento: 38%; **Ponto de Fusão:** 187-190 °C;



RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 3,03 (3H, s, H(9b)); 3,92 (3H, s, OCH₃); 4,90 (2H, s, H(1')); 7,00 (2H, dd, J_1 = 12.0 Hz, J_2 = 4.0 Hz, H(5') e H(7')); 8,10 (2H, dd, J_1 = 12.0 Hz, J_2 = 4.0 Hz, H(4') e H(8')); 8,70 (1H, s, H(8)); 8,72 (1H, s, H(2)).

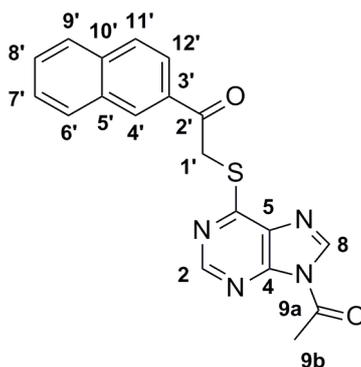
RMN de ¹³C (CDCl₃): δ = 25,1 C(9b); 36,3 C(1'); 55,6 OCH₃; 114,0 C(5') e C(7'); 128,8 C(3'); 130,9 C(4') e C(8'); 132,3 C(5); 140,9 C(8); 147,7 C(4); 152,8 C(2); 161,2 C(6); 164,0 C(6'); 167,5 C(9a); 191,3 C(2').

EMIE m/z (int.rel.): 342 (M⁺, 23); 136 (34); 135 (100); 121 (15); 106 (15).

3.3.8.2. Síntese do 2-((9-acetil-9H-purin-6-il)tio)-1-(naftaleno-1-il)etanona (B2)

Adicionou-se o composto **A2** (0,20 g; 0,62 mmol) num balão de fundo redondo de 100 mL e colocou-se sob atmosfera inerte. Dissolveu-se o composto em 3,2 mL de DMF anidro e adicionou-se anidrido acético (118 μ L; 1,2 mmol) e Et₃N (174 μ L; 1,2 mmol), respetivamente. Colocou-se a reação com agitação e à temperatura ambiente durante 3 horas. Após a reação, adicionou-se 50 mL de DCM, efetuou-se uma extração líquido-líquido com HCl 1 M (1x50 mL) e com uma solução saturada de NaHCO₃ (3x50 mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. A fase orgânica foi colocada a secar na estufa de vácuo, surgindo um sólido laranja escuro, que foi identificado como composto **B2** (m = 0,161 g).

Rendimento: 72%; **Ponto de Fusão:** 193-195 °C;



RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 3,01 (3H, s, H(9b)); 5,04 (2H, s, H(1')); 7,62 (2H, m, H(7'), H(8')); 7,92 (2H, m, H(6'), H(11')); 8,01 (1H, dd, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 4.0 Hz, H(12')); 8,11 (1H, dd, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 4.0 Hz, H(9')); 8,66 (1H, s, H(4')); 8,69 (1H, s, H(8)); 8,71 (1H, s, H(2)).

RMN de ¹³C (CDCl₃): δ = 25,1 C(9b); 36,6 C(1'); 124,1 C(12'); 127,0 C(7'); 127,9 C(9'); 128,7 C(11'); 128,8 C(8'); 129,7 C(6'); 130,4 C(4'); 132,2 C(5') e C(10'); 133,0 C(5); 135,8 C(3'); 140,8 C(8); 147,6 C(4); 152,8 C(2); 160,9 C(6); 167,6 C(9a); 192,6 C(2').

EM/IE m/z (int.rel.): 362 (M⁺, 19); 326 (13); 324 (13); 246 (33); 245 (13); 156 (31); 155 (100); 128 (15); 127 (77); 126 (11); 69 (23); 57 (12).

3.3.8.3. Síntese da 2-((9-acetil-9H-purin-6-il)tio)-1-(4-nitrofenil)etanona (B3)

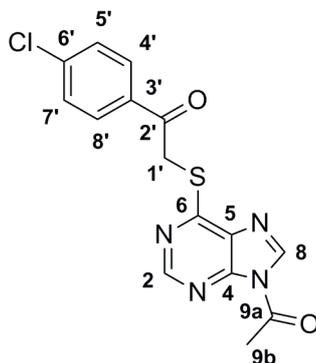
Para um balão de fundo redondo de 100 mL, pesou-se o composto **A3** (0,20 g; 0,63 mmol) e colocou-se sob atmosfera inerte. Dissolveu-se o composto em 3,1 mL de DMF

anidro e adicionou-se anidrido acético (118 μL ; 1,2 mmol) e Et_3N (174 μL ; 1,2 mmol), respetivamente. Colocou-se a reação com agitação e à temperatura ambiente durante 3 horas. Após a reação, adicionou-se 50 mL de DCM, efetuou-se uma extração líquido-líquido com HCl 1 M (1x50 mL) e com uma solução de NaHCO_3 5 % (m/m) (3x50 mL). Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Finalmente, efetuou-se uma lavagem usando como solvente uma mistura de éter etílico:MeOH e obteve-se um sólido castanho escuro. Colocou-se o produto obtido a secar na estufa de vácuo. Após a análise espectroscópica verificou-se que o composto formado não corresponde ao pretendido.

3.3.8.4. Síntese da 2-((9-acetil-9H-purin-6-il)tio)-1-(4-clorofenil)etanona (B4)

O composto **A4** (0,20 g; 0,66 mmol) foi pesado para um balão de fundo redondo de 100 mL e colocou-se sob atmosfera inerte. Dissolveu-se o composto em 3,3 mL de DMF anidro e adicionou-se anidrido acético (124 μL ; 1,3 mmol) e Et_3N (183 μL ; 1,3 mmol), respetivamente. Colocou-se a reação com agitação e à temperatura ambiente durante 3 horas. Após a reação, adicionou-se 50 mL de DCM, efetuou-se uma extração líquido-líquido com HCl 1 M (1x50 mL) e com uma solução saturada de NaHCO_3 (3x50 mL). Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Por fim, efetuou-se uma lavagem usando como solvente uma mistura de éter etílico:MeOH, surgindo um sólido laranja que foi colocado a secar na estufa de vácuo. O composto foi identificado como **B4** (m = 91,7 mg).

Rendimento: 40%; **Ponto de Fusão:** 180-184 $^\circ\text{C}$;



RMN de ^1H (CDCl_3): δ = 3,01 (3H, s, H(9b)); 4,85 (2H, s, H(1')); 7,50 (2H, dd, J_1 = 12.0 Hz, J_2 = 4.0 Hz, H(5') e H(7')); 8,03 (2H, dd, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 4.0 Hz, H(4') e H(8')); 8,69 (2H, s, H(2) e H(8)).

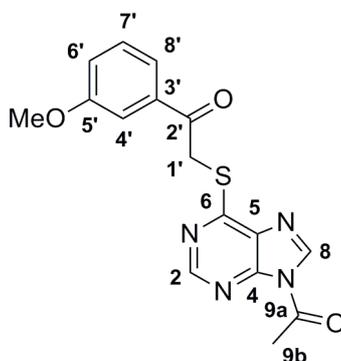
RMN de ^{13}C (CDCl_3): δ = 25,1 C(9b); 36,3 C(1'); 129,1 C(5') e C(7'); 129,9 C(4') e C(8'); 132,3 C(5); 134,2 C(3'); 140,2 C(8); 141,1 C(6'); 147,7 C(4); 152,8 C(2); 160,6 C(6); 167,6 C(9a); 191,8 C(2').

EMIE m/z (*int.rel.*): 346 ($\text{M}^{+\bullet}$, 10); 306 (12); 304 (33); 207 (14); 165 (73); 152 (16); 141 (72); 140 (18); 139 (100); 125 (13); 119 (19); 113 (18); 111 (59); 75 (22).

3.3.8.5. Síntese da 2-((9-acetil-9H-purin-6-il)tio)-1-(3-metoxifenil)etanona (B5)

Pesou-se o composto **A5** (0,20 g; 0,66 mmol) para um balão de fundo redondo de 100 mL e colocou-se sob atmosfera inerte. Dissolveu-se o composto em 3,3 mL de DMF anidro e adicionou-se anidrido acético (126 μL ; 1,3 mmol) e Et_3N (186 μL ; 1,3 mmol), respetivamente. Colocou-se a reação com agitação e à temperatura ambiente durante 3 horas. Após a reação, adicionou-se 50 mL de DCM, efetuou-se uma extração líquido-líquido com HCl 1 M (1x50 mL) e com uma solução saturada de NaHCO_3 (3x50 mL). Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obteve-se, desta forma, um sólido laranja escuro, o qual foi seco na estufa de vácuo. O composto obtido foi designado de **B5** ($m = 0,196$ g).

Rendimento: 87%; **Ponto de Fusão:** 159-162 $^\circ\text{C}$;



RMN de ^1H (CDCl_3): δ = 3,03 (3H, s, H(9b)); 3,89 (3H, s, OCH_3); 4,92 (2H, s, H(1')); 7,19 (1H, *dd*, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(6')); 7,45 (1H, *dd*, $J = 8.0$ Hz, H(7')); 7,60 (1H, *m*, H(4')); 7,71 (1H, *d*, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(8')); 8,71 (1H, s, H(8)); 8,72 (1H, s, H(2)).

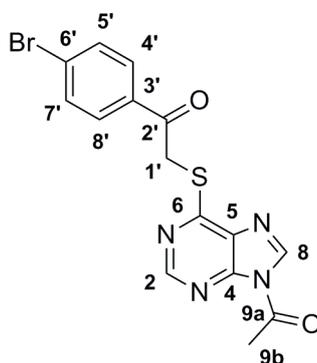
RMN de ^{13}C (CDCl_3): δ = 25,1 C(9b); 36,6 C(1'); 55,5 OCH_3 ; 112,8 C(6'); 120,1 C(7'); 121,1 C(8'); 129,8 C(4'); 132,3 C(5); 137,2 C(3'); 141,0 C(8); 147,7 C(4); 152,8 C(2); 159,9 C(6); 160,7 C(5'); 167,6 C(9a); 192,7 C(2').

EM/IE m/z (int.rel.): 342 (M^{+} , 13); 300 (16); 165 (22); 152 (17); 136 (26); 135 (100); 119 (13); 107 (50); 92 (35); 77 (39); 64 (13).

3.3.8.6. Síntese da 2-((9-acetil-9H-purin-6-il)tio)-1-(4-bromofenil)etanona (B6)

Para um balão de fundo redondo de 100 mL pesou-se o composto **A6** (0,20 g; 0,57 mmol) e colocou-se sob atmosfera inerte. Dissolveu-se o composto em 2,9 mL de DMF anidro e adicionou-se anidrido acético (108 μ L; 1,1 mmol) e Et_3N (160 μ L; 1,1 mmol), respetivamente. Colocou-se a reação com agitação constante e à temperatura ambiente durante 3 horas. Após a reação, adicionou-se 50 mL de DCM, efetuou-se uma extração líquido-líquido com HCl 1 M (1x50 mL), com uma solução saturada de NaHCO_3 (1x50 mL) e com uma solução de NaHCO_3 5 % (m/m) (2x50 mL). Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o DCM. Por último, efetuou-se uma lavagem usando como solvente uma mistura de éter etílico:MeOH, obtendo-se um sólido laranja que deixou-se a secar na estufa de vácuo. Este foi identificado como o composto **B6** ($m = 53,8$ mg).

Rendimento: 24%; **Ponto de Fusão:** 176-178 °C;



RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 3,01$ (3H, s, H(9b)); 4,84 (2H, s, H(1')); 7,66 (2H, dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(5') e H(7')); 7,95 (2H, dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H(4') e H(8')); 8,68 (1H, s, H(8)); 8,69 (1H, s, H(2)).

RMN de ^{13}C (CDCl_3): $\delta = 25,1$ C(9b); 36,3 C(1'); 128,9 C(6'); 130,0 C(4') e C(8'); 132,1 C(5') e C(7'); 132,4 C(5); 134,7 C(3'); 141,1 C(8); 147,8 C(4); 152,8 C(2); 160,6 C(6); 167,6 C(9a); 192,1 C(2').

EM/IE m/z (int.rel.): 392 (M^{+} , 18); 390 (17); 350 (30); 348 (29); 207 (18); 186 (12); 185 (98); 184 (12); 183 (100); 165 (71); 157 (33); 155 (35); 118 (21).

3.3.8.7. Síntese da 2-((9-acetil-9H-purin-6-il)tio)-1-(4-iodofenil)etanona (B7)

Pesou-se o composto **A7** (50 mg; 0,13 mmol) para um balão de fundo redondo de 100 mL e colocou-se sob atmosfera inerte. Dissolveu-se o composto em 0,63 mL de DMF anidro e adicionou-se anidrido acético (24 μ L; 0,25 mmol) e Et₃N (35 μ L; 0,25 mmol), respetivamente. Colocou-se a reação com agitação e à temperatura ambiente durante 2 horas. Após a reação, adicionou-se 50 mL de DCM, efetuou-se uma extração líquido-líquido com HCl 1 M (1x50 mL) e com uma solução de NaHCO₃ 5 % (m/m) (3x50 mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Por último, efetuou-se uma lavagem usando como solvente uma mistura de éter etílico:MeOH, obtendo-se um sólido laranja que deixou-se a secar na estufa de vácuo. Após a análise espectroscópica verificou-se que o composto formado não corresponde ao pretendido.

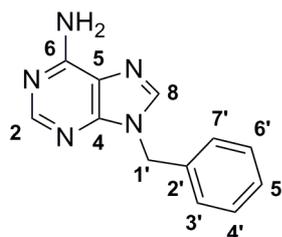
3.4. Síntese de derivados da adenina

A *N*-alquilação da adenina na posição 9 com o brometo de benzilo (**C**) foi realizada usando duas bases (K₂CO₃ ou NaH). Por sua vez, a *N*-alquilação da amina primária da *N*-9H-benziladenina foi efetuada utilizando NaH e duas acetofenonas monobromadas (série D). Os procedimentos sintéticos da *N*-alquilação da posição 9 [35,36,40] e posição 6 [31,32,40] foram adaptados da literatura, respetivamente.

3.4.1. Síntese do *N*-9H-benziladenina (**C**)

Num balão de 100 mL, dissolveu-se a adenina (0,50 g; 3,7 mmol) em 10 mL de DMF anidro, colocando-se a solução com agitação e sob atmosfera inerte a 0 °C. Adicionou-se, NaH (0,16 g; 4,0 mmol) e deixou-se a reação à temperatura ambiente e com agitação durante 1 hora. De seguida, adicionou-se o brometo de benzilo (0,88 mL; 7,4 mmol), prolongando-se a reação por 4 horas. Após as 4 horas, evaporou-se o solvente e lavou-se o sólido obtido com água e éter etílico, sucessivamente. Dissolveu-se o sólido em metanol, secou-se com Na₂SO₄, filtrou-se e, por último, evaporou-se o metanol. Com esta metodologia, obteve-se um sólido branco que foi identificado como o composto **C** (m = 0,196 g). O composto **C** foi colocado a secar na estufa de vácuo.

Rendimento: 24%; **Ponto de Fusão:** 235-239°C;



RMN de ^1H (DMSO): δ = 5,37 (2H, s, H(1')); 7,22 (2H, s, NH_2); 7,32 (5H, m, H(3'), H(4'), H(5'), H(6'), H(7')); 8,15 (1H, s, H(8)); 8,25 (1H, s, H(2)).

RMN de ^{13}C (DMSO): δ = 46,6 C(1'); 119,2 C(5); 128,0 C(3') e C(7'); 128,2 C(5'); 129,1 C(4') e C(6'); 137,6 C(2'); 141,3 C(8); 150,0 C(4); 153,1 C(2); 156,5 C(6).

EMIE m/z (int.rel.): 226 (21); 225 (M^{+} , 100); 224 (94); 182 (28); 148 (18); 91 (87).

3.4.2. Síntese do 2-((9-benzil-9H-purin-6-il)amino)-1-(4-clorofenil)etanona (D1)

Num balão de 100 mL, dissolveu-se a *N*-9H-benziladenina (0,20 g; 0,89 mmol) em 2,4 mL de DMF anidro, colocando-se a solução com agitação e sob atmosfera inerte a 0 °C. Adicionou-se, NaH (38 mg; 0,95 mmol) e deixou-se a reação à temperatura ambiente e com agitação durante 1 hora. De seguida, a 2-bromo-4'-cloroacetofenona (0,42 g; 1,8 mmol) foi adicionada, prolongando-se a reação por 4 horas. Após as 4 horas, evaporou-se o solvente, diluiu-se a mistura reacional em 50 mL de DCM e efetuou-se uma extração líquido-líquido com água (2x50 mL). Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o DCM. O óleo obtido foi purificado por CC utilizando como eluente DCM com 5 % de MeOH. Lavou-se o óleo com éter etílico:MeOH e obteve-se um sólido laranja. Após a análise espectroscópica verificou-se que o composto formado não corresponde ao pretendido.

3.4.3. Síntese do 2-((9-benzil-9H-purin-6-il)amino)-1-(naftaleno-2-il)etanona (D2)

Por sua vez, dissolveu-se a *N*-9H-benziladenina (0,20 g; 0,89 mmol) em 2,4 mL de DMF anidro num balão de 100 mL, colocando-se a solução com agitação e sob atmosfera inerte a 0 °C. Adicionou-se, NaH (36 mg; 0,90 mmol) e deixou-se a reação à temperatura ambiente e com agitação constante durante 1 hora. De seguida, o 2-(bromoacetil)naftaleno (0,45 g; 1,8 mmol) foi adicionado, prolongando-se a reação por 23 horas. Após as 23 horas, evaporou-se o solvente, adicionou-se 50 mL de DCM e efetuou-se uma extração líquido-

líquido com água (2x50 mL). Após a separação, secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o DCM. O óleo obtido foi purificado por CC automática utilizando como eluente DCM:MeOH (9:1). As frações que continham o produto pretendido foram reunidas e o solvente evaporado. Por último, efetuou-se uma recristalização usando como solvente uma mistura de éter etílico:DCM, obtendo-se um sólido branco. Após a análise espectroscópica verificou-se que o composto formado não corresponde ao pretendido.

3.5. Síntese de derivados do *terc*-butil 4-oxo-2-(piridin-4-il)-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[3,2-*c*]piridina-5(4*H*)-carboxilato (PHABoc)

Para a síntese do *terc*-butil 4-oxo-2-(piridin-4-il)-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[3,2-*c*]piridina-5(4*H*)-carboxilato (PHABoc) e do seu derivado *N*-acetilado foi necessário proceder, em primeiro lugar, à síntese da matéria-prima 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona. Para tal, usou-se um procedimento descrito na literatura [37].

3.5.1. Síntese da 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona

De forma a efetuar a síntese da 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona, dissolveu-se a 4-acetilpiridina (0,91 mL; 8,25 mmol) em 36,1 mL de CHCl₃ e transferiu-se para um balão de 50 mL. Colocou-se o balão num banho de gelo, a 0 °C, com agitação constante. Depois juntou-se, lentamente, uma solução de bromo (0,42 mL; 8,25 mmol) dissolvido em 15,5 mL de CHCl₃ através de um funil de adição. Após a adição, procedeu-se ao aquecimento da reação a refluxo, com agitação, durante 2 horas. Seguidamente, a reação foi colocada à temperatura ambiente e com agitação durante 8 horas. Filtrou-se o produto obtido sob pressão reduzida e lavou-se o composto obtido com éter etílico frio, obtendo-se um sólido amarelo. De forma a otimizar a reação procedeu-se à repetição desta síntese, em diferentes condições experimentais, as quais estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Condições experimentais das repetições da síntese da α -bromação da 4-acetilpiridina.

Reação	Tempo de reação (horas)	Solvente	Procedimento experimental
2	4	CHCl ₃	Ver 3.5.1
3	4	CHCl ₃	Ver 3.5.1
4	4	AcOH	Igual a 3.5.1, solução a refluxo
5	2	AcOH	Igual a 3.5.1, solução a refluxo

3.5.2. Síntese do *tert*-butil 4-oxo-2-(piridin-4-il)-6,7-dihidro-1*H*-pirrolo[3,2-*c*]piridina-5(4*H*)-carboxilato (PHABoc)

Efetuu-se esta síntese através um procedimento descrito na literatura [28]. Num balão de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se 2,4-dioxopiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (0,25 g; 1,2 mmol) e o 2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona (0,18 g; 0,90 mmol). Dissolveu-se os compostos em 12 mL de etanol e colocou-se a reação à temperatura ambiente e com agitação. Decorridos 15 minutos, foi adicionado à mistura reacional acetato de amónio (0,27 g; 3,5 mmol). A reação decorreu durante 16 horas à temperatura ambiente e com agitação.

Após a reação, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em AcOEt. Extrauiu-se a fase orgânica com hidróxido de sódio (0,5 M) e extrauiu-se a fase aquosa com AcOEt (5x50 mL). As fases orgânicas foram reunidas, evaporadas e desidratadas com MgSO₄ anidro. O composto final obtido foi purificado por CC, usando como eluente DCM:EtOH (10:1). A reação foi repetida várias vezes para ter a quantidade de composto suficiente para a realização da síntese seguinte.

