



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Ricardo Jorge Rodrigues Nunes

**Síntese e testes *in vitro* de novas
pirimido[5,4-d]pirimidinas em células
resistentes do cancro colorectal**

Tese de Mestrado

Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efetuado sob a orientação da

Doutora Maria Alice Carvalho

e da

Doutora Cristina Maria Pereira Wilson

DECLARAÇÃO

Nome: Ricardo Jorge Rodrigues Nunes

Endereço Eletrónico: ricardo_nunes000@hotmail.com

Número do bilhete de identidade: 13586403

Título da dissertação:

Síntese e testes *in vitro* de novas pirimido[5,4-*d*]pirimidinas em células resistentes do cancro coloretal

Orientadoras:

Professora Doutora Maria Alice Carvalho

Professora Doutora Cristina Pereira Wilson

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado em Química Medicinal

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, ___/___/____

Assinatura: _____

Agradecimentos

O desenvolvimento desta tese, só foi possível através do apoio de inúmeras pessoas que tiveram uma influência direta ou indireta para a sua elaboração e concretização.

À Doutora Cristina Pereira Wilson, pela disponibilidade com que me acolheu no seu laboratório e pelos ensinamentos na área de ensaios biológicos.

Ao Departamento de Química da Universidade do Minho, pelas condições disponibilizadas.

Ao Departamento de Biologia, por me ter acolhido de forma a poder realizar os ensaios biológicos.

À Dr.^a Elisa Pinto e Dr.^a Vânia Azevedo, pela simpatia e constante disponibilidade na aquisição de espectros de RMN e na realização de análises elementares.

À Raquel Sousa, por toda a dedicação e disponibilidade para o ensinamento dos ensaios biológicos.

A todos os meus colegas do laboratório, Ashly, Soraia, Juliana e João, por todo o apoio durante o ano.

Aos meus colegas de mestrado, Joana, João, Juliana, Eva, David, Soraia e Orlando por todo o apoio, presença, alegria e boa disposição e acompanhamento ao longo destes dois anos.

À Joana, por estar sempre presente nos momentos em que mais precisava, pela força e dedicação e por todo o amor que me deu.

E principalmente aos meus pais, porque sempre me apoiaram, encorajaram durante todo o meu caminho e porque sem eles nada disto seria possível.

Resumo

O cancro coloretal é a terceira causa de morte, associado a doenças oncológicas, em todo o mundo. O seu aparecimento, principalmente em países desenvolvidos, está relacionado com um estilo de vida sedentário e os maus hábitos alimentares. O diagnóstico de cancros resistentes aos fármacos utilizados tem, contribuído para a necessidade de desenvolvimento de novos compostos com atividade anticancerígena, que consigam vencer a resistência adquirida dos tumores.

Neste trabalho, novos derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas foram sintetizados por reação da 8-hidrazinil-*N*-fenilpirimido[5,4-*d*]pirimidina-4-amina com diferentes aldeídos e anidridos cíclicos. As reações foram realizadas em DMSO, com ou sem catálise ácida, respetivamente.

A reatividade entre a 8-hidrazinil-*N*-fenilpirimido[5,4-*d*]pirimidina-4-amina com diferentes ésteres e imidato foi igualmente estudada, verificando-se uma diferença com os estudos previamente efetuados.

A atividade biológica dos compostos foi avaliada *in vitro* na linha celular HCT-116 (*p53-wt*). Neste trabalho foi efetuado um estudo do efeito dos diferentes substituintes na posição C4, do anel de pirimidina, mantendo-se o substituinte em C8 fixo (R=Ph).

Os derivados que apresentaram uma percentagem de inibição de viabilidade celular superior a 50% foi determinado o seu IC₅₀. Os derivados com grupos planares, com substituintes em posições específicas, revelaram ser os mais ativos.

Abstract

Colorectal cancer is the third most common cause of cancer deaths worldwide. It is diagnosed, mainly in developed countries where sedentary lifestyles and poor eating habits are common.

The diagnosis of drug resistant cancers, has contributed a need for the development of new anticancer compounds which could combat the acquired resistance of tumours.

Herein, pyrimido[5,4-*d*]pyrimidine derivatives were synthesized by reacting 8-hydrazinyl-*N*-phenylpyrimido[5,4-*d*]pyrimidin-4-amine with aldehydes and anhydrides.

The reactivity between 8-hydrazinyl-*N*-phenylpyrimido[5,4-*d*]pyrimidin-4-amine with different esters and imidate was also investigated, in which differences in reactivity were observed.

All the synthesized compounds were fully characterized by physical and spectroscopic techniques (^1H and ^{13}C NMR), infra-red, elemental analysis and melting points.

The biological activity of these newly synthesized compounds along with other pyrimido[5,4-*d*]pyrimidine derivatives, was evaluated in the cellular line type, HCT 116 (*p53-wt*). The new derivatives, with substituents in specific positions, in the aryl group in the R^1 position, revealed to be the most active. SAR studies showed that the activity was related with the substituent in position C4 and C8 of the pyrimido pyrimidine core ring.

The IC_{50} values of derivatives that showed an inhibition percentage greater than 50% of the cellular viability had their IC_{50} determined. The derivatives with planar substituents in specific positions prove to be the most active.