3.5.3. *N*-acilação do PHABoc

Efetuu-se esta síntese através um procedimento descrito na literatura [41]. Transferiu-se para um balão de fundo redondo de 100 mL o PHABoc (0,12 g; 0,38 mmol) e dissolveu-se em 25,5 mL de DCM anidro. Colocou-se a reação em atmosfera inerte e adicionou-se AcCl (420 µL; 5,9 mmol) com agitação e Et₃N (820 µL; 5,9 mmol), gota a gota. Após a adição de Et₃N, juntou-se à reação DMAP (3,8 mg; 0,031 mmol). Após a adição da DMAP, deixou-se a reação à temperatura ambiente e com agitação durante 108 horas e, a seguir, 9 horas em refluxo com agitação. Após a reação, evaporou-se o solvente, diluiu-se em 20 mL de éter etílico, efetuou-se uma extração líquido-líquido com NaHCO₃ (2x10 mL) e água (1x20 mL), sucessivamente, secando-se a fase orgânica com MgSO₄ anidro. Finalmente, filtrou-se, evaporou-se o solvente e purificou-se por CC, utilizando como eluente AcOEt:Hexano (10:1).

4. Considerações finais e perspetivas futuras

Neste trabalho, foram sintetizados derivados da 6-mercaptopurina por alquilação do tiol (série A) e, subsequente processo de *N*-acilação na posição 9 (série B) com sucesso. No caso da síntese dos compostos da série B, foram usadas duas metodologias sintéticas, sendo a reação que envolveu o anidrido acético e Et₃N a que permitiu obter os derivados referidos. Os compostos sintetizados foram identificados por técnicas de espectroscopia de RMN 1D (¹H, ¹³C e DEPT) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), por EM/IE e/ou HPLC-MS e por determinação do ponto de fusão.

Ao longo do projeto foi também obtido um derivado da adenina por uma reação de *N*-alquilação da adenina na posição 9 com o brometo de benzilo (composto **C**). Contudo, os processos de síntese conducentes aos derivados *N*-alquilados na posição 6 (série D) com a 2-bromo-4'-cloroacetofenona (**D1**) e o 2-(bromoacetil)naftaleno (**D2**) não foram bem sucedidos.

A síntese de derivados do PHABoc, tendo em conta a estratégia sintética aplicada, não foi efetiva porque não se obteve quantidade suficiente do derivado para se poder efetuar as alterações estruturais preconizadas. Para além disso, a presença da matéria-prima inicial (2-bromo-1-(piridin-4-il)etanona) dificultou os processos de purificação por CC dos produtos finais.

Finalmente, procedeu-se à avaliação da atividade biológica em relação à CDC7, CK-1 e GSK-3 dos compostos sintetizados, medida em termos do IC₅₀, através de ensaios *in vitro*. A atividade obtida para o 2-(4-bromofenil)etanotioato de *S*-9*H*-purin-6-il (26% para uma concentração de 10 μM) para a quinase CDC7 foi usada como termo de comparação relativamente à atividade apresentada pelos restantes compostos sintetizados. Pela análise dos resultados obtidos para a série A, pode-se concluir que a inibição da CDC7 é influenciada pelo tipo de grupos substituintes: aumenta com a inserção de grupos volumosos na posição *para* da cadeia lateral e diminui quando se inclui na estrutura base substituintes na posição *meta* da cadeia lateral. Os ensaios preliminares efetuados até à data não revelaram uma ação inibitória relevante para as proteínas quinases CK-1 e GSK-3. A atividade biológica relativa à série B e ao composto **C** ainda se encontra em aquisição. Do que foi referido conclui-se que a 2-((9*H*-purin-6-il)tio)-1-(naftaleno-1-il)etanona (**A2**) pode ser considerada um composto líder, o qual após otimização pode levar ao desenvolvimento de um inibidor potente e seletivo da proteína quinase CDC7.

Como perspetivas futuras, refere-se que se pretende obter os derivados da adenina e, por sua vez, do PHABoc por vias sintéticas alternativas com o intuito de desenhar derivados para efetuar o incremento da lipofilicidade do último composto. Também se considera

importante aumentar o número de derivados da série A para se poder entender o efeito do tipo de substituinte e posições mais relevantes para o incremento da atividade biológica, como por exemplo, a posição 8 e 9. Ainda, deseja-se realizar a síntese de uma biblioteca de compostos mais consistente que permitirá, num futuro próximo, o estabelecimento de relações estrutura-atividade e, conseqüentemente, a melhoria da eficácia deste tipo de derivados em relação às proteínas quinases, nomeadamente, a CDC7. Estes tipos de estudos poderão ainda ser complementados com a realização de estudos de química computacional, nomeadamente, de modelação molecular.

5. Referências

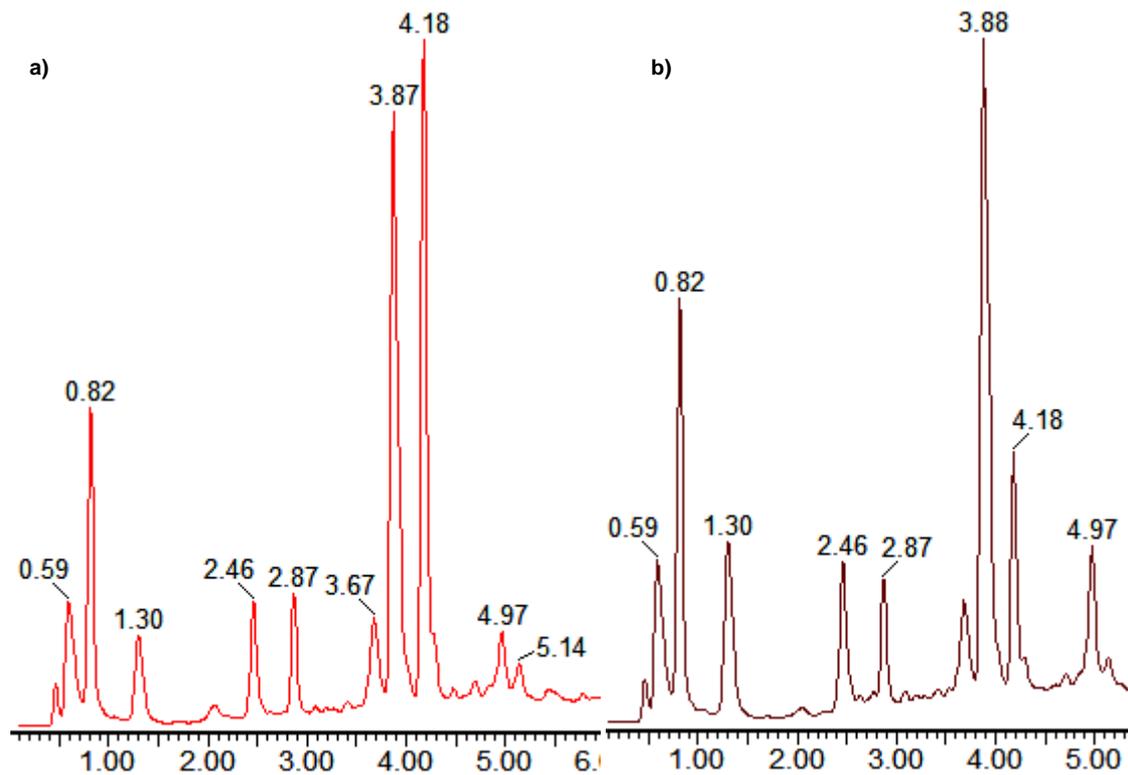
- [1] G. Hargus, M. Ehrlich, A.-L. Hallmann, T. Kuhlmann, *Acta. Neuropathol.* **2014**, 127, 151.
- [2] J. L. Guo, V. M. Y. Lee, *Nat. Med.* **2014**, 20, 130.
- [3] M. Cozzolino, M. T. Carri, *Prog. Neurobiol.* **2012**, 97, 54.
- [4] V. Palomo, D. I. Perez, C. Gil, A. Martinez, *Curr. Med. Chem.* **2011**, 18, 3028.
- [5] F. Pagnini, *Int. J. Psychol.* **2013**, 48, 194.
- [6] A. M. Blokhuis, Ewout J. N. Groen, M. Koppers, L. H. van den Berg, R. J. Pasterkamp, *Acta. Neuropathol.* **2013**, 125, 777.
- [7] E. B. Lee, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, 13, 38.
- [8] A. Gianforcaro, M. J. Hamadeh, *CNS Neurosci. Ther.* **2014**, 20, 101.
- [9] B. C. Cheah, S. Vucic, A. V. Krishnan, M. C. Kiernan, *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 1942.
- [10] A. Ido, H. Fukuyama, M. Urushitani, *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12, 6980.
- [11] W. Robberecht, T. Philips, *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, 14, 248.
- [12] K. A. Hanson, S. H. Kim, R. S. Tibbetts, *WIREs RNA* **2012**, 3, 265.
- [13] R. Meamar, M. H. Nasr-Esfahani, S. A. Mousavi, K. Basiri, *J. Clin. Neurosci.* **2013**, 20, 1659.
- [14] G. M. Thomsen, G. Gowing, S. Svendsen, C. N. Svendsen, *Exp. Neurol.* **2014**, 262, 127.
- [15] S. A. Laufer, D. M. Domeyer, T. R. F. Scior, W. Albrecht, D. R. J. Hauser, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 710.
- [16] D. I. Perez, C. Gil, A. Martinez, *Med. Res. Rev.* **2011**, 31, 924.
- [17] A. Martinez, C. Gil, D. I. Perez, *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2011**, 2011, 1.
- [18] I. G. Salado, M. Redondo, M. L. Bello, C. Perez, N. F. Liachko, B. C. Kraemer, L. Miguel, M. Lecourtois, C. Gil, A. Martinez, D. I. Perez, *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 2755.

- [19] S. Hughes, F. Elustondo, A. Di Fonzo, F. G. Leroux, , A. C. Wong, A. P. Snijders, S. J. Matthews, P. Cherepanov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 1101.
- [20] R. Swords, D. Mahalingam, M. O'Dwyer, C. Santocanale, K. Kelly, J. Carew, F. Giles, *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 33.
- [21] N. F. Liachko, M. J. McMillan, C. R. Guthrie, T. D. Bird, J. B. Leverenz, B. C. Kraemer, *Ann. Neurol.* **2013**, *74*, 39.
- [22] A. Ermoli, A. Bargiotti, M. G. Brasca, A. Ciavolella, N. Colombo, G. Fachin, A. Isacchi, M. Menichincheri, A. Molinari, A. Montagnoli, A. Pillan, S. Rainoldi, F. R. Sirtori, F. Sola, S. Thieffine, M. Tibolla, B. Valsasina, D. Volpi, C. Santocanale, E. Vanotti, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4380.
- [23] M. Menichincheri, C. Albanese, C. Alli, D. Ballinari, A. Bargiotti, M. Caldarelli, A. Ciavolella, A. Cirila, M. Colombo, F. Colotta, V. Croci, R. D'Alessio, M. D'Anello, A. Ermoli, F. Fiorentini, B. Forte, A. Galvani, P. Giordano, A. Isacchi, K. Martina, A. Molinari, J. K. Moll, A. Montagnoli, P. Orsini, F. Orzi, E. Pesenti, A. Pillan, F. Roletto, A. Scolaro, M. Tatò, M. Tibolla, B. Valsasina, M. Varasi, P. Vianello, D. Volpi, C. Santocanale, E. Vanotti, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7296.
- [24] M. Menichincheri, A. Bargiotti, J. Berthelsen, J. A. Bertrand, R. Bossi, A. Ciavolella, A. Cirila, C. Cristiani, V. Croci, R. D'Alessio, M. Fasolini, F. Fiorentini, B. Forte, A. Isacchi, K. Martina, A. Molinari, A. Montagnoli, P. Orsini, F. Orzi, E. Pesenti, D. Pezzetta, A. Pillan, I. Poggesi, F. Roletto, A. Scolaro, M. Tatò, M. Tibolla, B. Valsasina, M. Varasi, D. Volpi, C. Santocanale, E. Vanotti, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 293.
- [25] E. S. Koltun, A. L. Tshako, D. S. Brown, N. Aay, A. Arcalas, V. Chan, H. Du, S. Engst, K. Ferguson, M. Franzini, A. Galan, C. R. Holst, P. Huang, B. Kane, M. H. Kim, J. Li, D. Markby, M. Mohan, K. Noson, A. Plonowski, S. J. Richards, S. Robertson, K. Shaw, G. Stott, T. J. Stout, J. Young, P. Yu, C. A. Zaharia, W. Zhang, P. Zhou, J. M. Nuss, W. Xu, P. C. Kearney, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3727.
- [26] C. Zhao, C. Tovar, X. Yin, Q. Xu, I. T. Todorov, L. T. Vassilev, L. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 319.
- [27] C. M. Shafer, M. Lindvall, C. Bellamacina, T. G. Gesner, A. Yabannavar, W. Jia, S. Lin, A. Walter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4482.

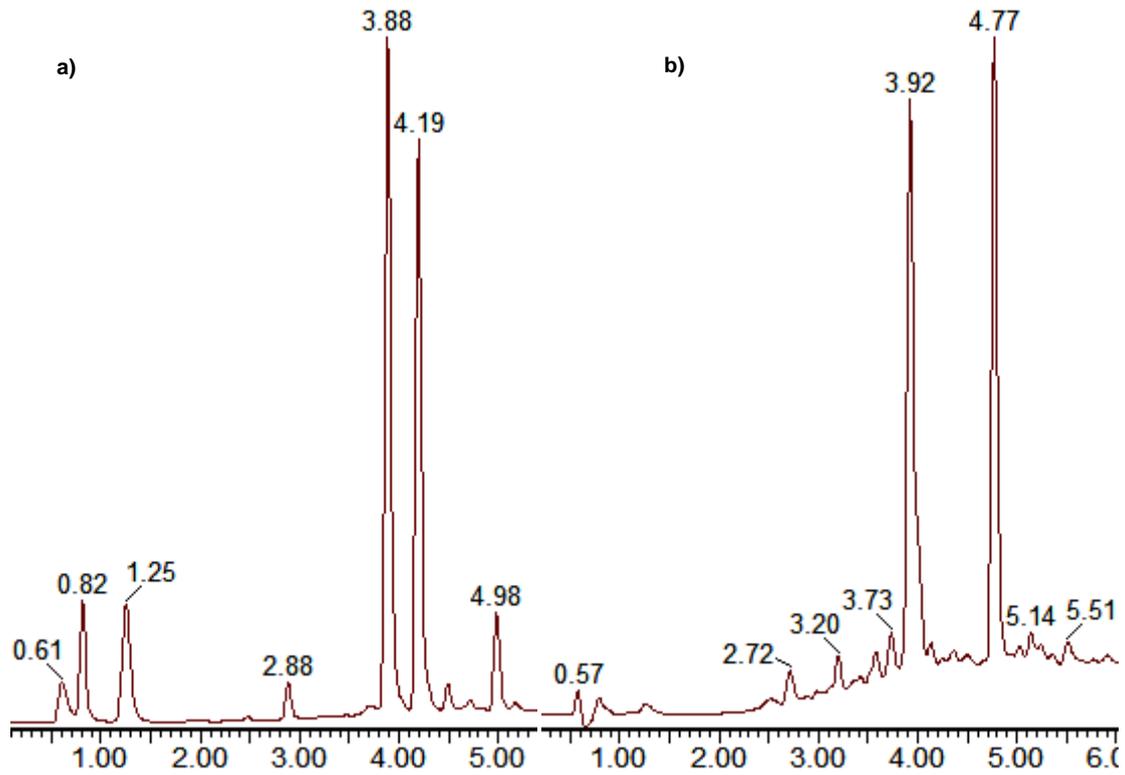
- [28] E. Vanotti, R. Amici, A. Bargiotti, J. Berthelsen, R. Bosotti, A. Ciavolella, A. Cirila, C. Cristiani, R. D'Alessio, B. Forte, A. Isacchi, K. Martina, M. Menichincheri, A. Molinari, A. Montagnoli, P. Orsini, A. Pillan, F. Roletto, A. Scolaro, M. Tibolla, B. Valsasina, M. Varasi, D. Volpi, C. Santocanale, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 487.
- [29] J. McMurry, *Organic Chemistry*, 7th ed., Thomson-Brooks/Cole, **2008**.
- [30] P. Vollhardt, N. Schore, *Organic Chemistry: Structure and Function*, 6th ed., W. H. Freeman and Company, Nova Iorque, **2013**.
- [31] K. Ghosh, T. Sen, R. Fröhlich, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7022.
- [32] K. Ghosh, T. Sen, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 10.3762/bjoc.6.44.
- [33] V. I. Petrov, A. A. Ozerov, M. S. Novikov, C. Pannecouque, J. Balzarini, E. De Clercq, *Chem. Heterocyc. Compd.* **2003**, *39*, 1218.
- [34] P. Y. Bruice, *Organic Chemistry*, 4th ed., Pearson University, **2006**.
- [35] J. Relguero, P. Goya, A. Martínez, I. Rozas, *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 919.
- [36] C. Lambertucci, I. Antonini, M. Buccioni, D. Dal Ben, D. D. Kachare, R. Volpini, K.-N. Klotz, G. Cristalli, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2812.
- [37] D. I. P. Fernández, *Enfermedad de alzheimer [alfa]-halometilcetonas (HMKs) síntesis y estudio de nuevos inhibidores ATP no competitivos de GSK-3 β* , Tese de Doutoramento, Universidade Autónoma de Madrid, Espanha, **2005**.
- [38] D. Secci, B. Bizzarri, A. Bolasco, S. Carradori, M. D'Ascenzio, D. Rivanera, E. Mari, L. Polletta, A. Zicari, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 246.
- [39] N. Masai et al, *Process for producing 2,6-dihalogenopurine*, PCT Int. Appl., 2002081472, **2002**.
- [40] M. Koenemann et al, *Macrocyclic nitrogen compounds and their use in optical storage media and org.semiconductors*, PCT Int. Appl., 2008052814, **2008**.
- [41] D. M. Hodgson, M. W. P. Bebbington, P. Willis, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3787.

6. Anexos

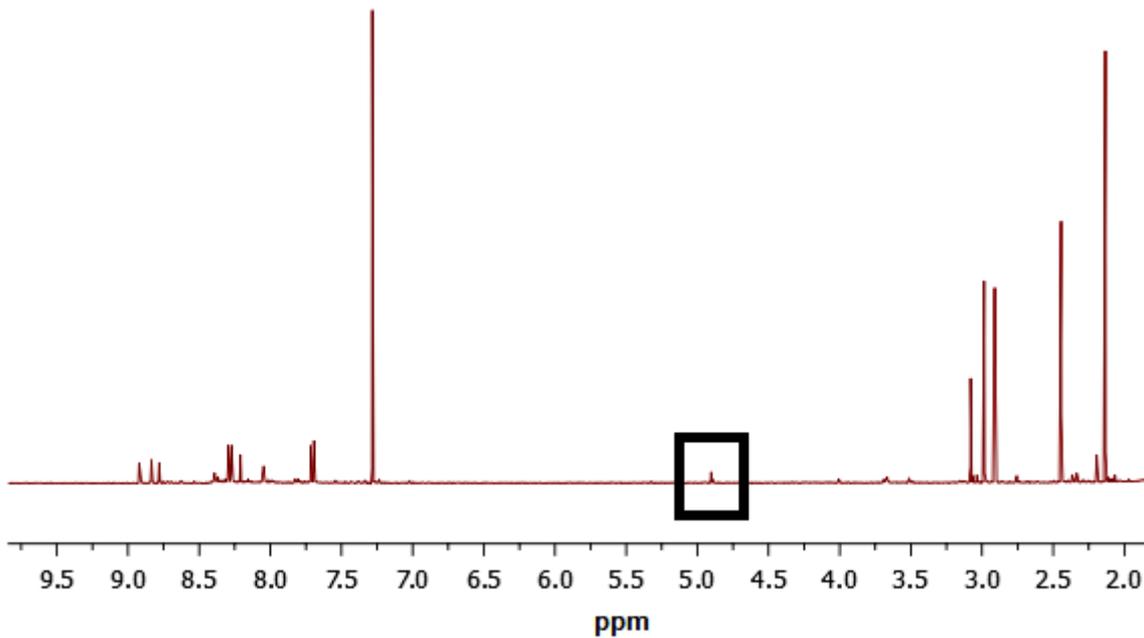
Neste capítulo são apresentados os Anexos referenciados pela ordem apresentada na dissertação.



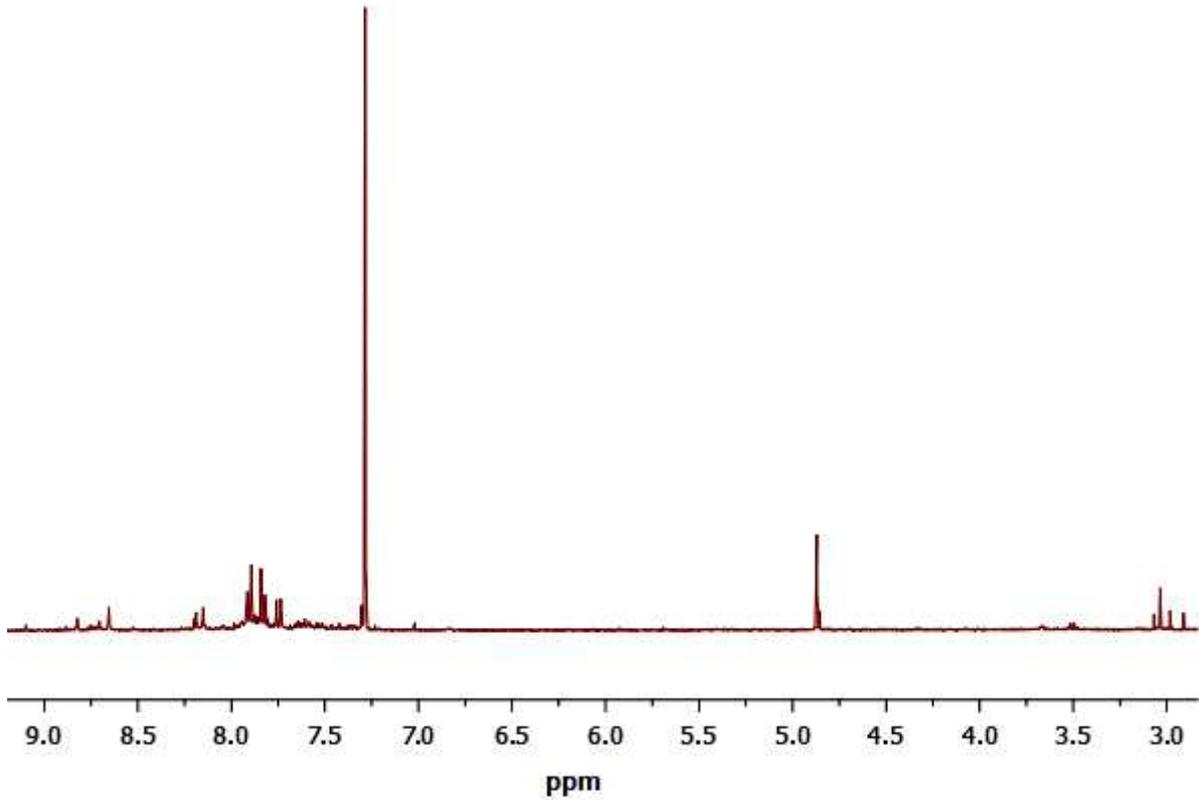
Anexo 2.1 - HPLC-MS da reação da *N*-acilação em meio básico severo, em que o tempo de retenção 4,18 min corresponde ao produto pretendido e 3,88 min a reagente de partida: a) 70 horas à Tamb e 3 horas a 60 °C b) 82 horas à Tamb e 3 horas a 60 °C.