Lista de abreviaturas

^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
5'DFUR	5'-deoxi-5-fluorouridina
5-FU	5-fluorouracilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANRORC	Adição do nucleófilo, abertura do anel, fecho do anel
ARN	Ácido ribonucleico
Comp.	Composto
CPT-11	Irinotecan
CRC	Cancro colo-rectal
d	Dupleto (nas descrições de ^1H RMN)
DCC	Diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto (nas descrições de ^1H RMN)
DIC	Di-isopropilcarbodiimida
DMAP	4 - (<i>N,N'</i> -dimetilamino)piridina
DMF	Dimetil formamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DMSO- d_6	Sulfóxido de dimetilo deuterado
DPD	Di-hidropirimidina dehidrogenase
dUTP	Trifosfato de deoxiuridina
EGF	Fator de crescimento epidérmico

EGFR	Recetor do fator epidermal de crescimento
Equiv.	Equivalentes
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
f	Fraco (nas descrições de IV)
FDA	Food and Drug Administration
FdUMP	Monofosfato de fluorodeoxiuridina
FdUTP	Trifosfato de fluorodeoxiuridina
FUTP	Trifosfato de fluorouridina
h	Horas
HMBC	Acrónimo do inglês <i>Heteroatom Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	Acrónimo do inglês <i>Heteroatom Multiple Quantum Correlation</i>
i	Intenso (nas descrições de IV)
<i>i</i>	<i>Ips</i> o (nas descrições de ¹ H RMN)
IFN	Interferons
IV	Infravermelho
LV	Leucovorina
m	Médio (nas descrições de IV)
<i>m</i>	<i>Meta</i> (nas descrições de ¹ H RMN)
mCRC	Metastatic colorectal cancer
MDR	Multi-drug resistance

MTT	Do acrónimo em inglês 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MTX	Metotrexato
NSAID	Non-specific anti-inflammatory
<i>o</i>	<i>Orto</i> (nas descrições de ¹ H RMN)
<i>p</i>	<i>Para</i> (nas descrições de ¹ H RMN)
PBS	Do acrónimo em inglês phosphate buffered saline
P-gp	Glicoproteína permeável
PP	Pirimido pirimidinas
ppm	Partes por milhão (nas descrições de ¹ H RMN)
Prod.	Produto
rARN	Ácido ribonucleico ribossomal
<i>s</i>	Singleto (nas descrições de ¹ H RMN)
<i>s/</i>	Singleto largo (nas descrições de ¹ H RMN)
snARN	Pequeno ácido ribonucleico nuclear
<i>t</i>	Tripleto (nas descrições de ¹ H RMN)
t.a.	Temperatura Ambiente
tARN	Ácido ribonucleico transportador
TFA	Ácido trifluoroacético (acrónimo do inglês <i>Trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia de placa fina

TNM	Tumour lymph nodes metastasis
TP	Timidina fosforilase
TS	Timilidase sintase
UP	Uridina fosforilase
VEGF	Fator endotelial vascular de crescimento

Índice

Capítulo 1. Introdução.....	1
1. Introdução	3
1.1. O cancro do cólon.....	3
1.2. Estágios de tumores e tratamento	4
1.3. Mecanismo de ação do 5-FU.....	6
1.4. Mecanismo de resistência.....	10
1.5. Novos fármacos aprovados em quimioterapia.....	13
1.6. Fármacos em desenvolvimento.....	14
1.7. Síntese de pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas	16
1.8. A partir de derivados de uracilo	17
1.9. A partir de aminopirimidinas.....	18
1.10. A partir de pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas tetra-cloradas	22
1.11. A partir de purinas	25
1.12. Objetivos de trabalho	29
Capítulo 2. Discussão de Resultados	31
2. Discussão de Resultados	33
2.1. Síntese de reagentes de partida	34
2.2. Reação da 6-cianopurina com aminas nucleofílicas.....	35
2.2.1. Reação com aminas nucleofílicas	35
2.3. Reatividade de 3,4-dihidropirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas	37
2.3.1. Conversão de 3,4-dihidropirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas nos derivados aromáticos	37
2.3.2. Reação com acetona	43
2.3.2.1. Dados analíticos da pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidina 10	44
2.3.2.2. Dados espectroscópicos de IV	44
2.3.2.3. Dados espectroscópicos de ¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400MHz)	45
2.3.2.4. Dados espectroscópicos de ¹³ C RMN (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100MHz).....	45
2.3.2.5. Mecanismo de reação com acetona	46
2.4. Reação da pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidina 8c com eletrófilos.....	46
2.4.1. Aldeídos	46
2.4.2. Caracterização analítica e espectroscópica dos compostos 11	48
2.4.3. Dados físicos e analíticos	48
2.4.4. Dados analíticos das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 11	49
2.4.5. Dados espectroscópicos IV	51

2.4.6. Dados espectroscópicos de ¹ H RMN (DMSO-d ₆ , 400MHz) para os compostos 11	54
2.4.7. Dados espectroscópicos de ¹³ C RMN (DMSO-d ₆ , 100MHz) para os compostos 11	59
2.4.8. Mecanismo de reação com aldeídos.....	63
2.5. Anidridos	64
2.5.1. Dados físicos e analíticos	69
2.5.2. Dados espectroscópicos de IV.....	70
2.5.3. Dados espectroscópicos de ¹ H RMN (DMSO, 400MHz) para os compostos 12	70
2.5.4. Dados espectroscópicos de ¹³ C (DMSO-d ₆ ,100MHz) para os compostos 12	72
2.5.5. Mecanismo geral de reação com anidridos.....	74
2.6. Ésteres	75
2.6.1. Tentativa de reação com dimetil fumarato	75
2.6.2. Tentativa de reação com dietil oxalato.....	76
2.6.3. Tentativa de reação com imidato.....	78
2.6.4. Tentativa de reação com imidatopurina.....	79
2.7. Tentativas de redução da imina da cadeia lateral.....	80
2.8. Atividade biológica das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas.....	82
2.9. Morfologia Celular.....	92
Capítulo 3. Conclusão e perspectivas futuras.....	95
3. Conclusão e perspectivas futuras	97
Capítulo 4. Parte Experimental	99
4.1. Procedimentos Gerais.....	101
4.2. Síntese das 7,8-dihidropirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidin-4-amina 7	101
4.3. 2-(8-anilino-4-iminopirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-3(4<i>H</i>)-il)etanol – 7b	102
4.4. 4-imino-<i>N</i>8-fenilpirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidina-3,8(4<i>H</i>)-diamina – 7c	102
4.5. Síntese das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 8	103
4.5.1. 8-Anilinopirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-amina <i>O</i>-Benziloxima – 8a	103
4.5.2. 2-[(8-anilinopirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-il)amino]etanol – 8b	104
4.5.3. 8-hidrazinil-<i>N</i>-fenilpirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-amina – 8c	104
4.5.4. <i>N</i>-fenil-8-(2-(propan-2-ilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-amina - 10	105
4.6. Síntese das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 11	105
4.6.1. Procedimento geral	105
4.6.2. (<i>Z</i>)-8-(2-benzilidenohidrazinil)-<i>N</i>-fenilpirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-amina – 11a	106

4.6.3. (Z)-8-(2-(4-morfolinobenzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11b	106
4.6.4. N-fenil-8-((Z)-2-((E)-3-fenilalilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina– 11c	107
4.6.5. (Z)-8-(2-((1H-indol-3-il)metileno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11d	107
4.6.6. (Z)-2,6-dimetoksi-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pyrimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11e.....	107
4.6.7. (Z)-3-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol – 11f.....	108
4.6.8. (Z)-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol – 11g	108
4.6.9. (Z)-2-metoksi-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11h	108
4.6.10. (Z)-8-(2-(3,3-difenilalilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11k.....	109
4.6.11. (Z)-5-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)tiazol-2-amina – 11l.....	109
4.6.12. (Z)-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol – 11m.....	110
4.6.13. (Z)-4-cloro-2-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11n	110
4.6.14. (Z)-2-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,4-diol – 11o	110
4.6.15. (Z)-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11p	111
4.6.16. (Z)-2-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzene-1,3,5-triol – 11q.....	111
4.6.17. (Z)-2-metoksi-6-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11r	111
4.6.18. (Z)-5-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzene-1,2,3-triol – 11s	112
4.6.19. (Z)-8-(2-(2-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11t	112
4.6.20. (Z)-8-(2-(2,5-diclorobenzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11u	112
4.6.21. (Z)-2-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11v.....	113
4.6.22. (Z)-8-(2-(4-cloro-3-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11w.....	113
4.6.23. (Z)-3-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11x.....	113

4.6.24. 2,6-dimetoxi-4-((1<i>E</i>,3<i>Z</i>)-3-(2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-il)hidrazono)prop-1-en-1-il)fenol – 11y	114
4.6.25. (<i>Z</i>)-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzene-1,3-diol - 11z	114
4.6.26. (<i>Z</i>)-8-(2-(4-metoxibenzilideno)hidrazinil)-<i>N</i>-fenilpirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-amina – 11aa	114
4.6.27. (<i>Z</i>)-8-(2-(2,3-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)-<i>N</i>-fenilpirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-amina – 11ab	115
4.6.28. (<i>Z</i>)-8-(2-(2,5-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)-<i>N</i>-fenilpirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-amina – 11ac	115
4.7. Síntese das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 12	115
4.7.1. Método de síntese geral	115
4.7.2. Ácido 4-oxo-4-(2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-il)hidrazinil)butanoico – 12a	116
4.7.3. Ácido (<i>Z</i>)-4-oxo-4-(2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-il)hidrazinil)but-2-enoico – 12b	116
4.7.4. Ácido 2-(2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-<i>d</i>]pirimidin-4-il)hidrazinacarbonil)benzoico – 12c	117
4.8. Procedimento experimental para a avaliação da atividade anti cancerígena... 117	
4.9. Compostos testados e reagentes	117
4.10. Testes de solubilidade	117
4.11. Linha celular e condições de cultura	118
4.12. Plaqueamento de células	119
4.13. Observação microscópica	120
4.14. Ensaio de MTT/Teste de citotoxicidade	120
Capítulo 5. Bibliografia	123
Anexos	129

Índice de Esquemas

Esquema 1.....	17
Esquema 2.....	18
Esquema 3.....	19
Esquema 4.....	20
Esquema 5.....	21
Esquema 6.....	22
Esquema 7.....	23
Esquema 8.....	24
Esquema 9.....	24
Esquema 10	25
Esquema 11	26
Esquema 12	27
Esquema 13	28
Esquema 14	28
Esquema 15 - Mecanismo de obtenção das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas.....	33
Esquema 16 - Síntese da 6-cianopurina 6	34
Esquema 17 - Síntese das pirimido pirimidinas 7	36
Esquema 18 - Conversão da pirimido pirimidina não aromática 7 na sua forma aromática 8	38
Esquema 19 - Síntese das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 8	38
Esquema 20 – Reação de 7a com piperidna em DMSO	39
Esquema 21 - Mecanismo de reação para a obtenção de 8b-c	43
Esquema 22 - Síntese do composto 10	44
Esquema 23 - Mecanismo de reação para a obtenção de 10	46
Esquema 24 – Reação da pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidina 8c com aldeídos	48
Esquema 25- Mecanismo de síntese das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 11	63
Esquema 26 - Síntese das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 12a-c	65
Esquema 27 - Mecanismo de reação da pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidina 8c com anidridos ..	74
Esquema 28 – Tentativa de síntese para a obtenção das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 13	75
Esquema 29 – Tentativa de reação com dietil oxalato	76
Esquema 30 – Tentativa de síntese para a obtenção da pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidina 15 . 78	
Esquema 31 - Tentativa de síntese para a obtenção da pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidina 18 ..	80

Esquema 32 - Tentativa de redução para a obtenção da pirimido[5,4-d]pirimidina **19 81**