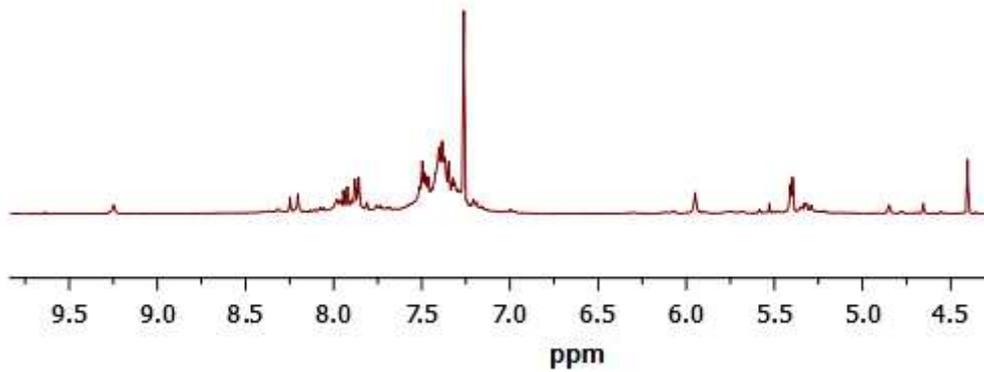
Anexo 2.2 - HPLC-MS dos produtos da *N*-acilação em meio básico severo com refluxo, em que o tempo de retenção 4,18 min corresponde ao produto pretendido e 3,88 min a reagente de partida: a) da reação à Tamb; b) após refluxo e processamento da reação.



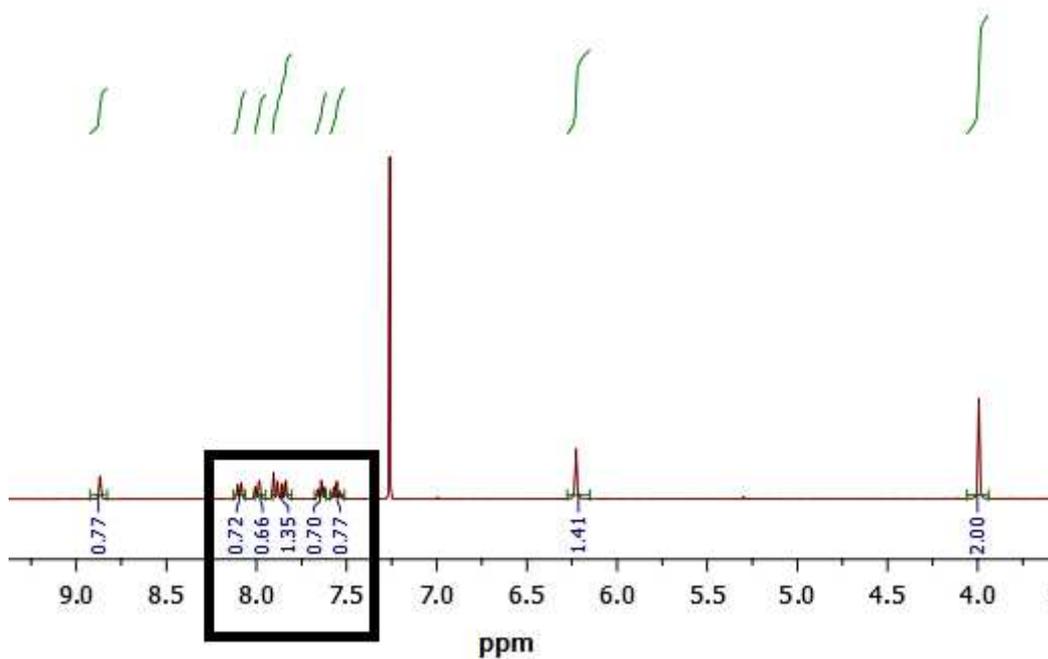
Anexo 2.3 - Espectroscopia de RMN ¹H (CDCl₃) da fase orgânica da reação de *N*-acilação para obter B3, em que o sinal do CH₂ próximo de 5 ppm está destacado na caixa a preto.



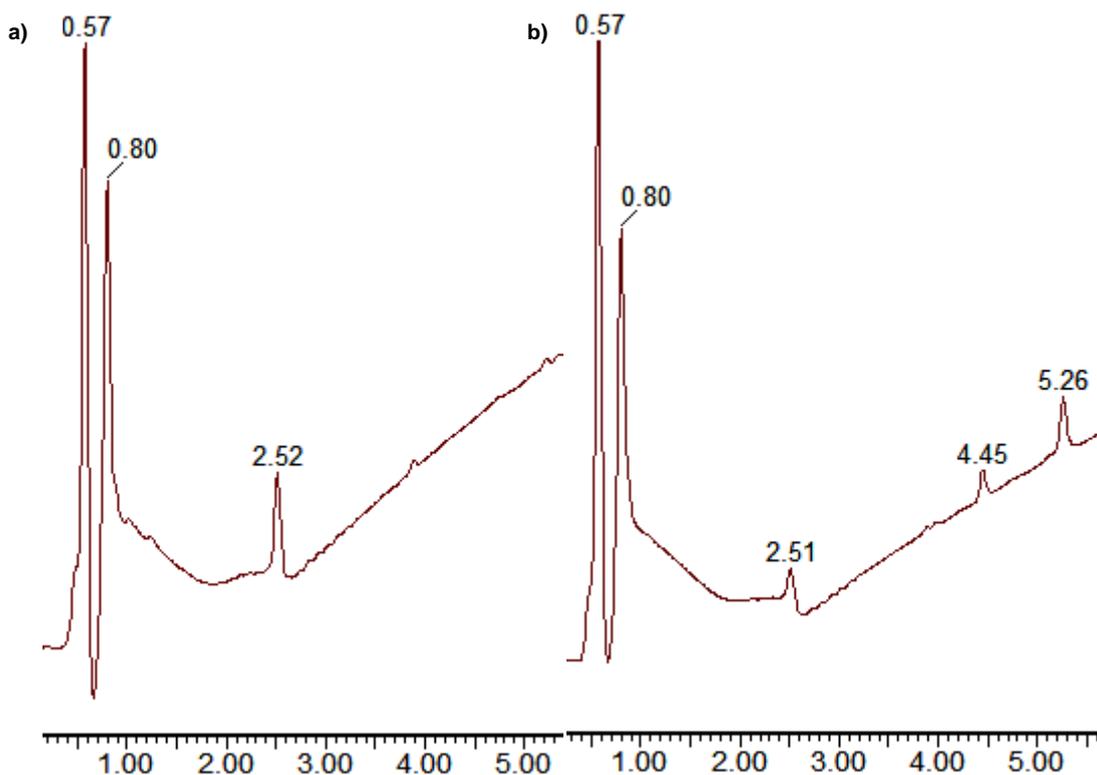
Anexo 2.4 - Espectroscopia de RMN ¹H (CDCl₃) da fase orgânica da reação de *N*-acilação para obter B7.



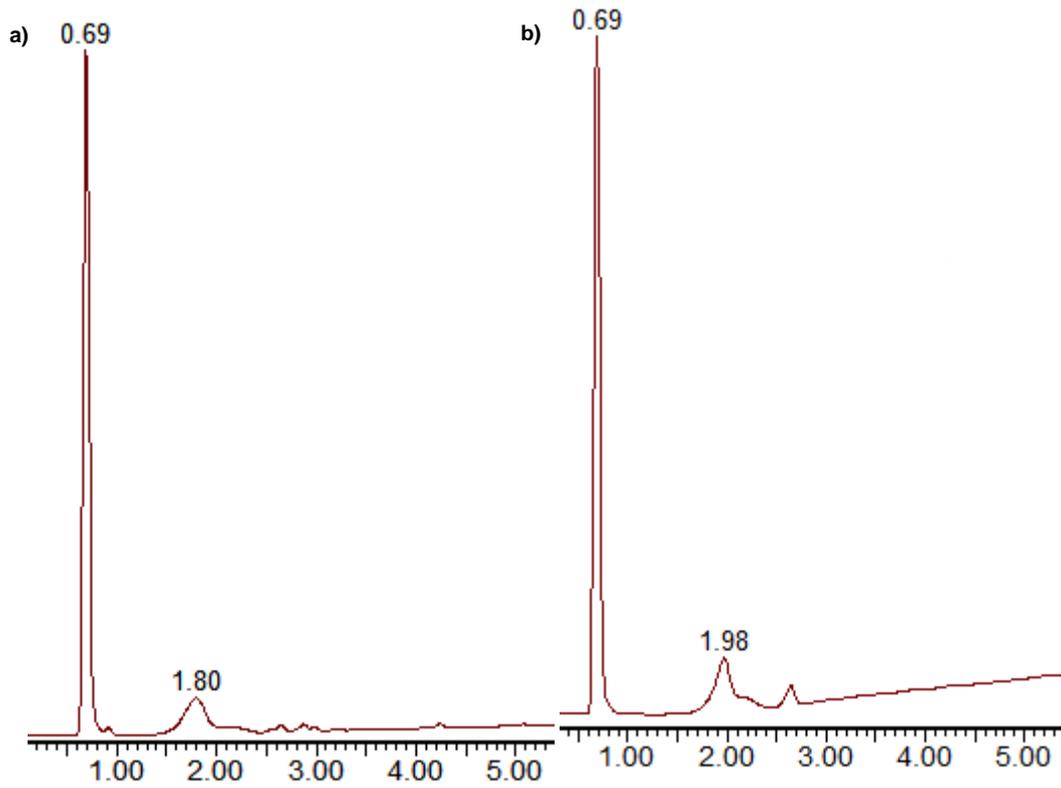
Anexo 2.5 - Espectroscopia de RMN ¹H (CDCl₃) da fração orgânica da reação de *N*-alquilação na posição 6 para obter D1.



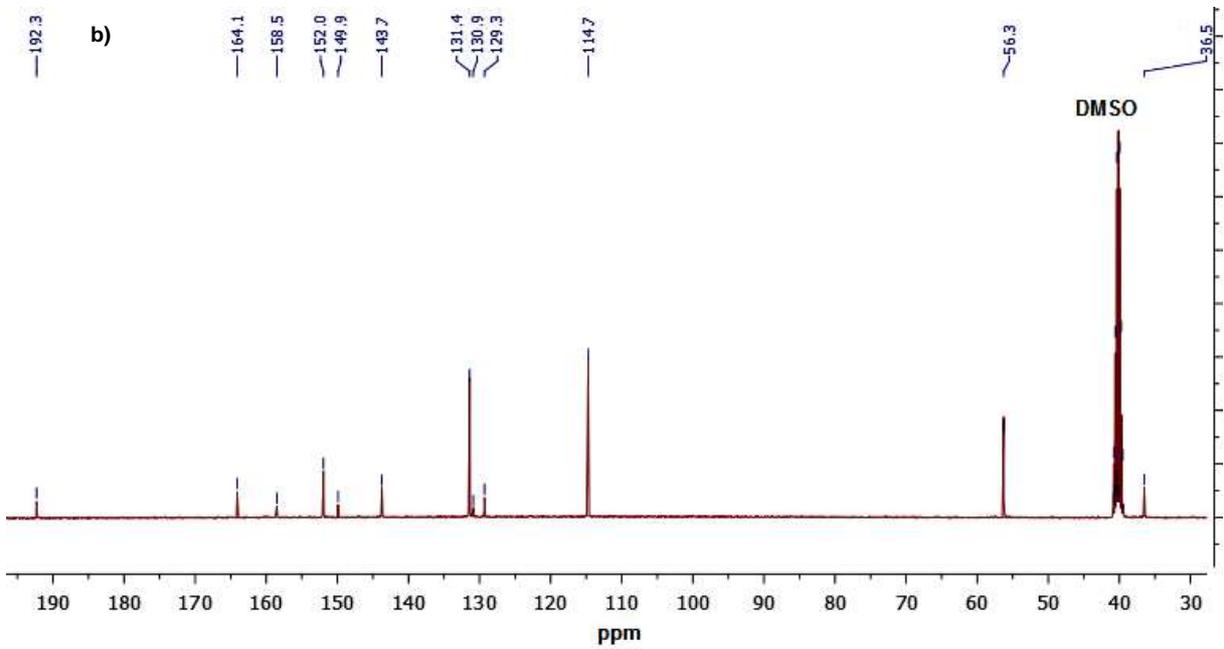
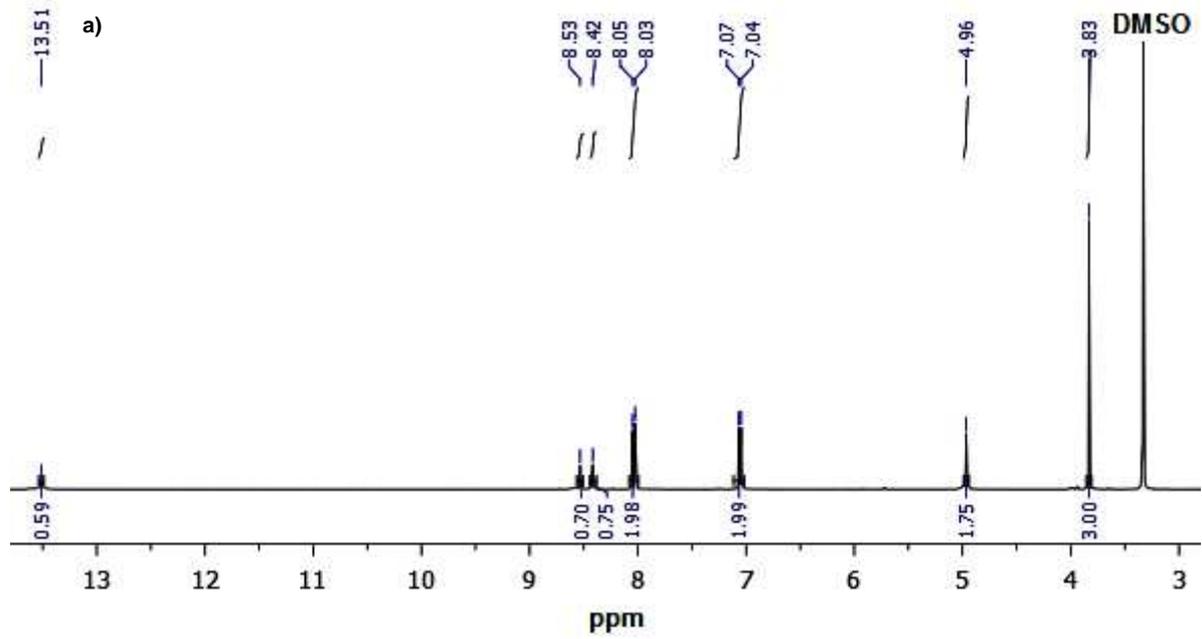
Anexo 2.6 - Espectroscopia de RMN ^1H (CDCl_3) da fase orgânica da reação de *N*-alquilação na posição 6 para obter D2, em que a caixa de cor preta evidencia a falta de prótons da parte aromática.

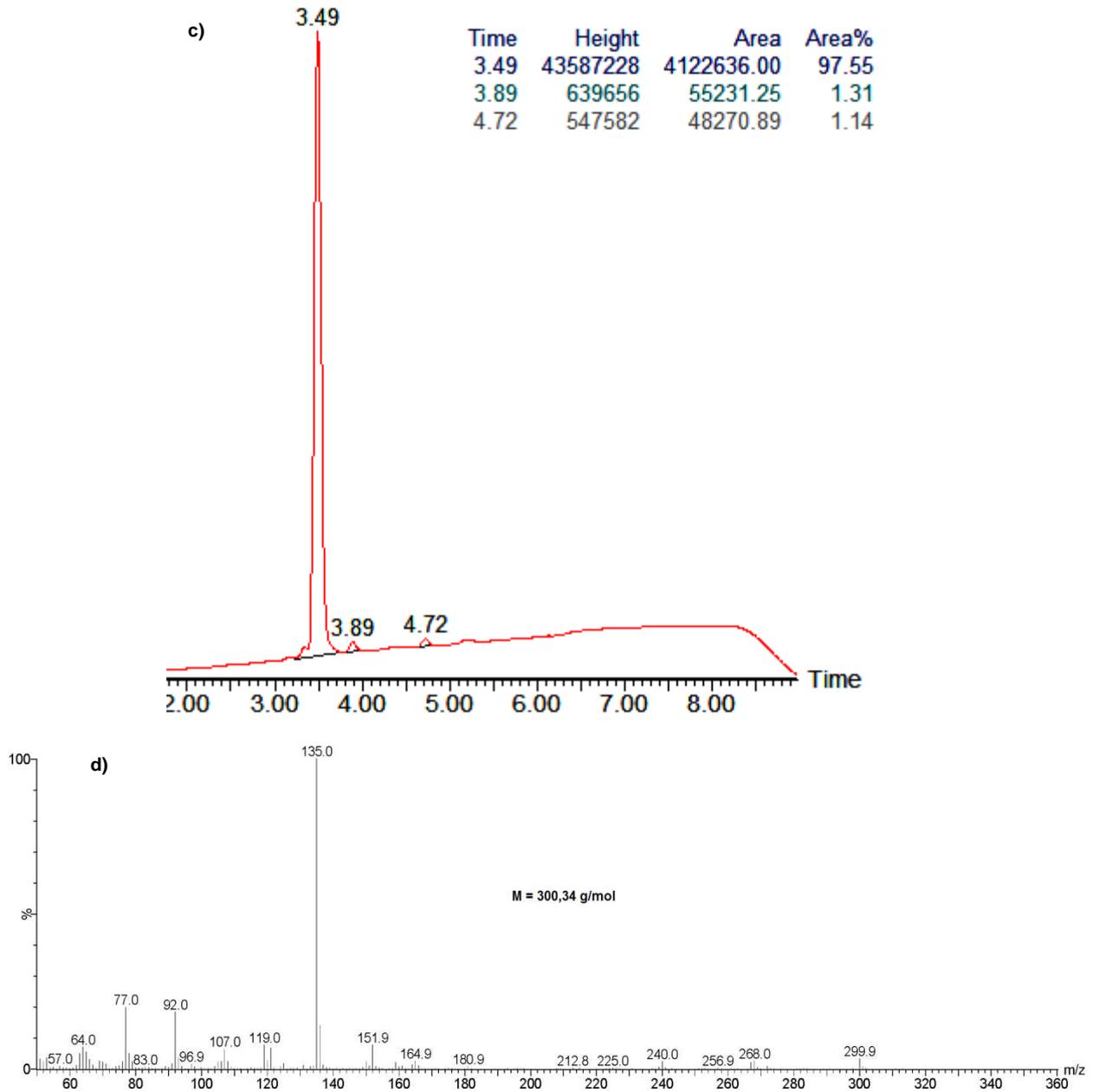


Anexo 2.7 - HPLC-MS dos produtos da reação de α -bromação da 4-acetilpiridina: a) reação 2; b) reação 5.