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Dados analíticos da pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidina 10	44
Tabela 2 - Dados espectroscópicos de IV do composto 10	44
Tabela 3 - Dados espectroscópicos de ¹ H RMN do composto 10	45
Tabela 4 - Dados espectroscópicos de ¹³ C RMN do composto 10	45
Tabela 5 - Dados analíticos das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 11	49
Tabela 6 - Dados espectroscópicos de IV dos compostos 11	52
Tabela 7 - Dados espectroscópicos de ¹ H RMN (400MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) dos compostos 11	55
Tabela 8 - Dados espectroscópicos de ¹³ C (100MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) dos compostos 11	60
Tabela 9 - Dados analíticos das pirimido[5,4- <i>d</i>]pirimidinas 12	69
Tabela 10 - Dados espectroscópicos de IV dos compostos 12	70
Tabela 11 - Dados de ¹ H RMN (400MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) dos compostos 12	71
Tabela 12 - Dados espectroscópicos de ¹³ C (100MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) dos compostos 12 ..	73
Tabela 13 - Viabilidade celular das células HCT116 (<i>p53-wt</i>) na presença dos compostos testados a 10µM e o valor de IC ₅₀ . Valores resultantes da média ± desvio padrão obtidos de três experiências independentes	83
Tabela 14 - Viabilidade celular das células HCT116 (<i>p53-wt</i>) na presença dos compostos testados a 10µM e o valor de IC ₅₀ . Valores resultantes da média ± desvio padrão obtidos de três experiências independentes	86

Índice de Figuras

Figura 1 - Incidência de cancro colorectal mundialmente por 100000 habitantes.....	3
Figura 2 - Incidência de cancro colorectal em Portugal por 100000 habitantes.....	4
Figura 3 - Estrutura química dos fármacos aprovados pela FDA para o tratamento de CRC.....	5
Figura 4 - Estrutura química dos fármacos aprovados pela FDA para o tratamento de CRC.....	7
Figura 5 - Inibição da TS: A inibição da timidilase síntase resulta numa acumulação de FdUMP, o que leva a um aumento dos níveis de FdUTP. Tanto o dUTP (trifosfato de deoxiuridina) como o metabolito FdUTP podem ser mal incorporados no ADN, levando à quebra da cadeia de ADN e à morte celular. ⁷ Má incorporação no ARN: O metabolito FTUP é extensamente incorporado no ARN, desregulando processos e funções normais. Além de inibir o processo de pré-rARN para ARN maduro, desregula modificações no tARN transcrito e a montagem e a atividade dos complexos proteicos snARN, inibindo assim a duplicação do pre-ARN. ⁷	8
Figura 6 - Mecanismo de ação da capecitabina.....	9
Figura 7 - Estruturas químicas dos inibidores de MDR de terceira geração.....	11
Figura 8 - Sistemas de distribuição de fármacos	13
Figura 9 - Estruturas químicas de fármacos sob estudos clínicos para quimioterapia de CRC.....	16
Figura 10 - Gráfico da composição da mistura reacional.....	41
Figura 11 - Expansão do gráfico	41
Figura 12 - Espectro de ¹ H RMN do composto 12a obtido a 400MHz em DMSO-d ₆	67
Figura 13 - Espectro de ¹³ C do composto 12a obtido a 100MHz em DMSO-d ₆	67
Figura 14 - Expansão do espectro de HSQC do composto 12a obtido a 100MHz em DMSO-d ₆	68
Figura 15 - Expansão do espectro de HMBC do composto 12a obtido a 100MHz em DMSO-d ₆	68
Figura 16	83
Figura 17 - Morfologia celular da linha celular HCT116 (p53-wt). As imagens em cima foram obtidas com um microscópio invertido Olympus IX71 com uma câmara em modo de contraste de fase após incubação do composto 11v a 10µM (b), a 5µM (c) e 1µM (d). Imagem a) é referente ao controlo.	92
Figura 18 - Morfologia celular da linha celular HCT116 (p53-wt) após análise por MTT. As imagens em cima foram obtidas com um microscópio invertido Olympus IX71 com	

uma câmara em modo de contraste de fase após incubação do composto **11v** a $10\mu\text{M}$ (b), a $5\mu\text{M}$ (c) e $1\mu\text{M}$ (d). Imagem a) é referente ao controlo 93

Capítulo 1. Introdução

1. Introdução

1.1. O cancro do cólon

O cancro do coloretal (CRC) é o terceiro tipo de cancro mais comum mundialmente. O cancro do cólon é mais frequente do que o cancro retal, sendo mais comum o aparecimento em países industrializados.¹

Nos EUA, é o terceiro cancro mais diagnosticado em homens e mulheres e a segunda causa de morte derivada por tumores.¹

Na Europa, cerca de 25000 novos casos de tumores são diagnosticados em cada ano, contabilizando cerca de 9% de todos os cancros registados, estimando-se que em 2014, cerca de 150000 adultos serão diagnosticados com cancro coloretal.²

Em Portugal, segundo dados de estatística da Direção Geral de Saúde, dados atualizados em Fevereiro de 2015, foram registados 35330 casos de cancro do coloretal com uma taxa de mortalidade de 30%, sendo a região do Alentejo a que apresenta maiores casos por 100000 habitantes.³

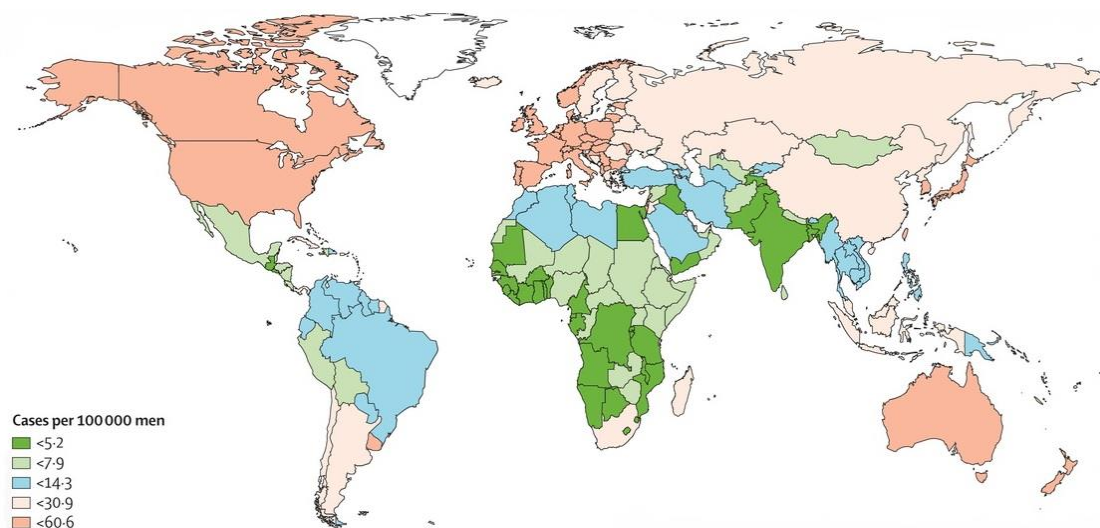


Figura 1 - Incidência de cancro coloretal mundialmente por 100000 habitantes

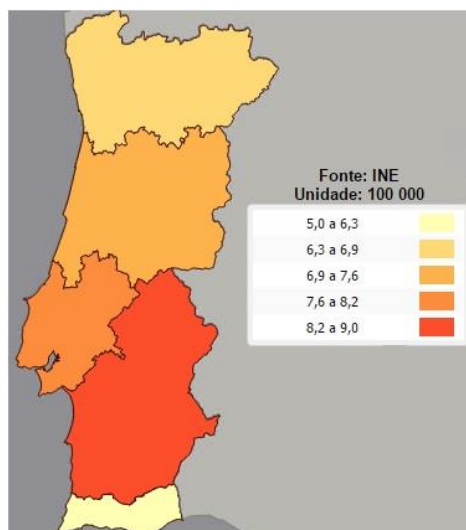


Figura 2 - Incidência de cancro colorectal em Portugal por 100000 habitantes

Os fatores de risco para o aparecimento do cancro estão associados à obesidade, dietas ricas em carnes vermelhas e processadas (porco, cordeiro e vaca), elevados consumos de álcool, tabagismo e baixa atividade física. Dietas que contenham fibras dietéticas, alho, leite e cálcio, provavelmente protegem contra o aparecimento destes tipos de cancro. Outros fatores de risco associados ao aparecimento do cancro, não relacionados com dietas, são devido a uso crónico de anti inflamatórios não esteróides (NSAIDs), doenças coloretais, predisposição genética e síndromes metabólicas. A idade é um importante fator de risco, estando mais sujeitos ao aparecimento indivíduos com idades superior a 65 anos.²

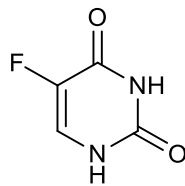
Embora se tenham desenvolvido novas técnicas de *screening* e tratamento, de forma a reduzir a mortalidade, os pré-diagnósticos de formas avançadas de CRC mantêm-se muito limitados.^{2,4}

1.2. Estágios de tumores e tratamento

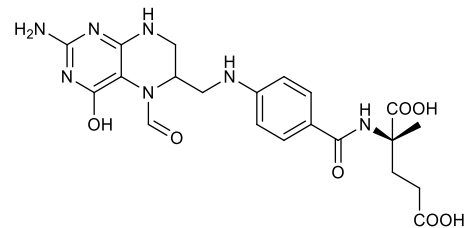
O tipo de tratamento adotado para cada estágio do tumor, segue preferencialmente as normas da classificação de tumores malignos (TNM). Os agrupamentos de estágios dividem-se em 3 estágios. Estágio I, em que o tumor

encontra-se limitado à parede do intestino (mucosa, submucosa e *muscularis* própria). O estágio II em que o tumor já se espalhou para o tecido extra mural, o estágio III em que nódulos já se encontram desenvolvidos e o estágio IV em que o tumor já apresenta metástases distantes.^{2,5}

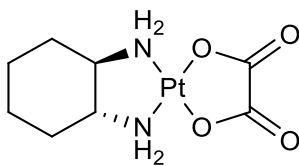
Para todos os estágios de tumores, a cirurgia é recomendada. O tratamento padrão utilizado, em tumores do tipo I, II e III, é a adjuvante (combinação) entre 5-FU/leucovorina (LV), com oxaliplatina ou CPT-11 (irinotecano), sendo recomendado para os estágios II e III. Os tratamentos combinatórios com os multiagentes, oxaliplatina e irinotecano, apresentam melhores resultados relativamente ao tratamento com apenas 5-FU/LV. As opções de tratamento para o estágio IV são a dissecação do tumor principal, tratamento das metástases isoladas (fígado, pulmão), quimioterapia paliativa, terapia biológica e terapia de radiação no tumor primário.⁵



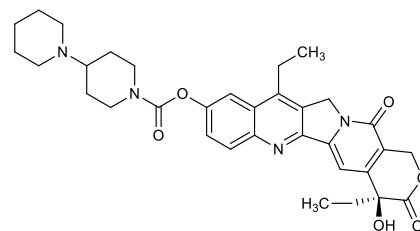
A: 5-fluorouracilo (5-FU)



B: Leucovorina



C: Oxaliplatina



D: Irinotecano

Figura 3 - Estrutura química dos fármacos aprovados pela FDA para o tratamento de CRC

O anti metabolito 5-fluorouracilo (5-FU) e a sua pró-droga capecitabina mantêm-se como terapias regulares no tratamento contra o cancro do cólon e são eficazes como parte de terapias de combinação, induzindo remissão.⁴

Hoje em dia, o 5-FU é mundialmente utilizado no tratamento de tumores sólidos, incluindo cancro mamário, sistema gastrointestinal, ovários, cabeça e pescoço. O 5-FU é rotineiramente administrado no tratamento do cancro coloretal através de dois métodos, ambos aprovados pela FDA, abreviando FOLFOX (FOL – ácido folínico (leucovorina), F – fluorouracilo (5-FU), OX – oxaliplatina) e FOLFIRI (FOL – ácido folínico (leucovorina), F – fluorouracilo (5-FU), IRI – irinotecano), ambas administradas através de regimes combinatórios quimioterapêuticos de primeira linha, envolvendo a administração intravenosa da base flurinada análoga.⁶