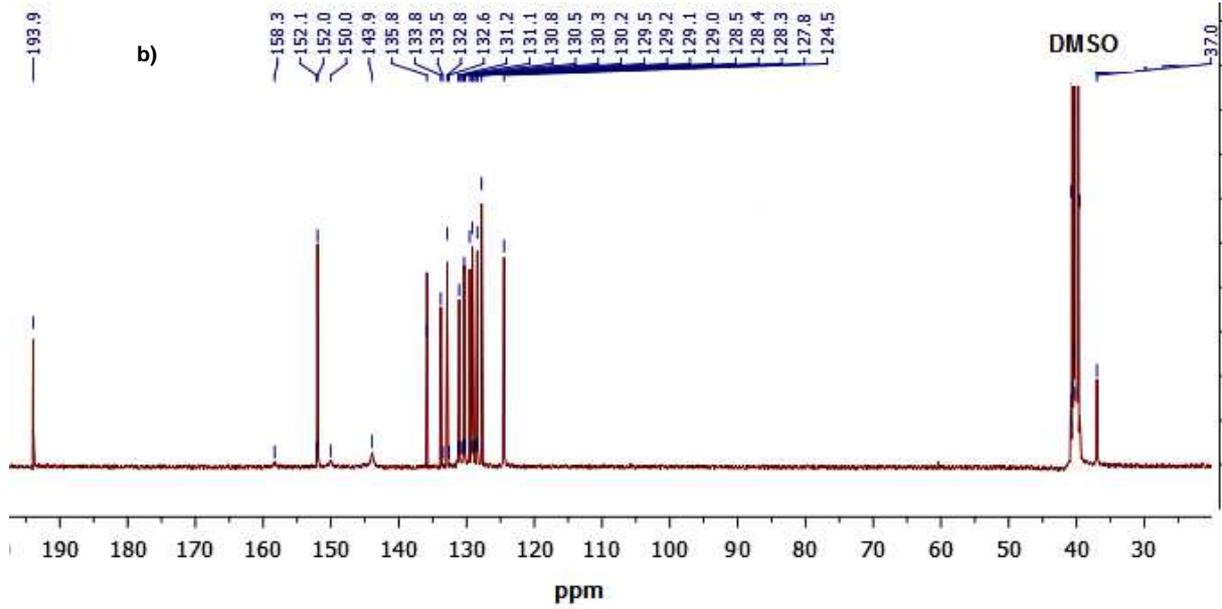
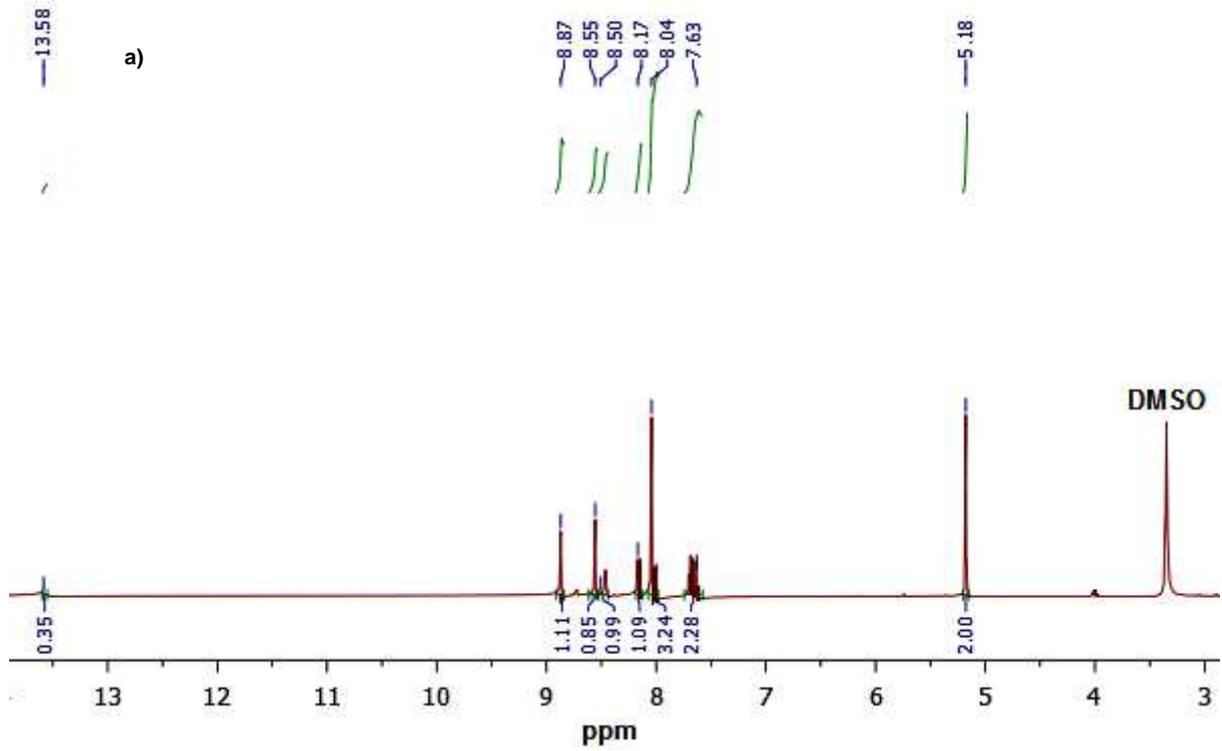


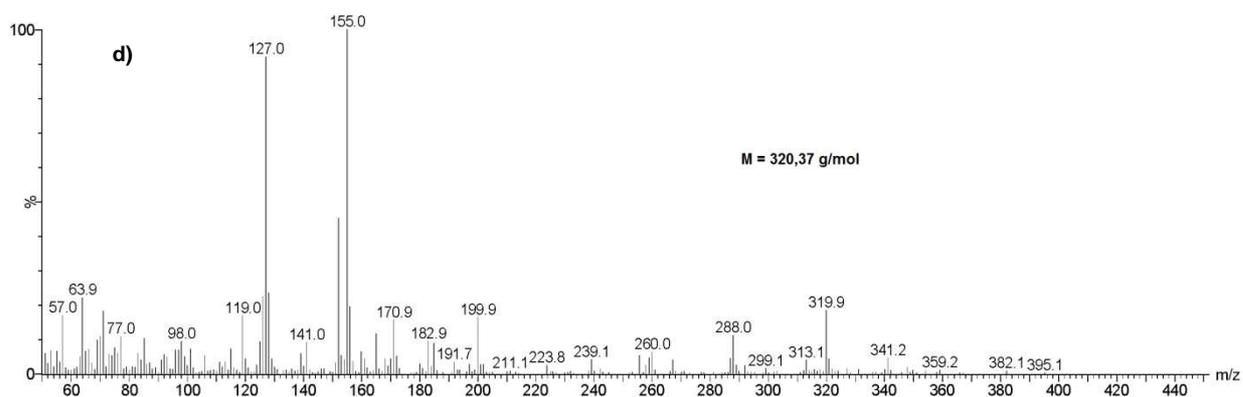
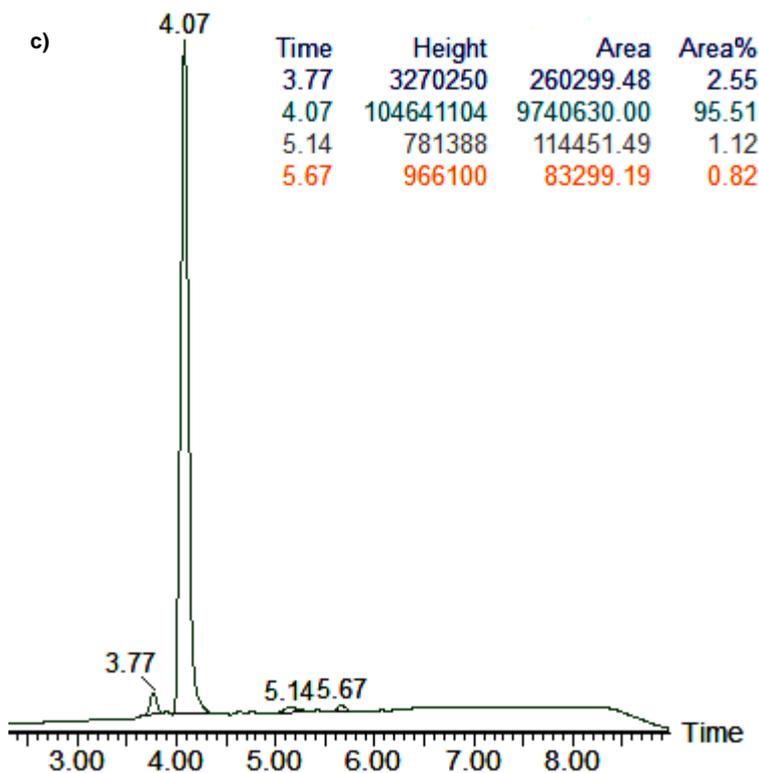
Anexo 2.8 - HPLC-MS dos produtos da reação do PHABoc: a) produto pouco concentrado e impuro; b) impuro.



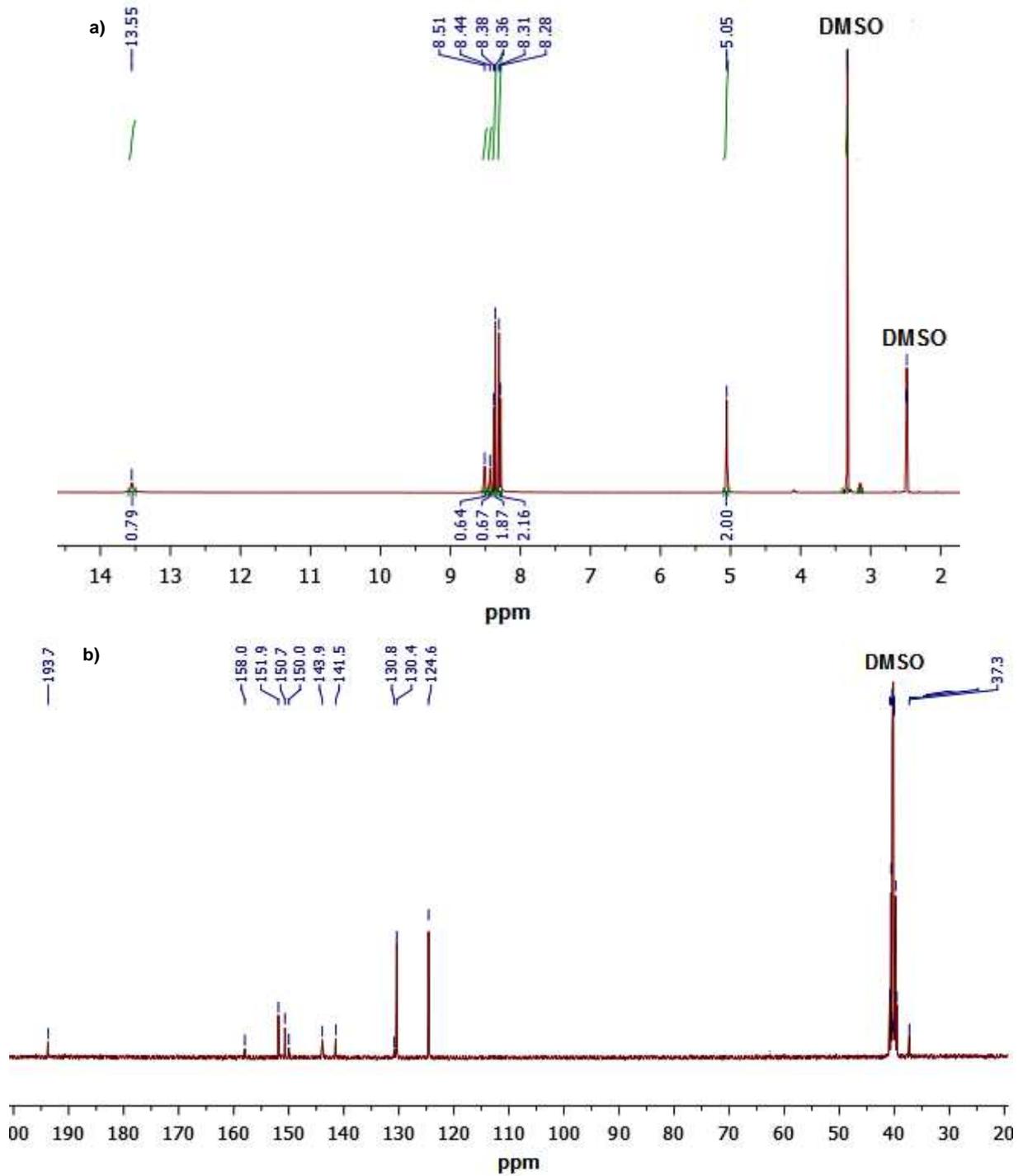


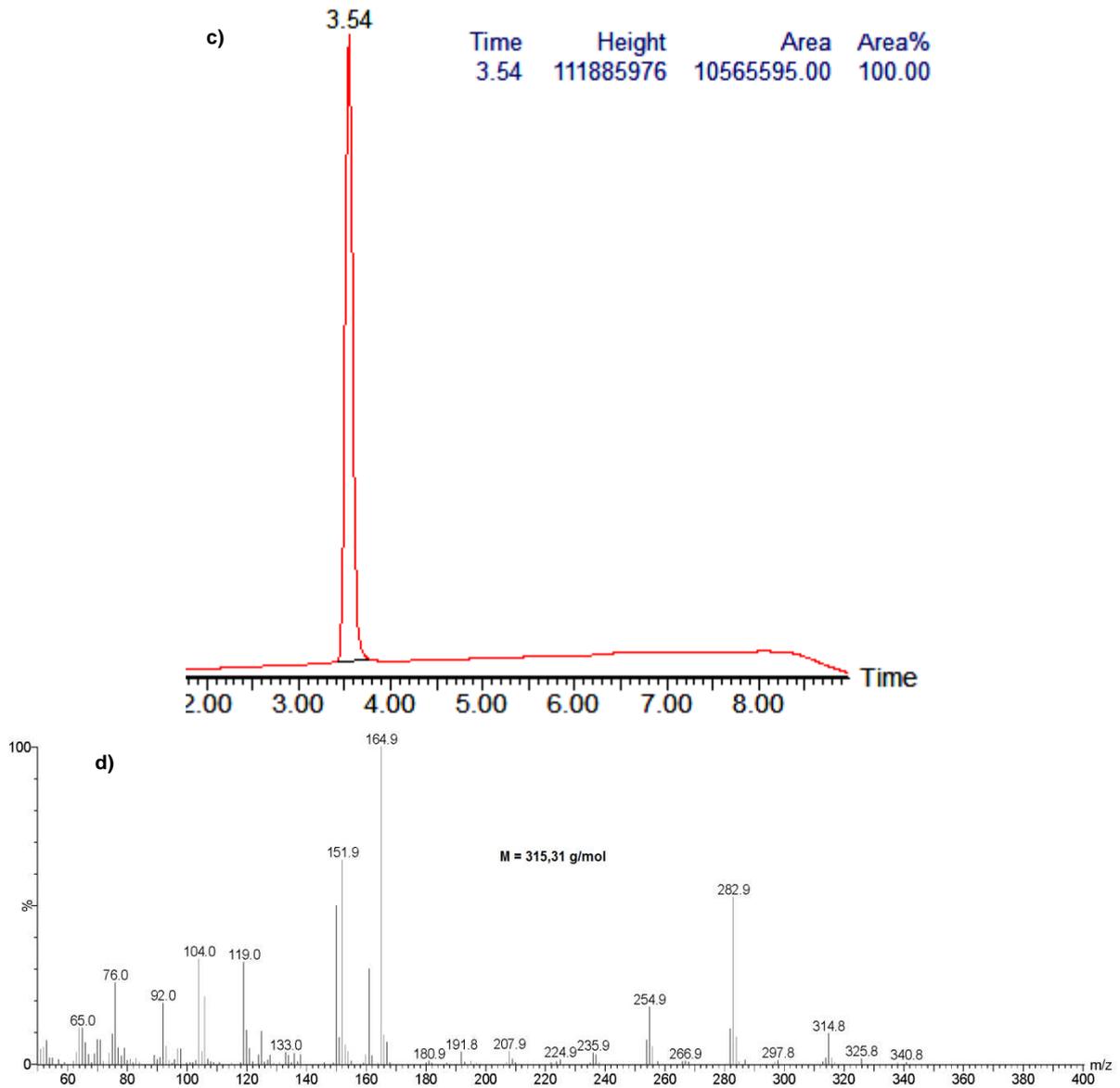
Anexo 3.1 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A1: a) RMN ¹H (DMSO); b) de ¹³C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.



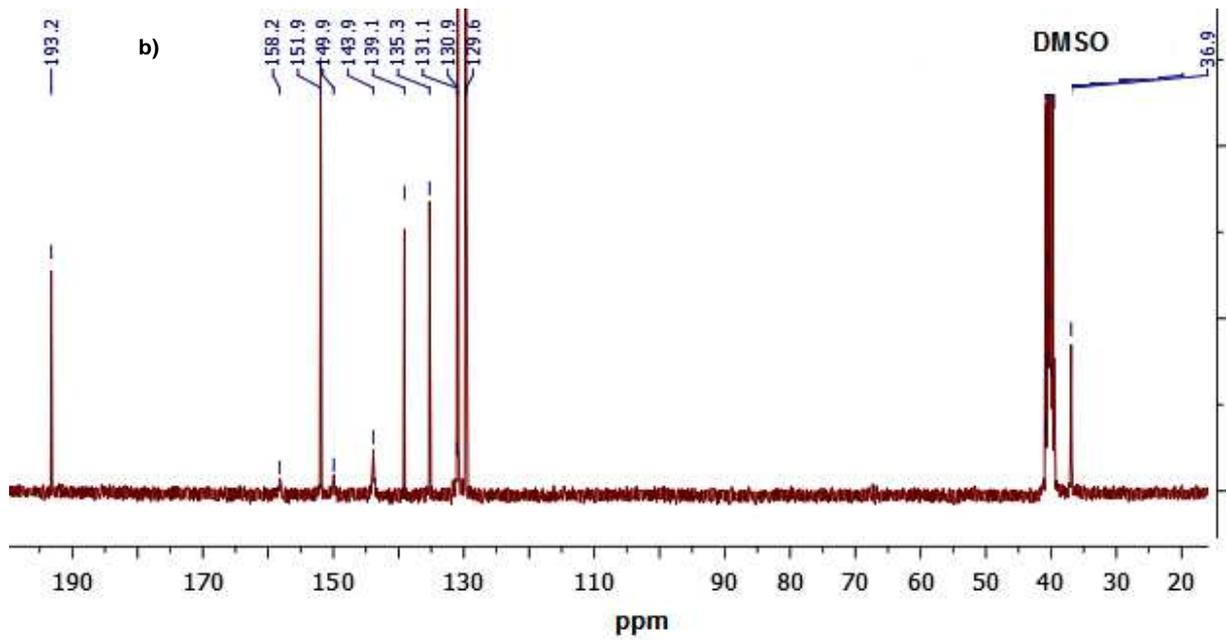
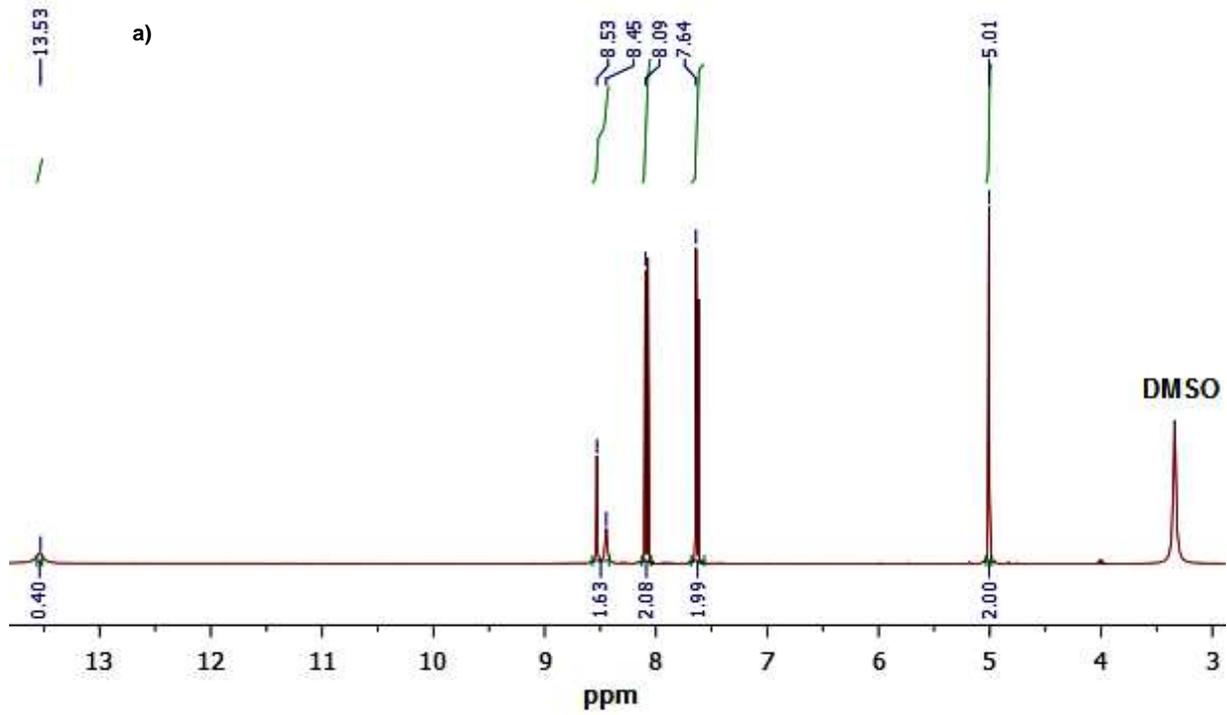


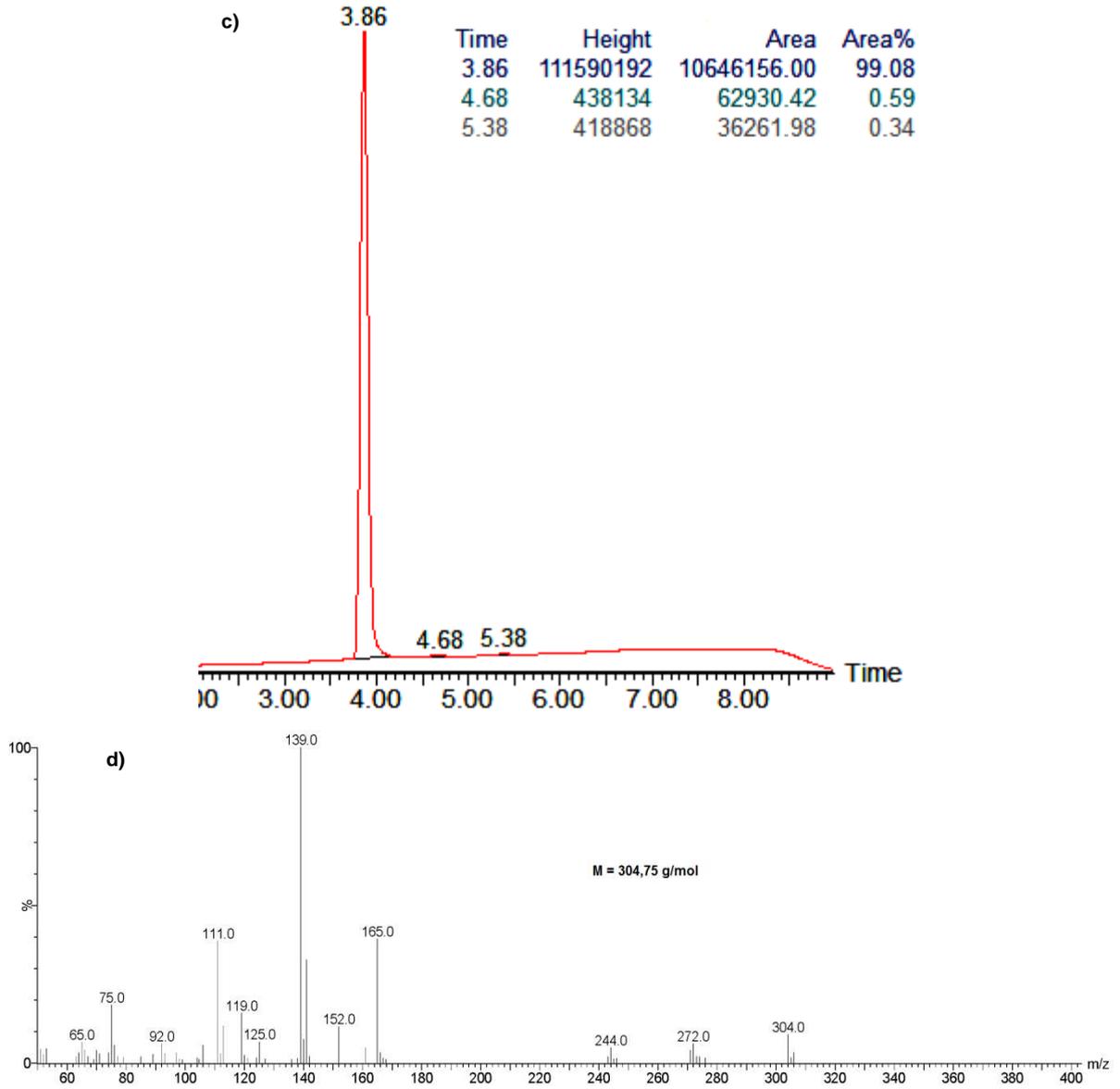
Anexo 3.2 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A2: a) RMN ¹H (DMSO); b) de ¹³C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.



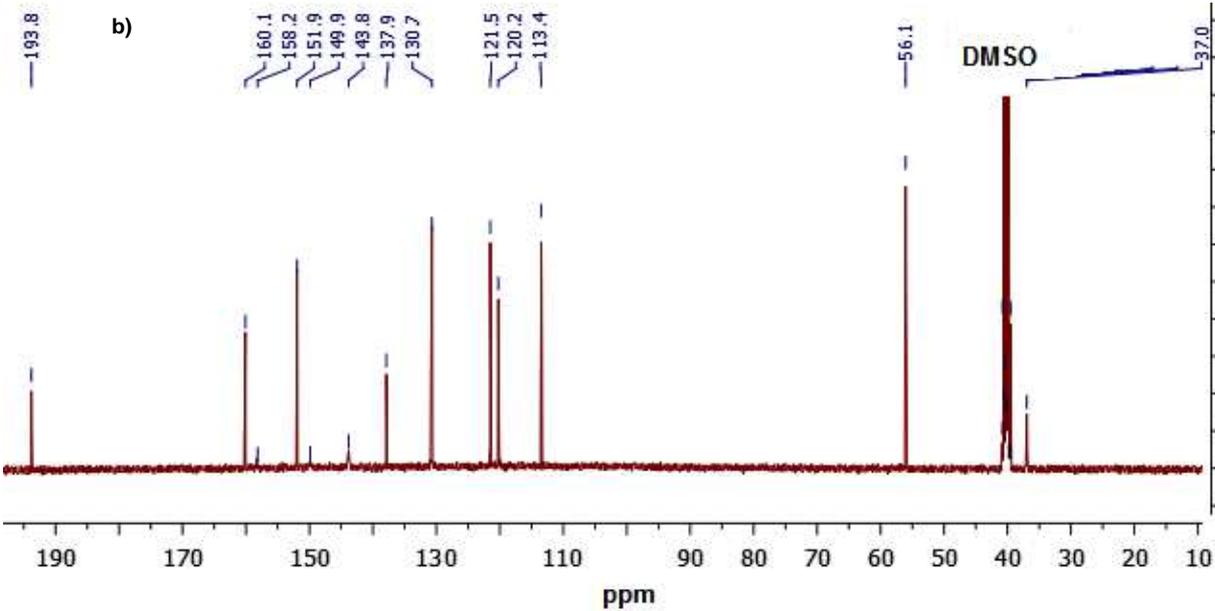
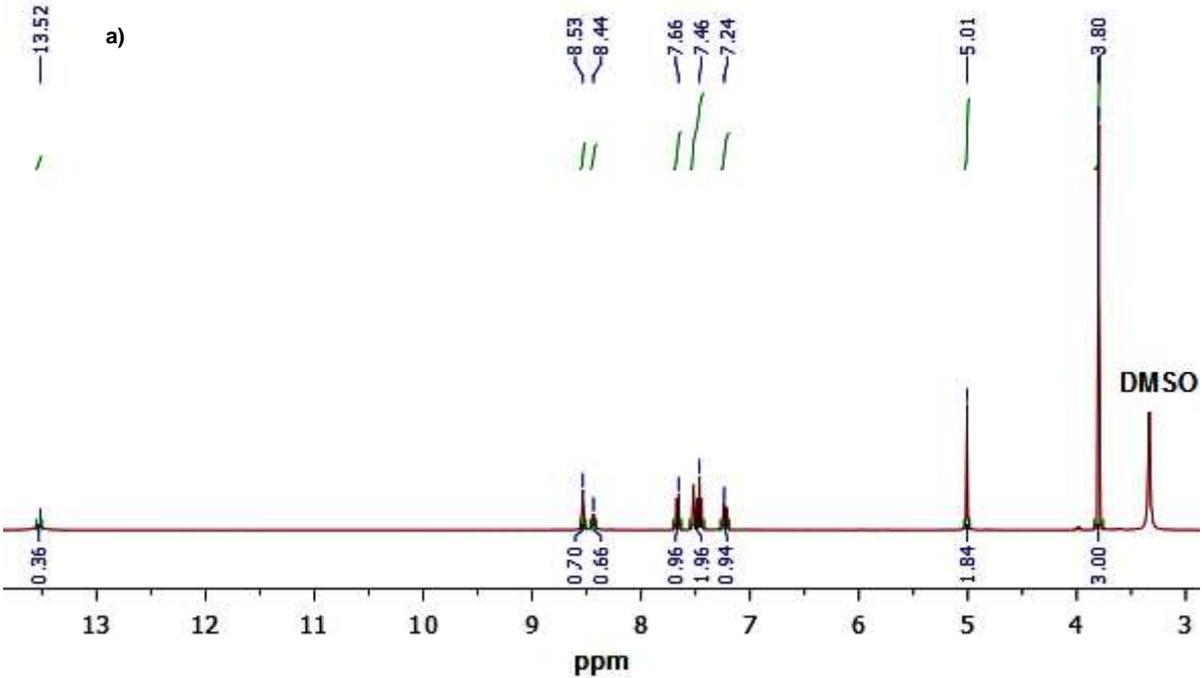


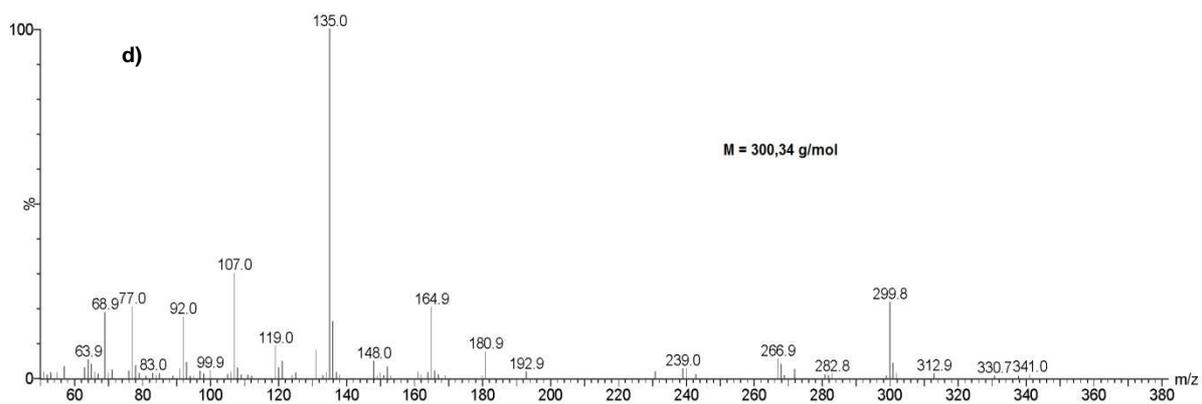
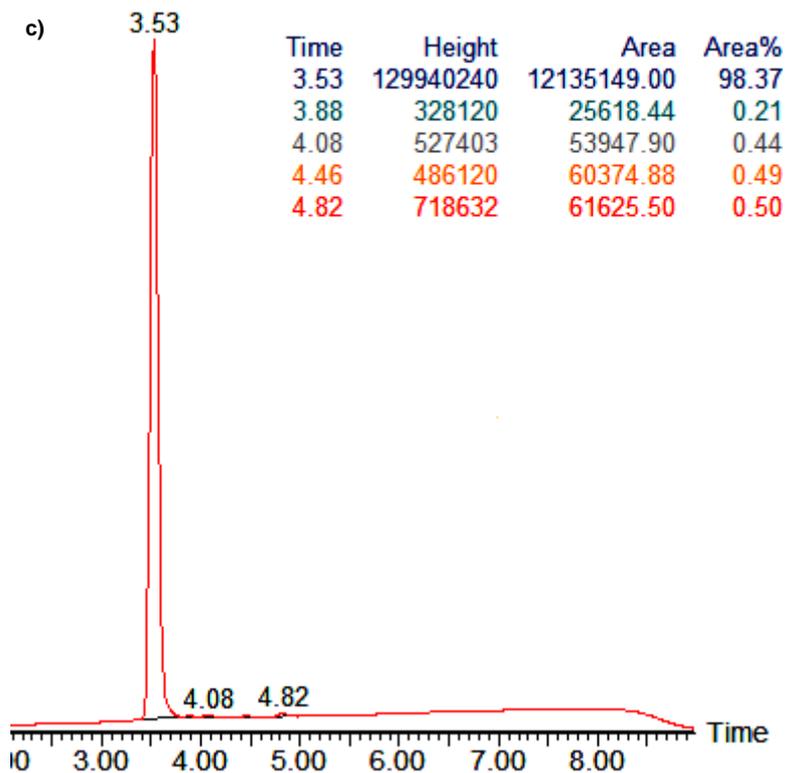
Anexo 3.3 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A3: a) RMN ^1H (DMSO); b) de ^{13}C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.



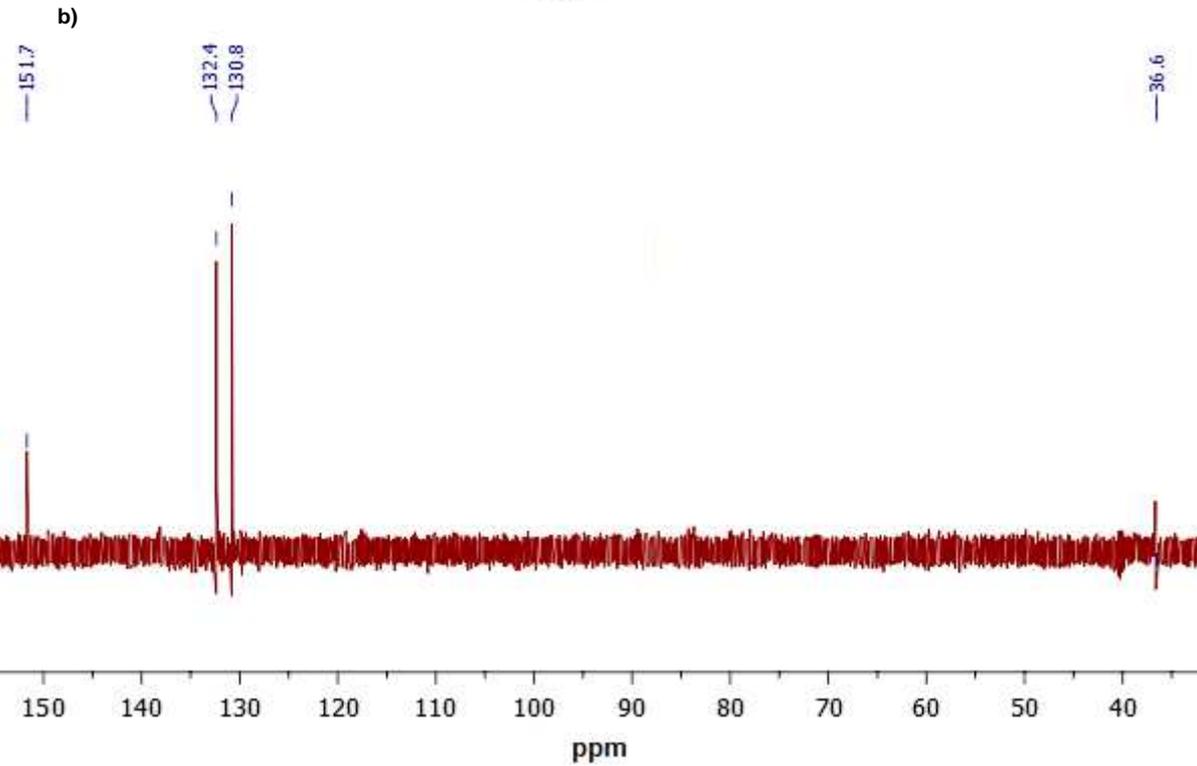
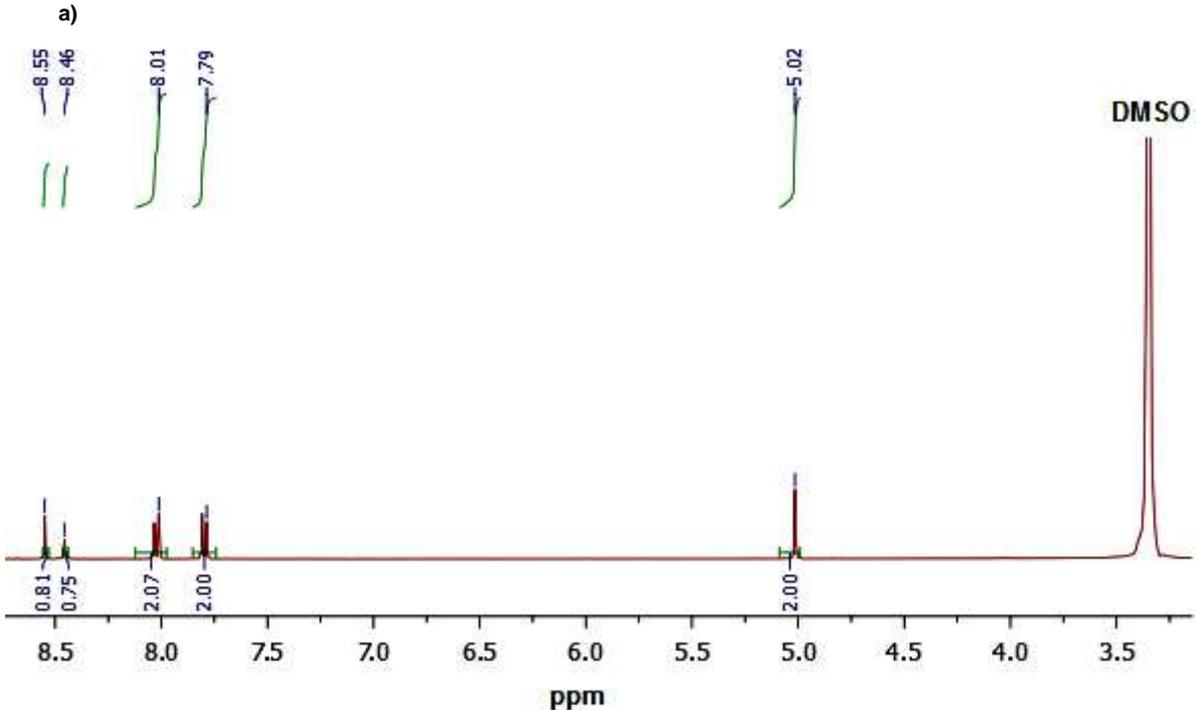


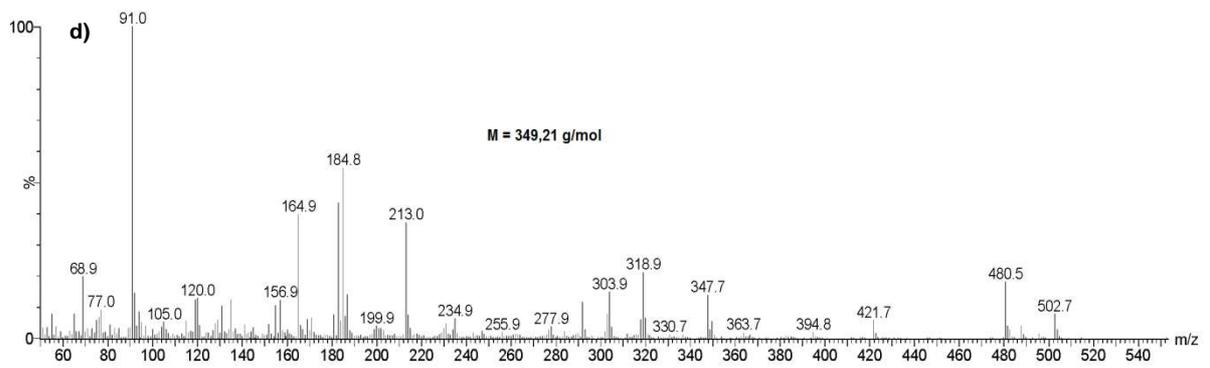
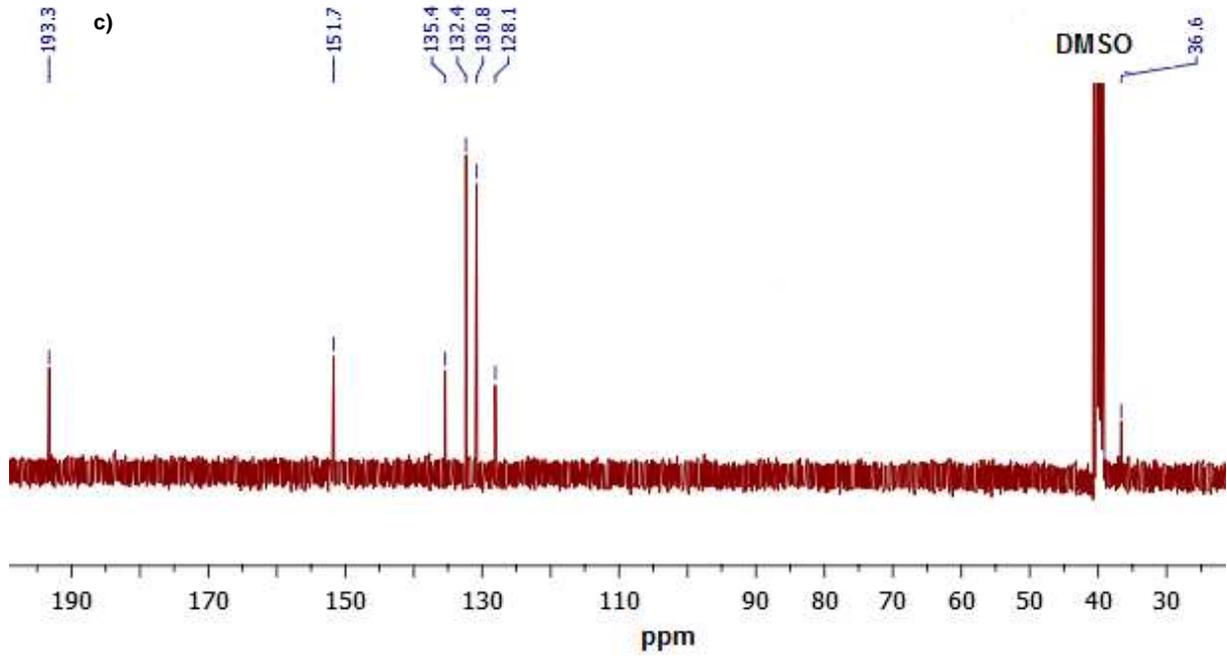
Anexo 3.4 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A4: a) RMN ^1H (DMSO); b) de ^{13}C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.