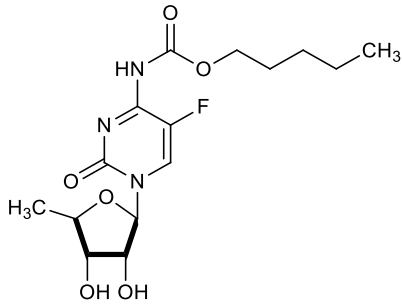
Novas abordagens na forma a melhorar o tratamento, envolve a utilização de novos agentes anti tumorais, como o irinotecano, um inibidor da topoisomerase I e a oxaliplatina, um composto de platina de terceira geração. Estes novos agentes têm sido utilizados e avaliados em pacientes com mCRC, em várias aplicações, tais como, testes clínicos de fase I-III, como mono terapia e em terapias de combinação com outros fármacos.⁷

Estes novos fármacos têm demonstrado uma boa segurança, falta de resistência cruzada ao 5-FU e uma atividade significativa em pacientes com cancro coloretal avançado, sendo usualmente utilizados em combinação com 5-FU/leucovorina.⁷

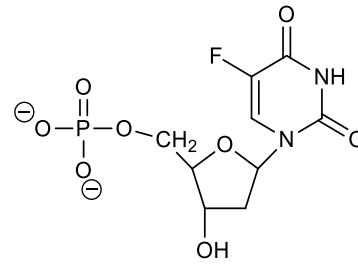
1.3. Mecanismo de ação do 5-FU

O 5-FU exerce um efeito anti proliferativo, devido a efeitos citotóxicos, através da inibição da timidilase sintase (TS) ou através da incorporação no ADN/ARN, fazendo decrescer os níveis de timidato e aumentando os níveis de uracilo que se incorpora no ADN, eventos que ativam a apoptose.⁶

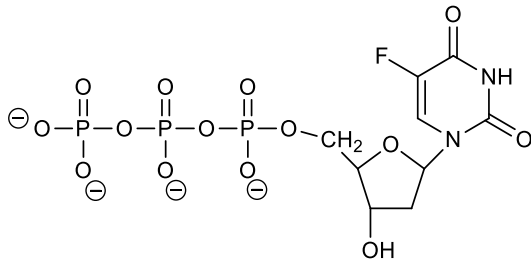
Como o 5-FU é um análogo estrutural do uracilo e da timina, muitas das enzimas que participam no metabolismo do uracilo e da timina metabolizam efetivamente o 5-FU, sendo convertido intra-celularmente em três metabolitos ativos que rompem a síntese de ARN: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) (**Figura 4F**), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) (**Figura 4G**) e trifosfato de fluorouridina (FUTP) (**Figura 4H**).^{6,8}



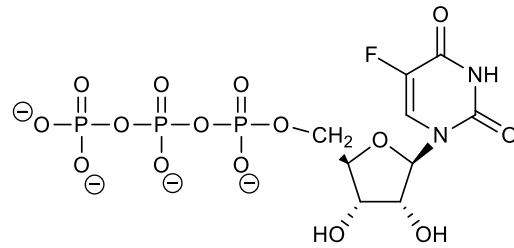
E: Capecitabina



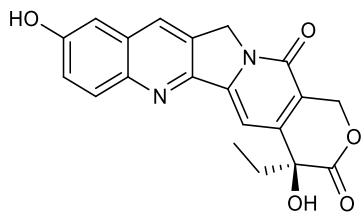
F: Monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP)



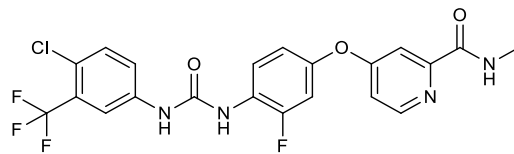
G: Trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUPT)



H: Trifosfato de fluorouridina (FUTP)



I: SN-38



J: Regorafenib

Figura 4 - Estrutura química dos fármacos aprovados pela FDA para o tratamento de CRC

O 5-FU atua sob a forma de dois mecanismos, a inibição da timidilase síntase e através de má incorporação no ARN.

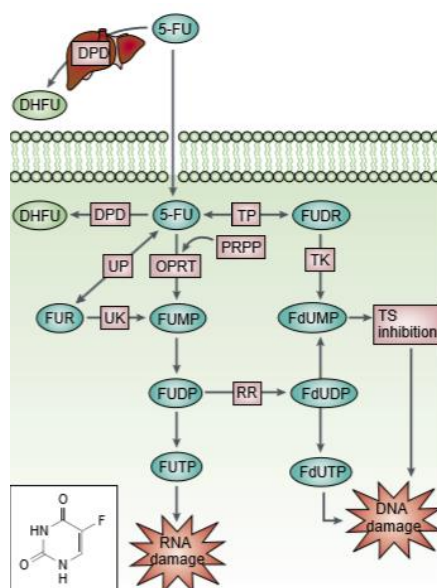


Figura 5 - Inibição da TS: A inibição da timidilase síntase resulta numa acumulação de FdUMP, o que leva a um aumento dos níveis de FdUTP. Tanto o dUTP (trifosfato de deoxiuridina) como o metabolito FdUTP podem ser mal incorporados no ADN, levando à quebra da cadeia de ADN e à morte celular.⁷ **Má incorporação no ARN:** O metabolito FTUP é extensamente incorporado no ARN, desregulando processos e funções normais. Além de inibir o processo de pré-rARN para ARN maduro, desregula modificações no tARN transcrito e a montagem e a atividade dos complexos proteicos snARN, inibindo assim a duplicação do pre-ARN.⁷

Apresentando rácios de resposta inferiores a 15%, devido à sua metabolização no fígado pela enzima DPD (di-hidropirimidina dehidrogenase) onde é maioritariamente expressa, testaram-se variadas formas para aumentar a resposta do 5-FU, desenvolvendo-se estratégias de modulação de forma a aumentar a atividade anticancerígena e superar a resistência. Testou-se o uso da leucovorina, utilizada de forma a aumentar a concentração interna de CH₂THF e a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do 5-FU em diversas linhas celulares, o desenvolvimento de inibidores da di-hidropirimidina dehidrogenase, o uso de metotrexato (MTX), um inibidor da di-hidrofolato redutase e o uso de interferons (IFNs), citocinas pleiotrópicas que exercem um efeito regulador negativo no crescimento de células normais ou malignas tanto *in vitro* como em *in vivo*.^{7,8}

A combinação de 5-FU com leucovorina produziu resultados promissores, aumentando a resposta ao tratamento para 23%. Foram testados, em

simultâneo, outros agentes de forma a comparar resultados de resposta aos tratamentos. Um desses agentes utilizados foi a capecitabina ^{8,9} (**Figura 4E**).

A capecitabina é um carbamato de fluoropirimidina de administração oral e é absorvida sem alterações na parede gastrointestinal, sendo utilizada, por este motivo como uma pró-droga. É convertida a 5'-deoxi-5-fluorouridina (5'DFUR) no fígado, onde é convertida posteriormente a 5-FU pela timidina fosforilase (TP) ou pela uridina fosforilase (UP) no tumor, evitando assim a degradação do 5-FU no fígado pela DPD.^{7,8}

A capecitabina demonstrou uma elevada eficácia no tratamento de primeira linha de tumores metastizados. Como a oxaliplatina demonstra uma excelente sinergia com 5-FU, com pouca toxicidade associada, o tratamento com XELOX (capecitabina e oxaliplatina) demonstrou uma melhor eficácia no tratamento de tumores metastizados de CRC, relativamente ao tratamento com FOLFOX.¹⁰

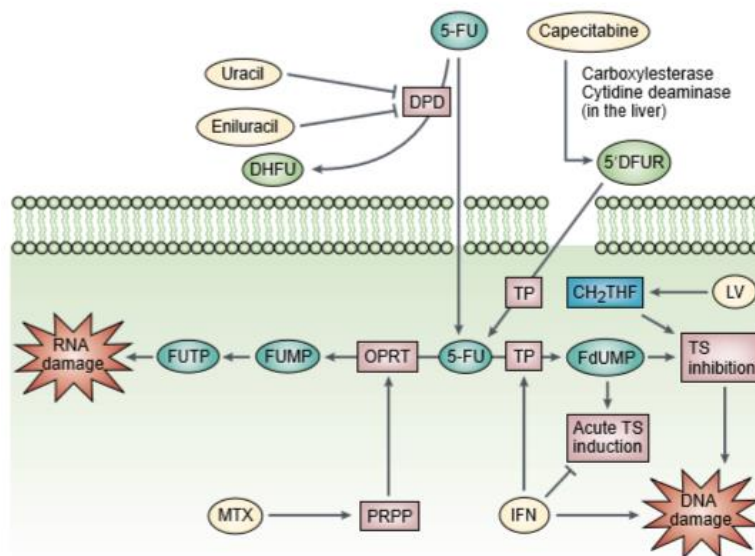


Figura 6 - Mecanismo de ação da capecitabina

1.4. Mecanismo de resistência

A resistência das células tumorais, aos efeitos citotóxicos e citoestáticos, dos fármacos utilizados que não apresentem um mecanismo de ação conjunto é conhecido como resistência multi fármacos (MDR), o que pode explicar o porquê de os tratamentos de combinação já não serem tão efetivos.¹¹

Células cancerígenas com MDR são dotadas de múltiplos mecanismos de sobrevivência, que podem resultar de:

- Captação limitada do fármaco;
- Efluxo aumentado do fármaco;
- Lípidos das membranas afetados (ceramidas)¹²;
- Metabolismo dos fármacos aumentado;
- Alvos dos fármacos alterados;
- Desintoxicação por compartimentalização;
- Bloqueio programado da morte celular (apoptose) ¹¹.

A glicosidação das ceramidas, através da síntase da glicosilceramida, permite às células um escape da indução programada de morte celular provocada pela ceramida, conferindo assim um mecanismo de resistência aos agentes anti-cancerígenos.¹²

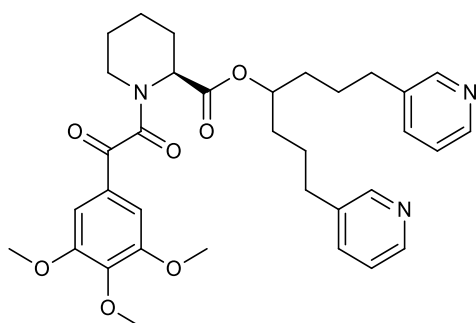
De forma a contornar a resistência aos fármacos usados atualmente no tratamento do mCRC, diversos esforços foram feitos para desenvolver e potenciar a entrega de fármacos orais com um alvo específico.

A primeira geração de inibidores de MDR consistia na utilização de fármacos já utilizados, tais como bloqueadores de canais de cálcio, imunossuppressores, antibióticos, anti malários ou anti esteróides.¹¹

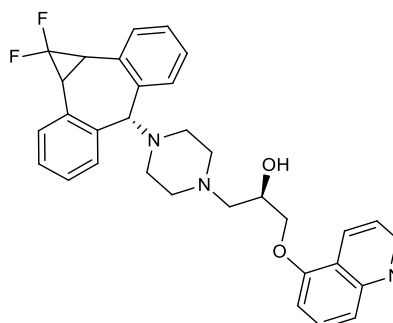
Visto que estes fármacos não eram desenvolvidos especificamente para inibir a MDR, existia o problema de elevada toxicidade e da baixa eficiência a doses toleráveis.¹¹

A segunda geração de inibidores, valspodar (uma macromolécula) e biricodar (um fármaco anti-neoplásico) (**Figura 7K**), foi desenvolvida de forma a aumentar a afinidade à P-gp (uma glicoproteína conhecida por ser a proteína associada a MDR) e reduzir a toxicidade a dosagens limitadas.