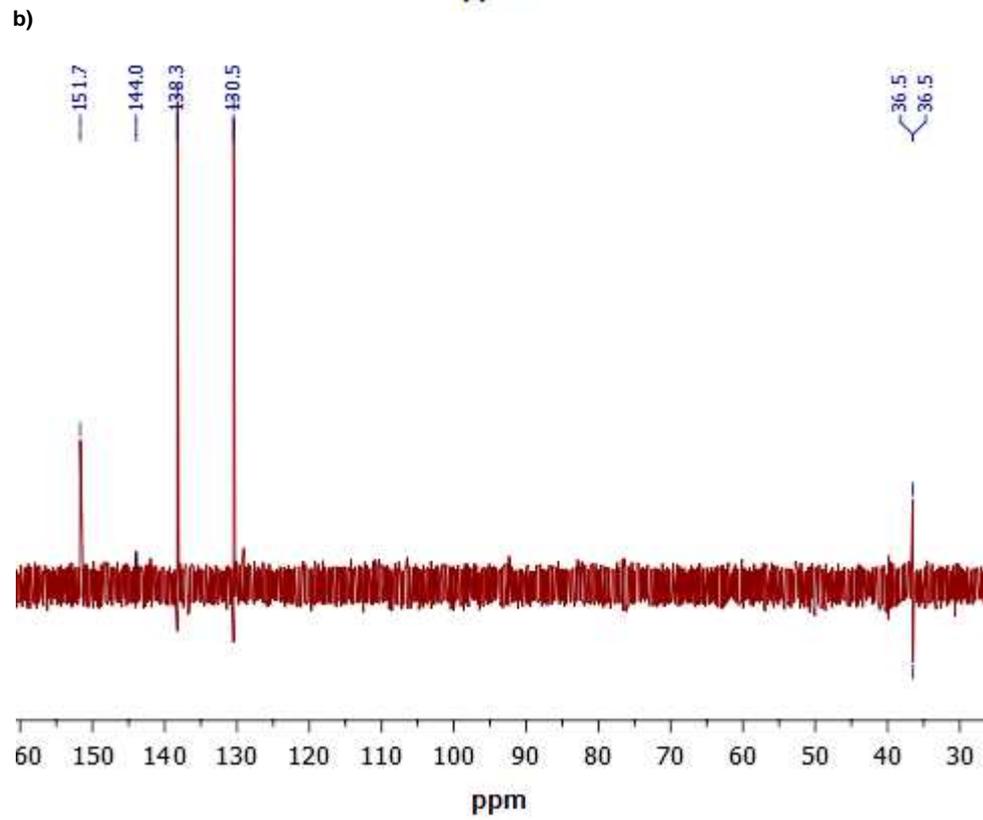
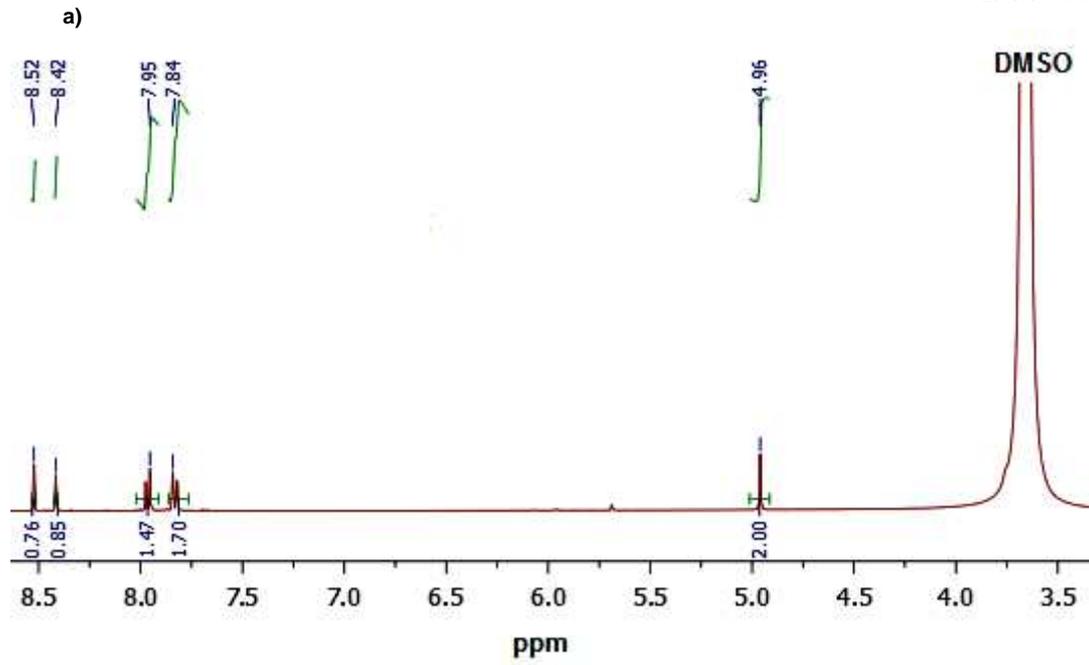


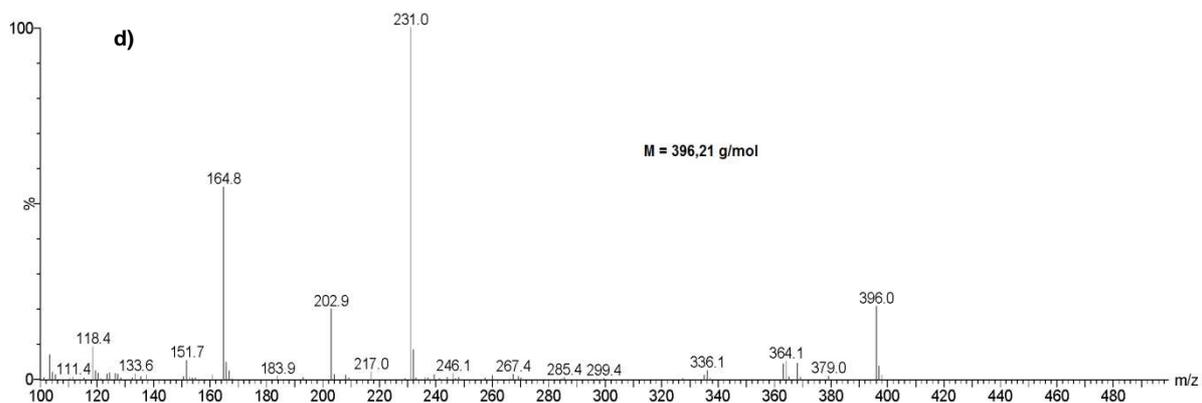
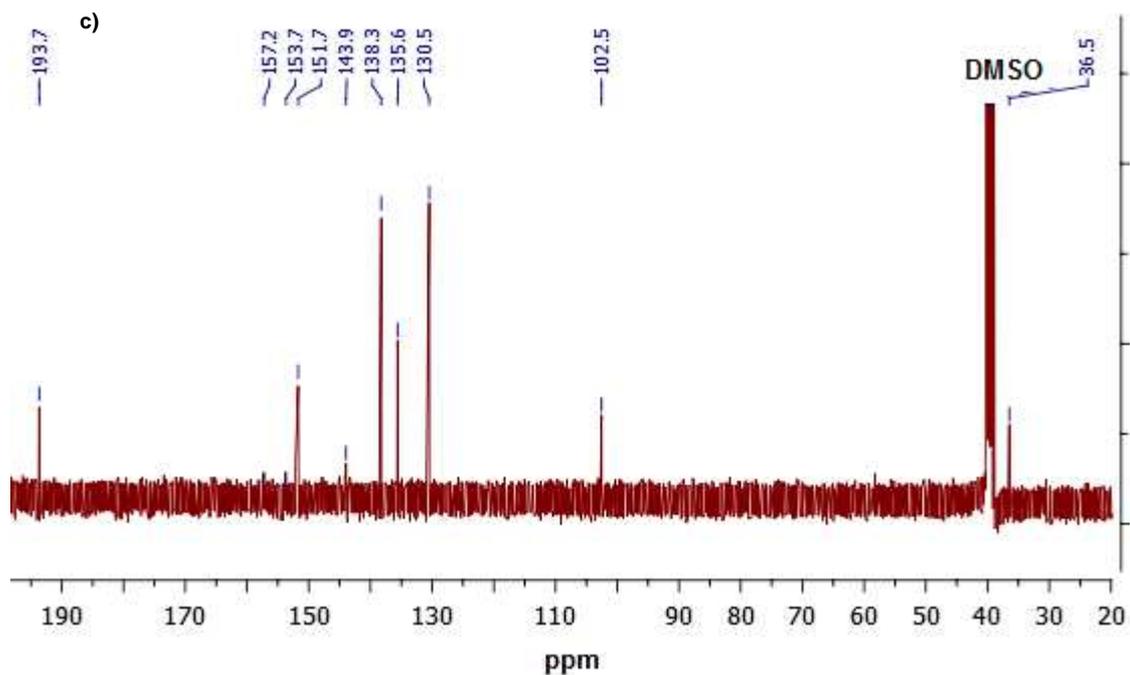
Anexo 3.5 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A5: a) RMN ^1H (DMSO); b) de ^{13}C (DMSO); c) HPLC-MS; d) EM/IE.



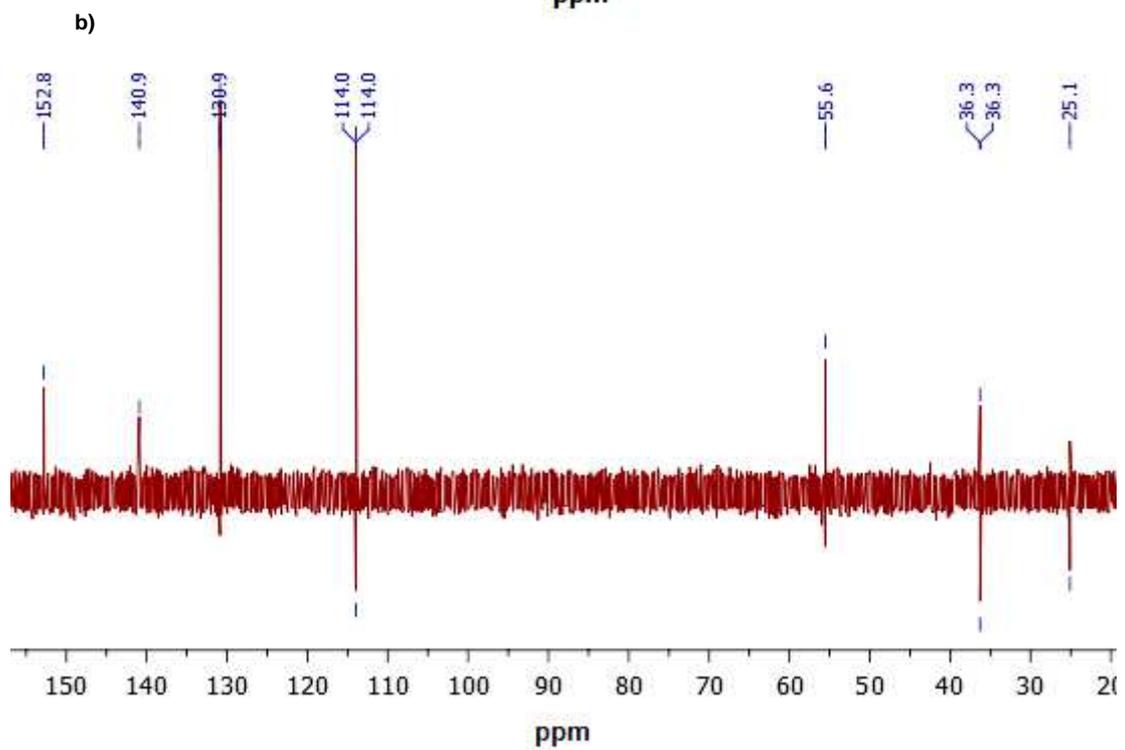
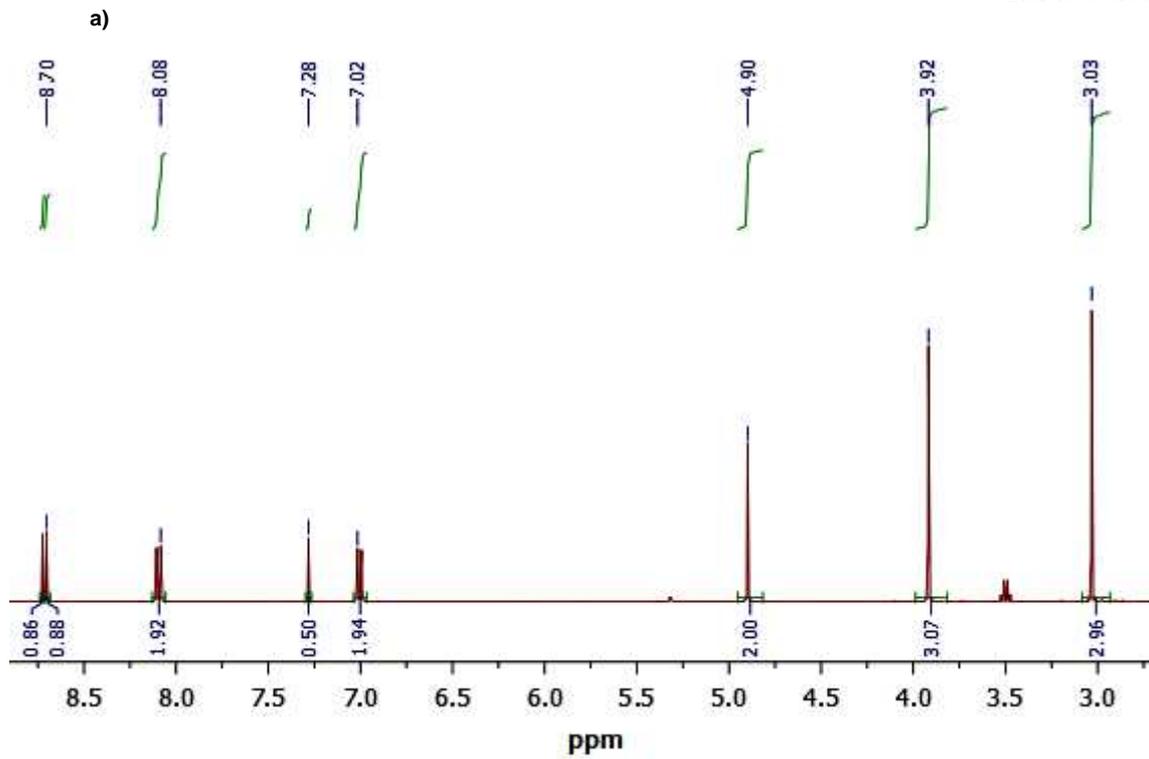


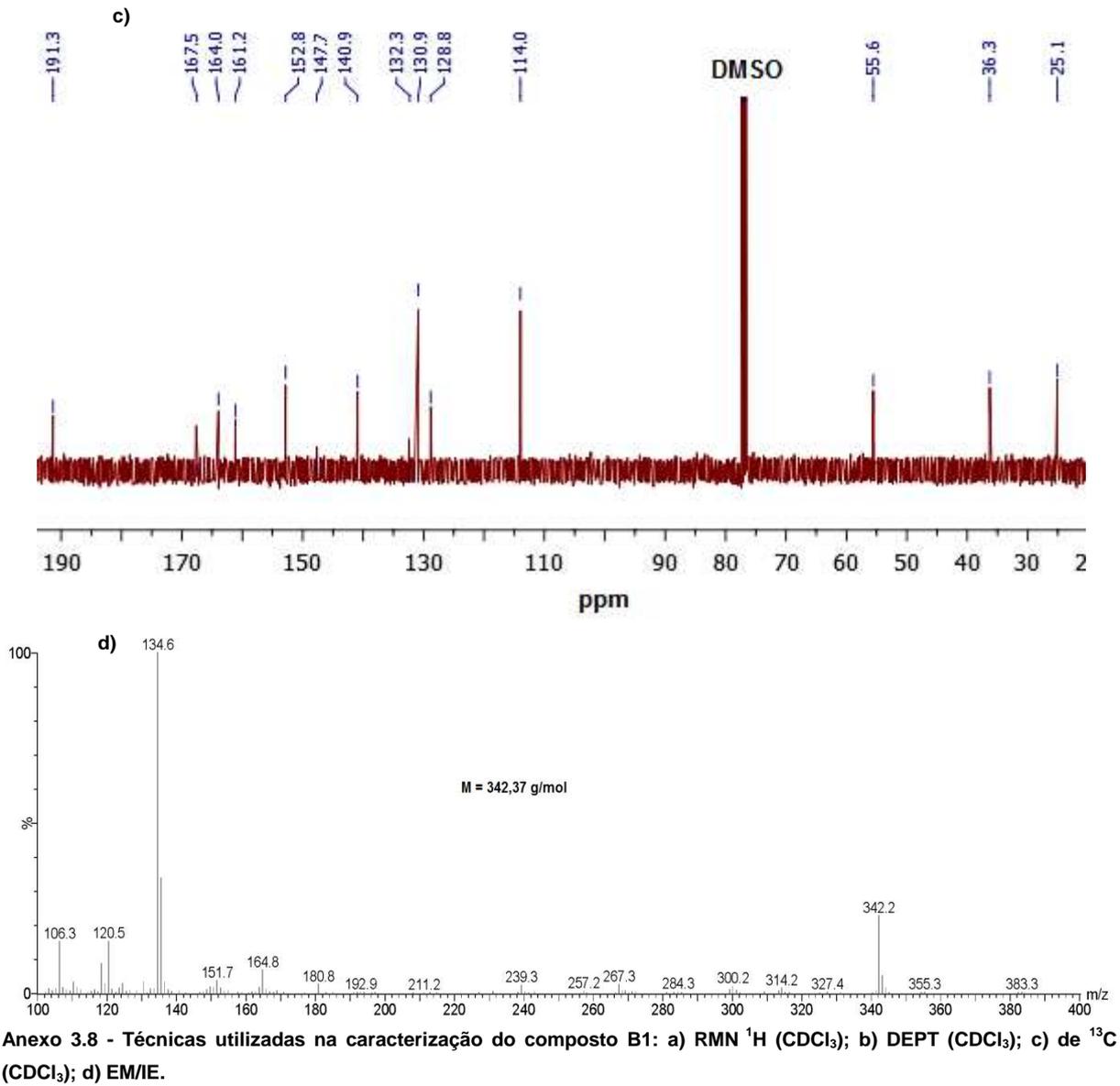
Anexo 3.6 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A6: a) RMN ^1H (DMSO); b) DEPT (DMSO); c) de ^{13}C (DMSO); d) EM/IE.

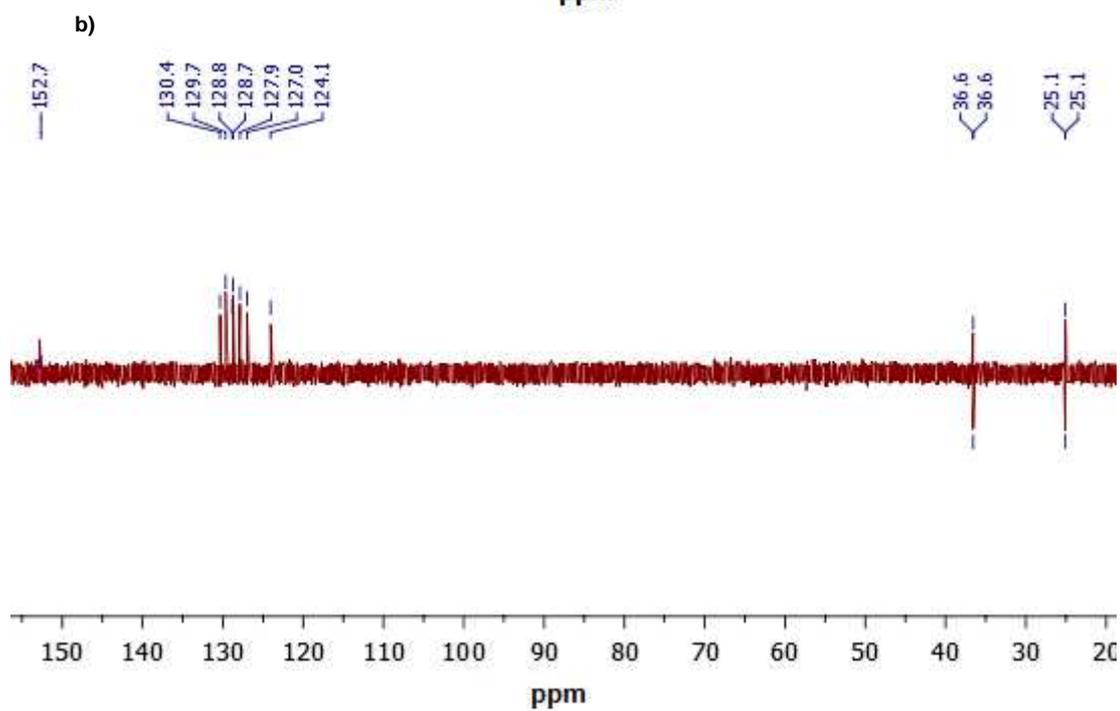
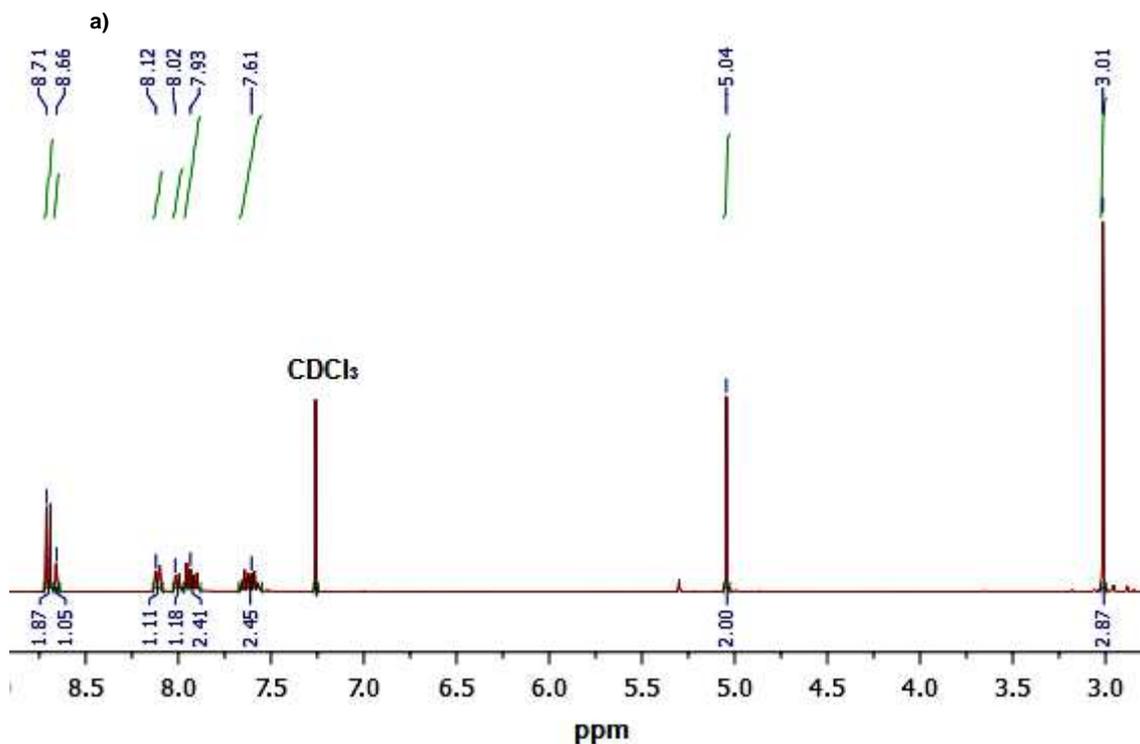


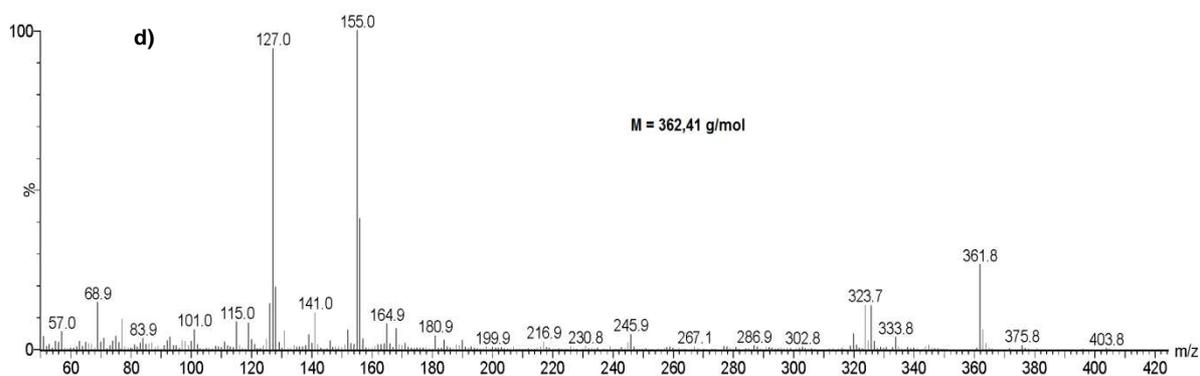
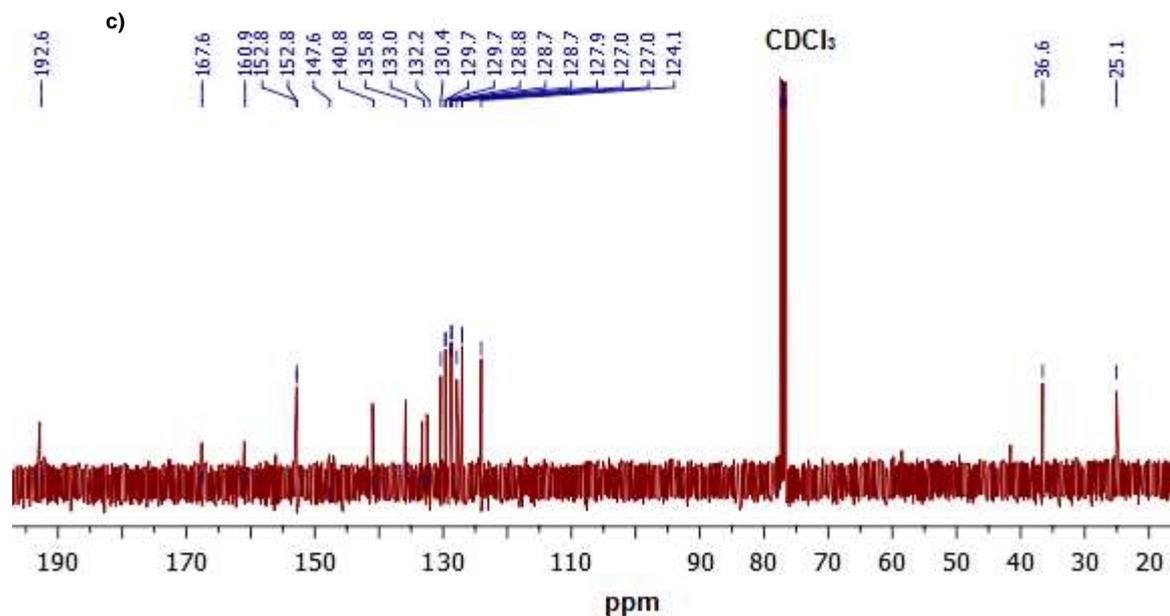


Anexo 3.7 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto A7: a) RMN ^1H (DMSO); b) DEPT (DMSO); c) de ^{13}C (DMSO); d) EM/IE.

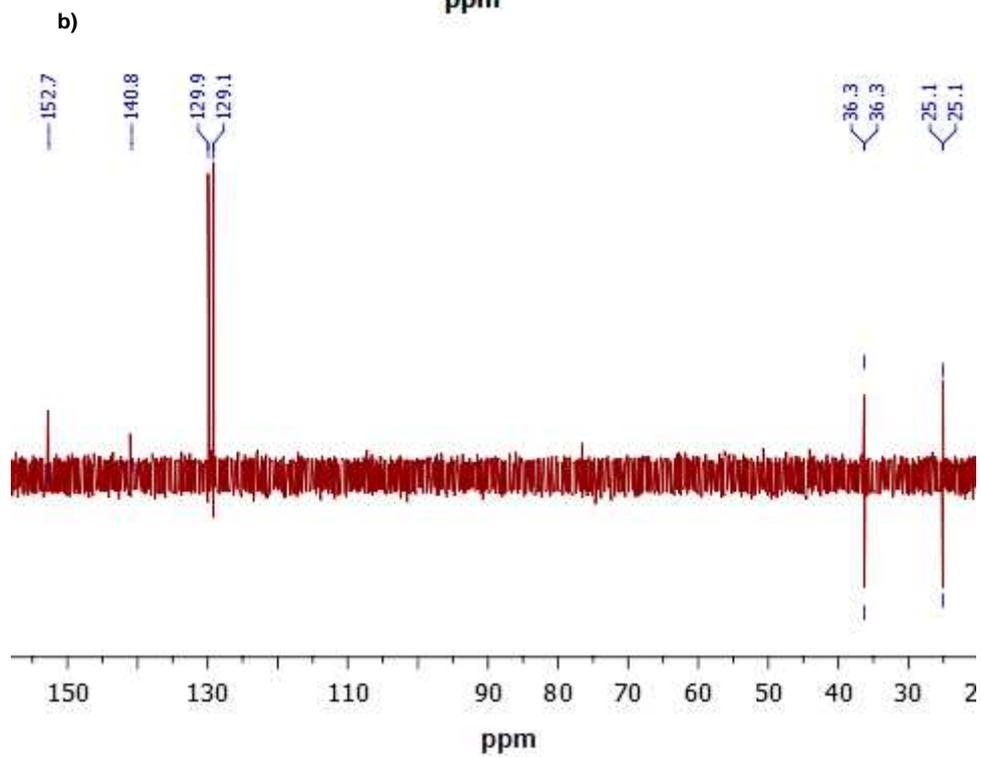
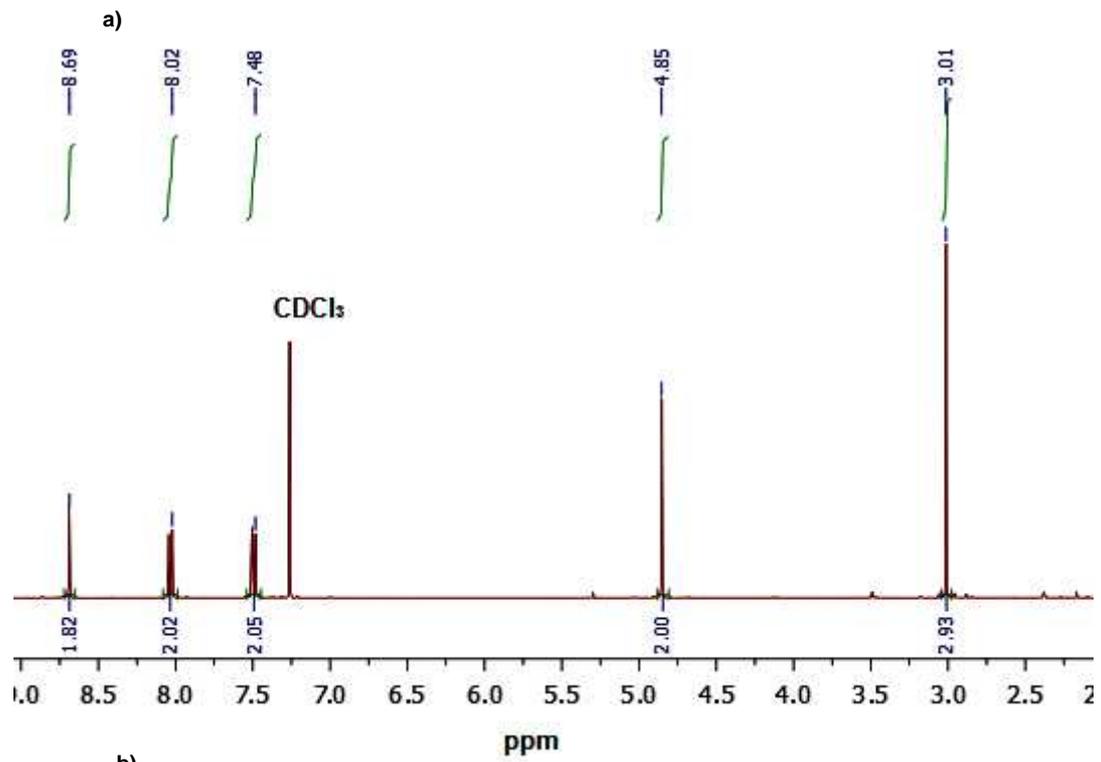


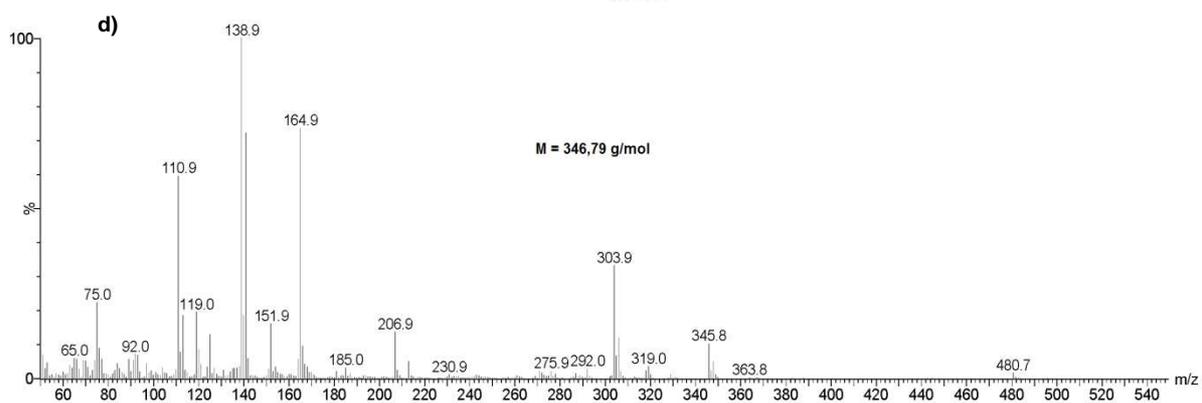
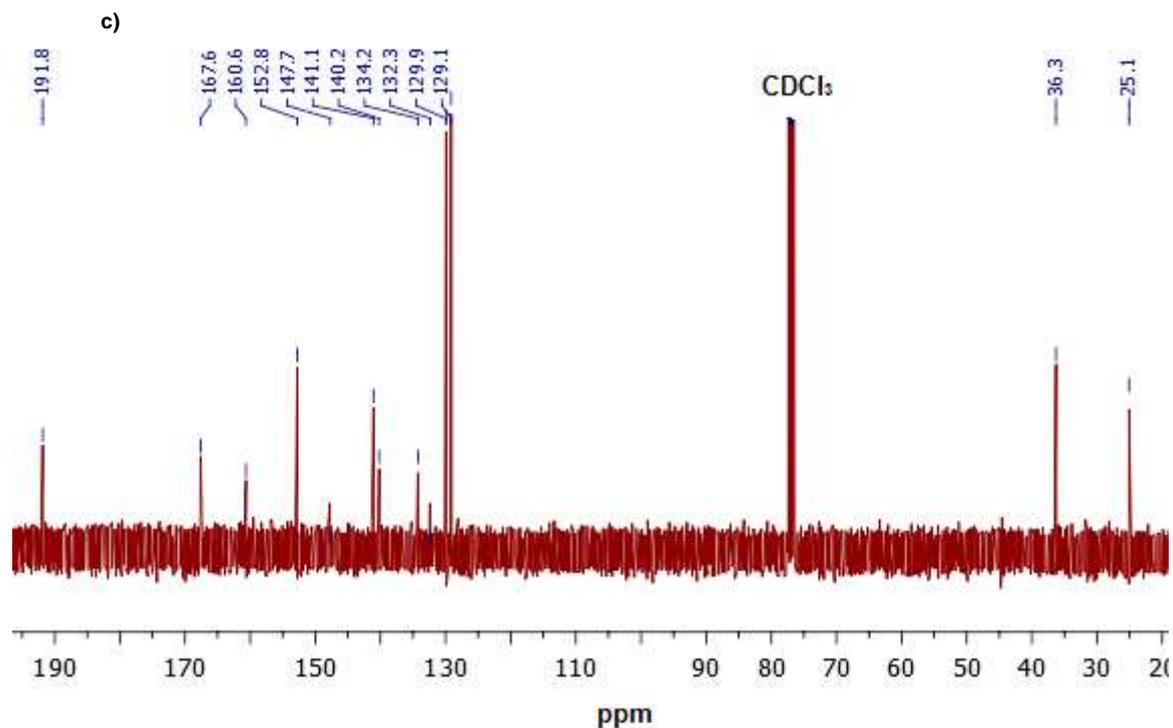




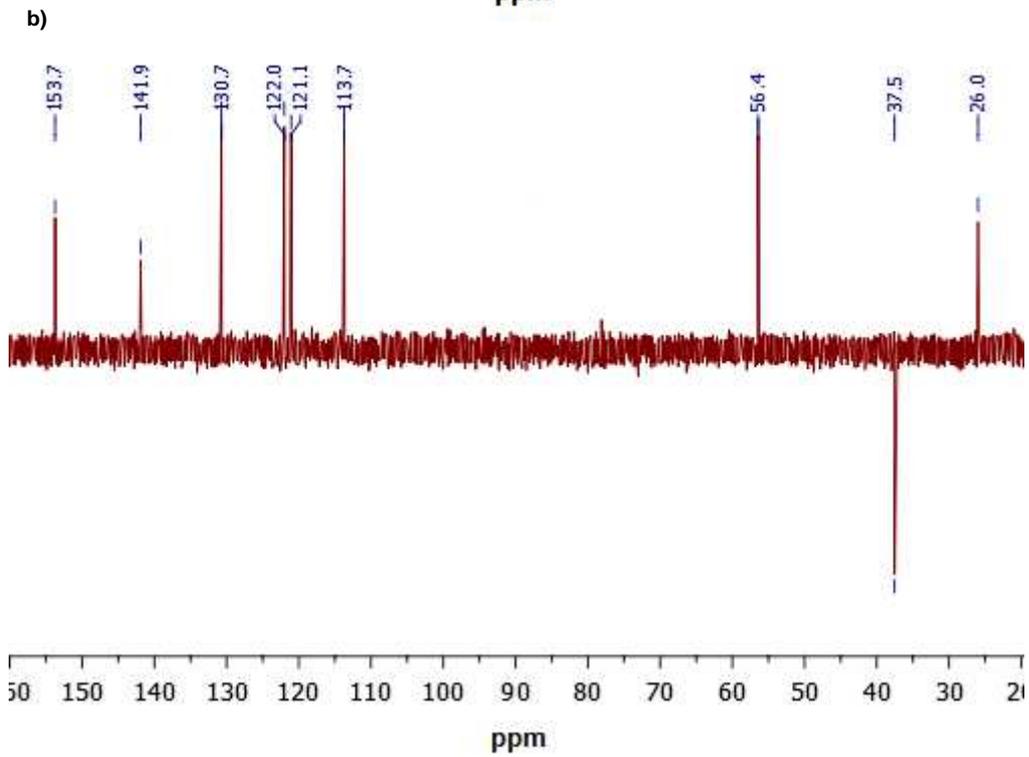
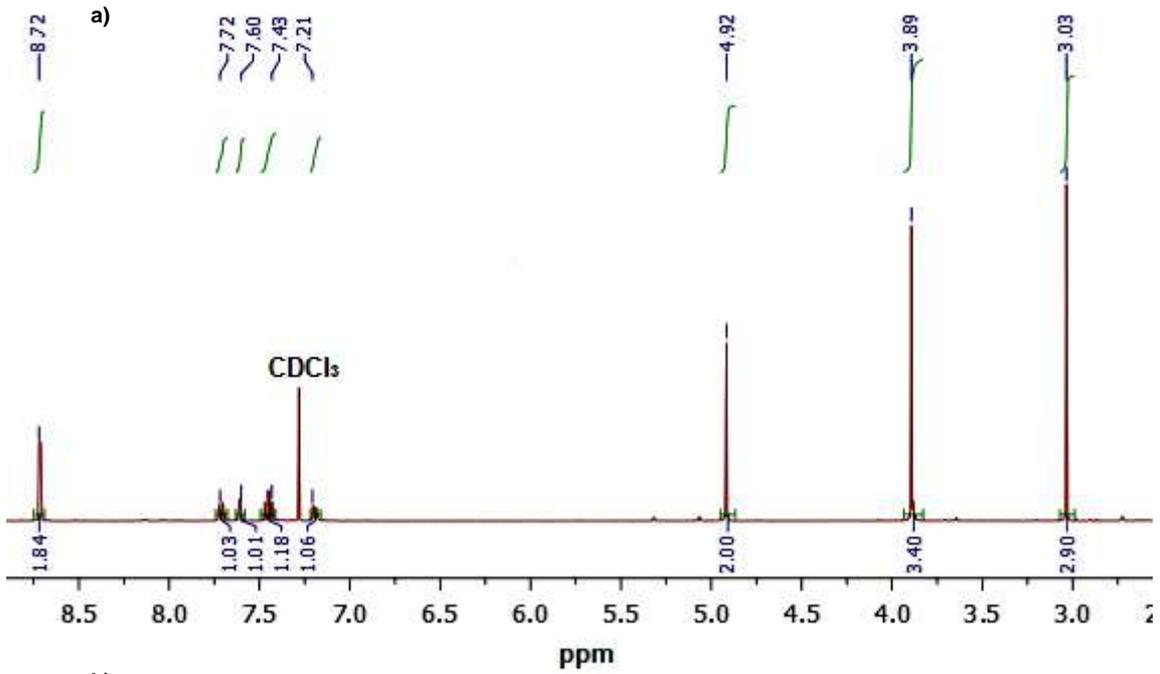


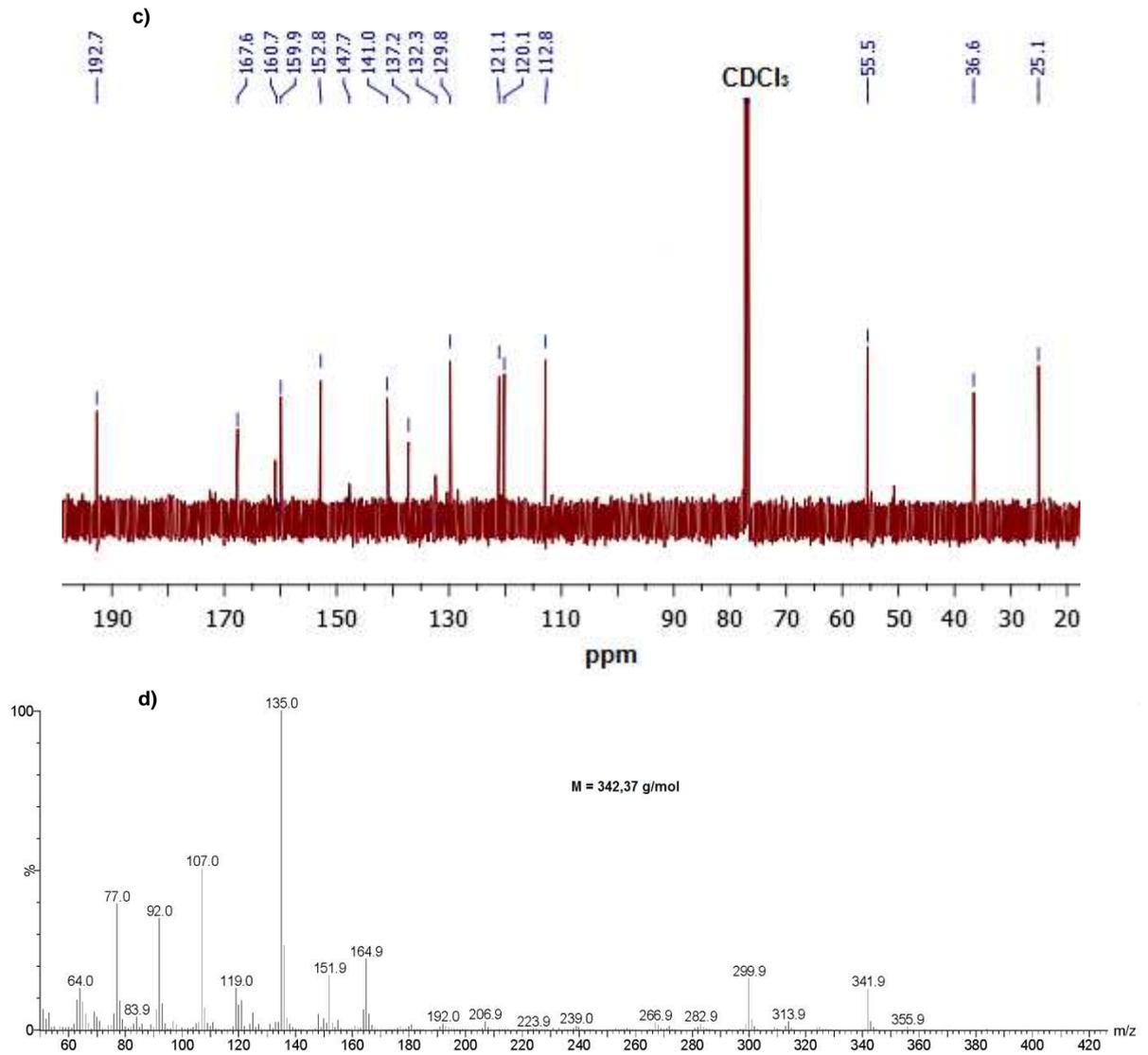
Anexo 3.9 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B2: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.



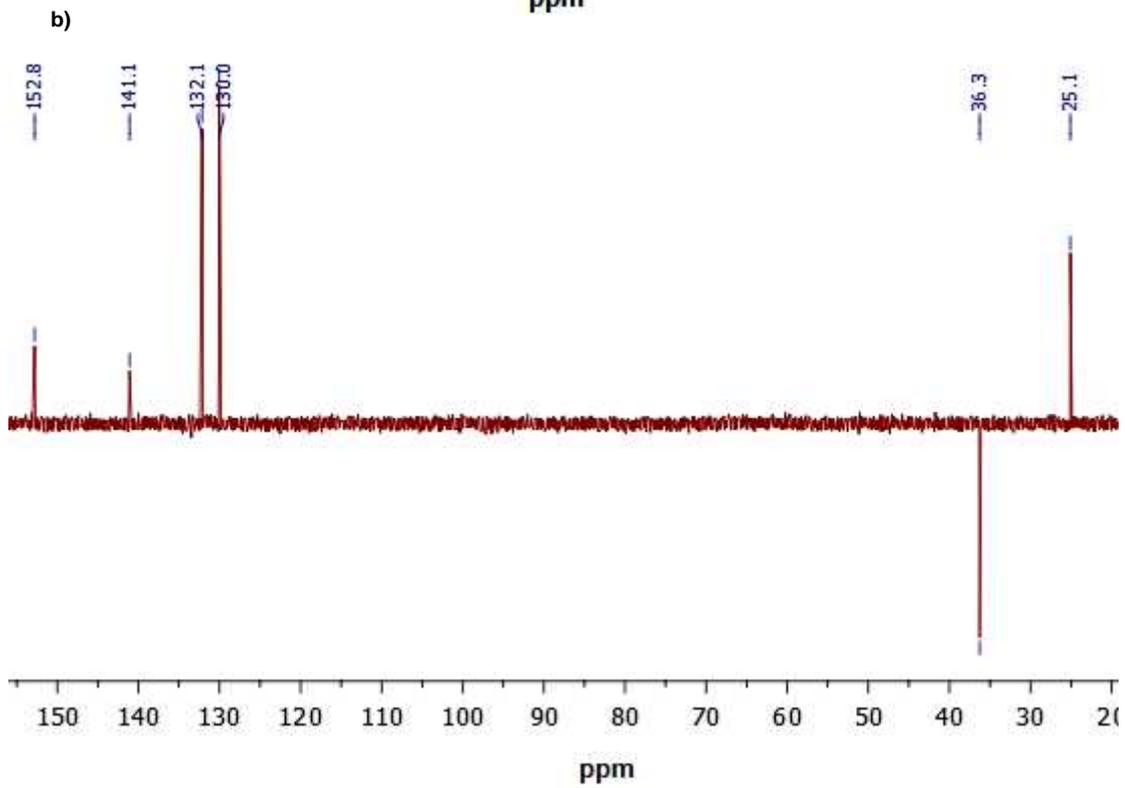
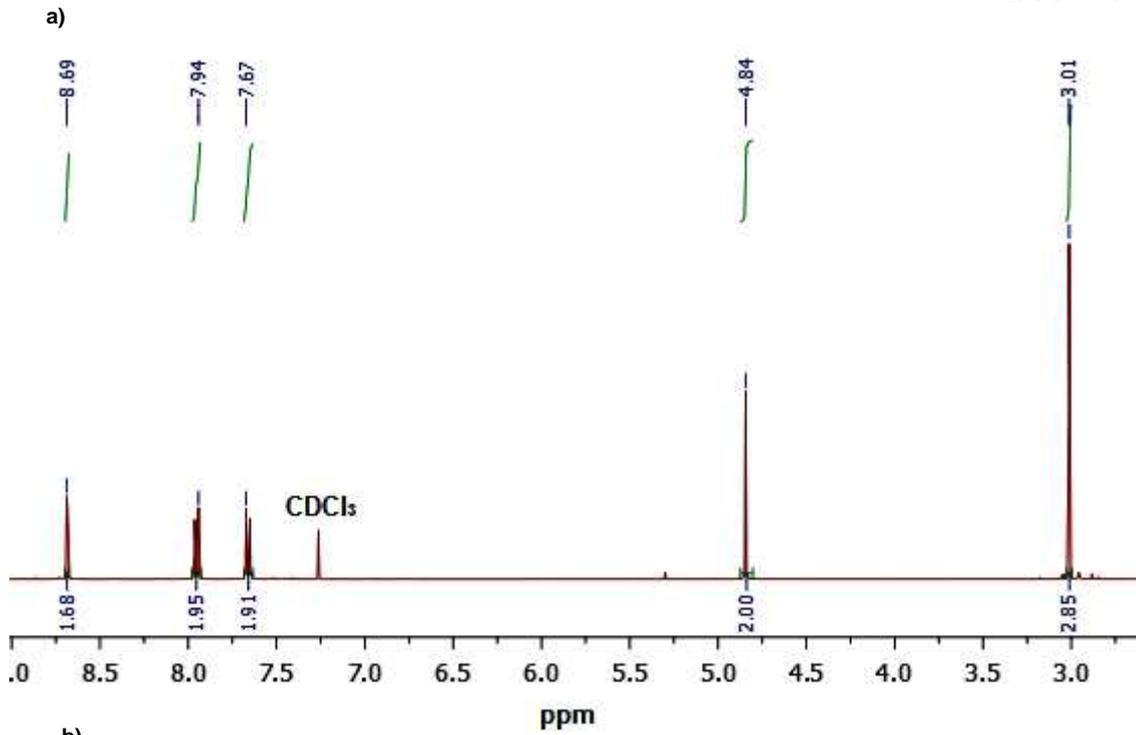


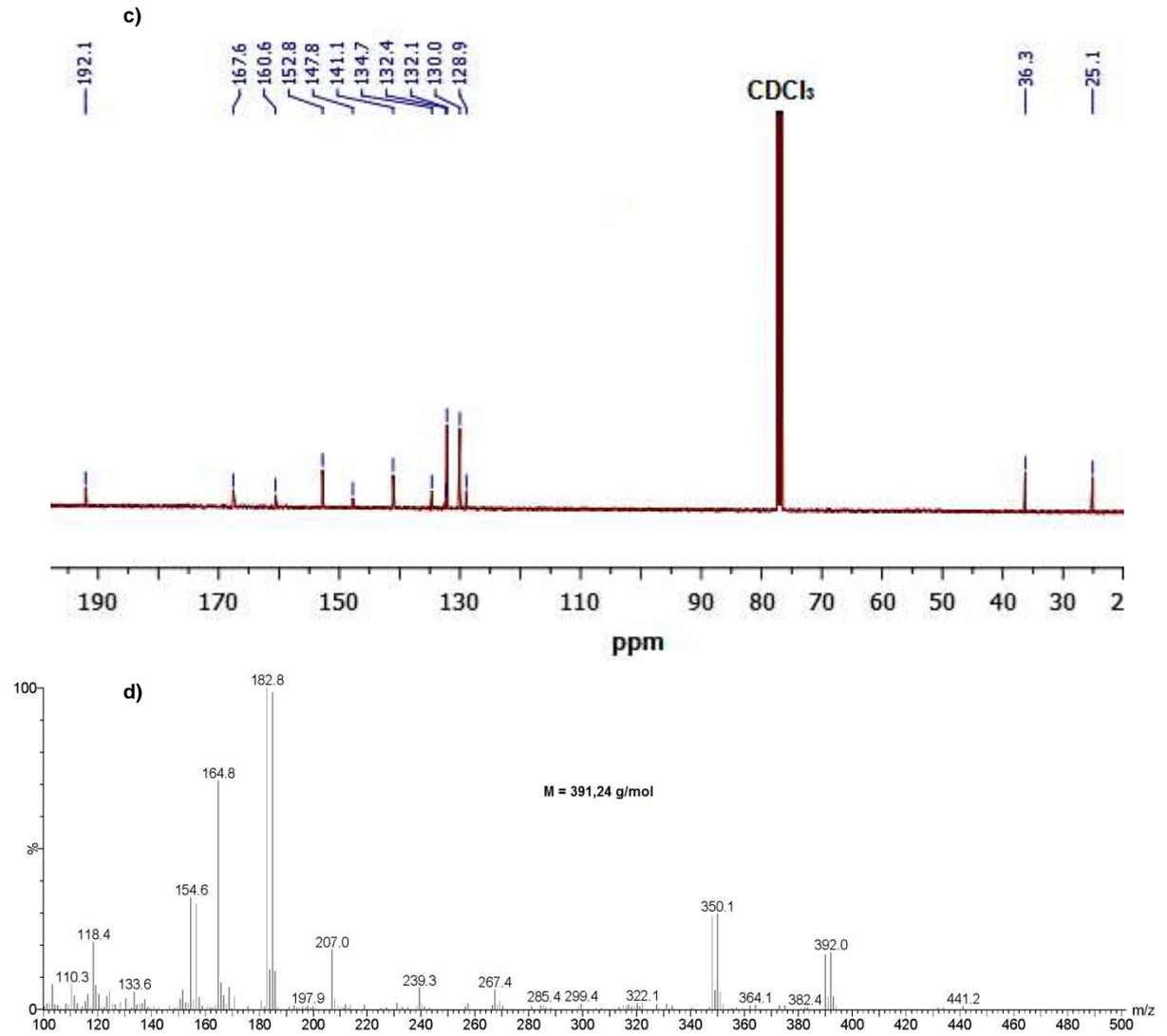
Anexo 3.10 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B4: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.



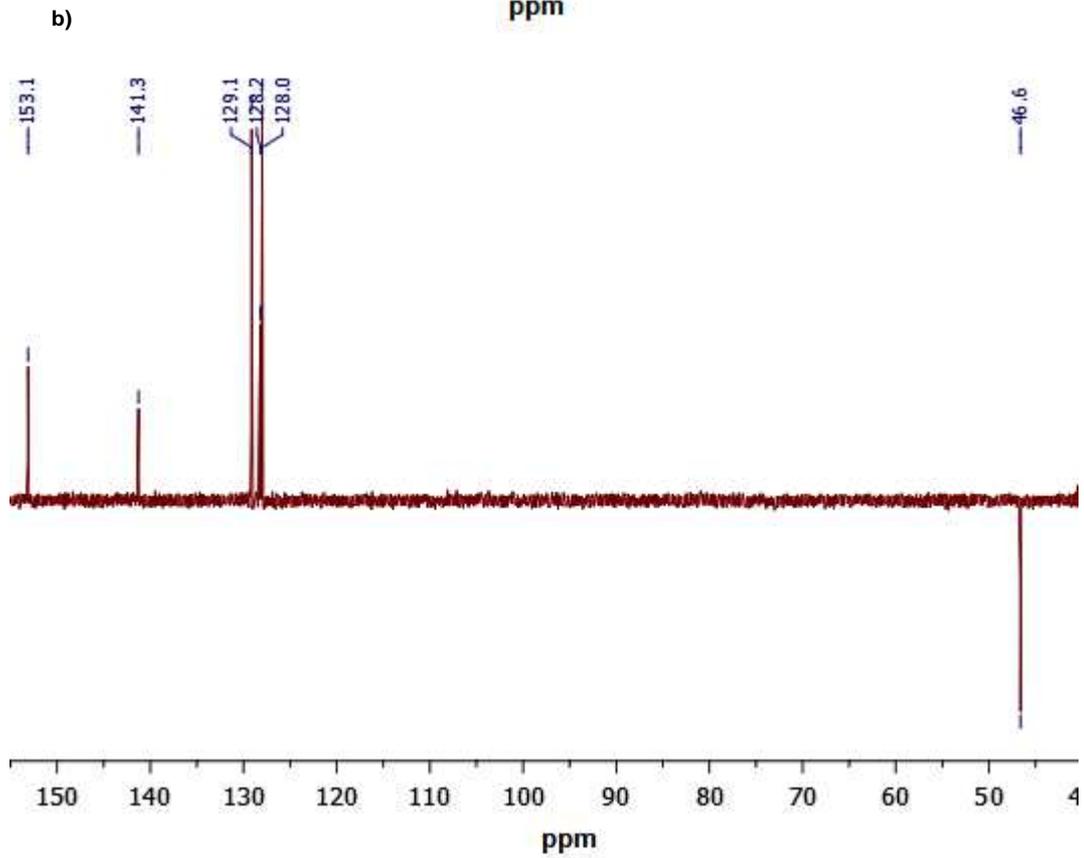
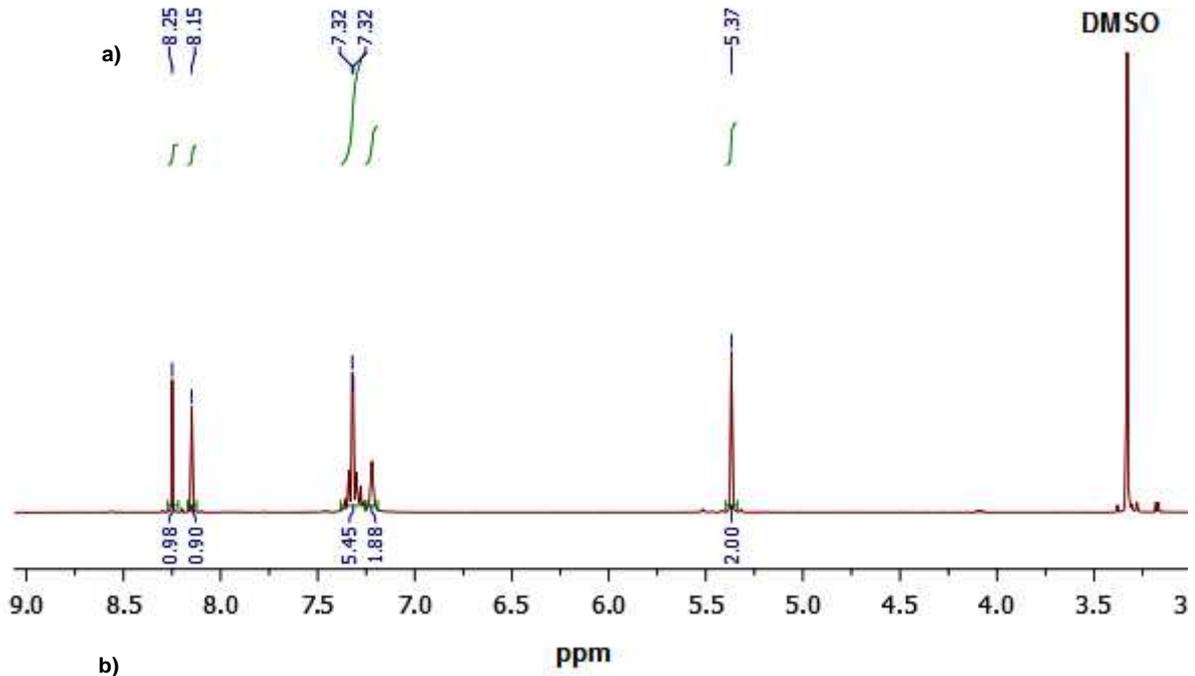


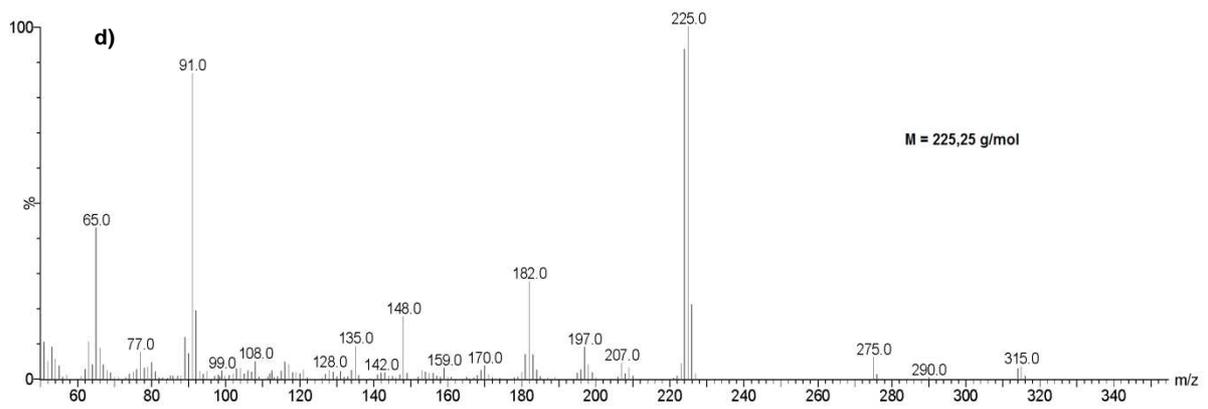
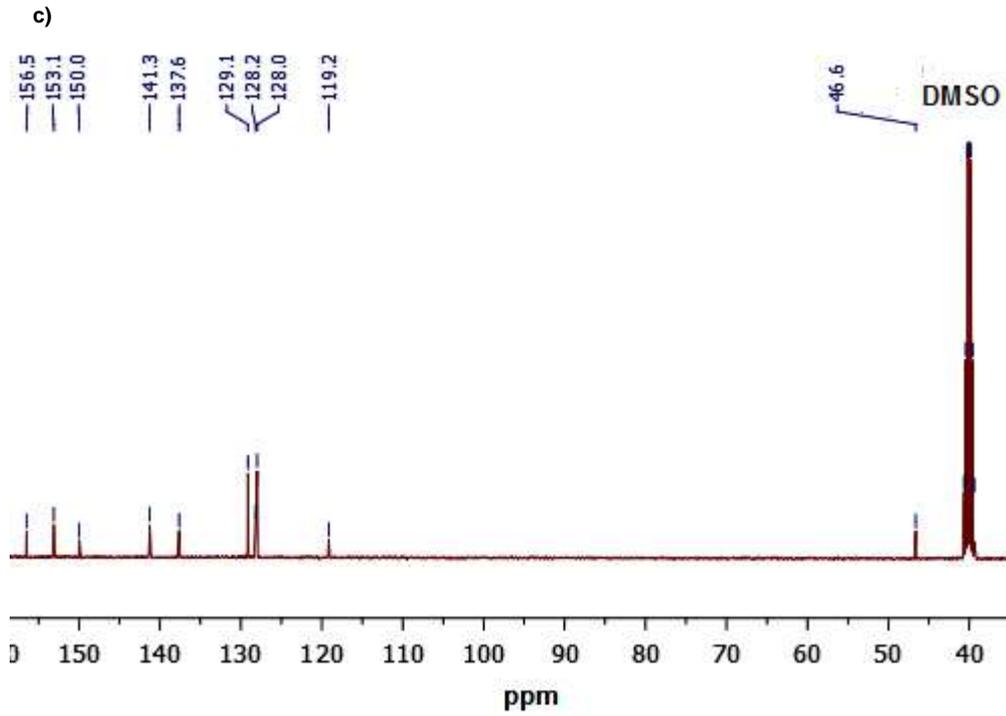
Anexo 3.11 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B5: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.





Anexo 3.12 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto B6: a) RMN ¹H (CDCl₃); b) DEPT (CDCl₃); c) de ¹³C (CDCl₃); d) EM/IE.





Anexo 3.13 - Técnicas utilizadas na caracterização do composto C: a) RMN ^1H (DMSO); b) DEPT (DMSO); c) de ^{13}C (DMSO); d) EM/IE.