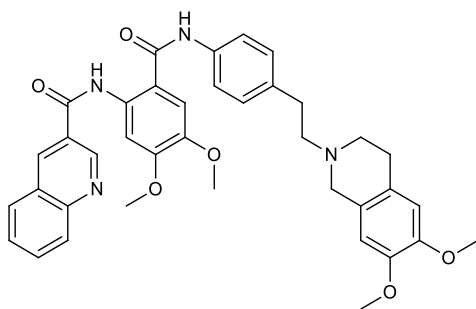
A terceira geração de inibidores, tais como zosuquidar (**Figura 7M**), tariquidar (**Figura 7N**) e elacridar (**Figura 7O**), foram especialmente desenvolvidos de forma a terem uma elevada afinidade com a P-gp e baixas interações farmacocinéticas.¹¹



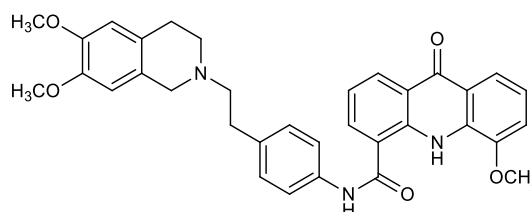
K: Biricodar



M: Zosuquidar



N: Tariquidar



O: Elacridar

Figura 7 - Estruturas químicas dos inibidores de MDR de terceira geração

O objetivo principal destes inibidores é maximizar os efeitos terapêuticos dos fármacos, através de sinergia ou ações aditivas sem aumentar a toxicidade. Estes fármacos, usados em combinação devem atuar com diferentes mecanismos, apresentar alguma eficácia por si só, terem diferentes níveis de toxicidades e desenvolver diferentes mecanismos de resistência.

Como já é conhecido há vários anos, fármacos à base de metais são extensamente utilizados em quimioterapia, tais como a cisplatina e seus derivados, apresentando uma elevada eficácia no tratamento de tumores. Podem também ser utilizados no tratamento e diagnósticos radio-farmacêuticos e como inibidores de enzimas para agentes terapêuticos, contudo apresentam efeitos secundários significativos.¹³

Os complexos metálicos beneficiam imensamente o sistema de transporte do fármaco, protegendo-o e potenciando a entrega do fármaco até ao tumor através de um modo passivo ou por marcação ativa, aumentando o tempo de meia vida na corrente sanguínea.¹³

Outra estratégia promissória para o tratamento de mCRC é o desenvolvimento de um sistema de distribuição de fármacos baseada em lipossomas ou nano-cápsulas, de forma a potenciar a entrega dos fármacos nas células tumorais e evitar a resistência aos fármacos.^{11,14}

Os métodos desenvolvidos para encapsulamento e distribuição dos fármacos são agrupados em quatro grupos: lipossomas, nano e micro partículas, nano esferas e β -ciclodextrinas.¹³

A encapsulação física consiste na incorporação do fármaco em polímeros transportadores. A quantidade de fármaco libertado é determinada pela compatibilidade entre o fármaco e a matriz do polímero. Quanto maior for a compatibilidade entre o fármaco e a matriz, maior será a capacidade de transporte e mais lentamente será libertado o fármaco.¹³

Os lipossomas consistem na formação de membranas esféricas com uma bicamada lipídica e um volume interno aquoso. Os lipossomas são considerados um sistema de transporte universal, visto que são adequados para o transporte de fármacos hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos¹³.

As nano ou micro partículas podem ser utilizadas para o transporte de fármacos, incluindo agentes anticancerígenos e agentes anti hipertensivos, ou então macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos e anticorpos. Geralmente o diâmetro das partículas varia entre 10 e 1000nm e o seu

desempenho varia consoante o seu tamanho ou morfologia, superfície química ou do peso molecular do polímero.¹³

As nano esferas são preparadas através de emulsões poliméricas, polimerização inter-facial ou evaporação do solvente. O problema associado às nano esferas está relacionada com a baixa eficiência da encapsulação do fármaco. O diâmetro das nano esferas varia entre 110 e 150nm e em testes *in vivo* demonstraram que a libertação do fármaco ocorre de uma forma mais controlada, a citotoxicidade associada ao fármaco encapsulado é inferior comparando com o fármaco livre e apresentam uma maior habilidade de libertação do fármaco no alvo e um prolongado tempo de circulação.¹³

As β -ciclodextrinas são, teoricamente, os candidatos ideais para o encapsulamento de fármacos, devido às suas propriedades de transporte de fármacos. Os complexos metálicos associados nas β -ciclodextrinas reduzem significativamente o rácio de difusão e degradação, causado pela interação com proteínas.¹³

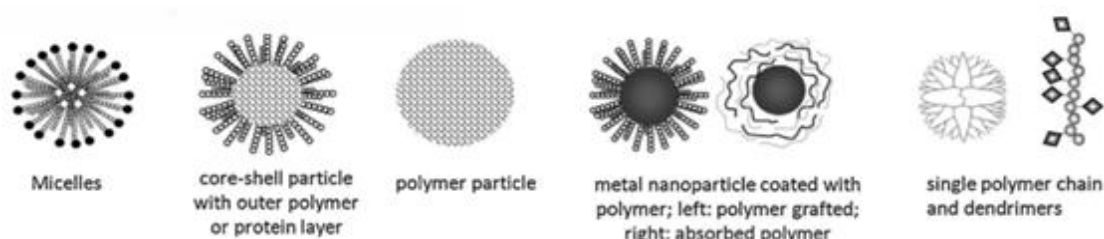


Figura 8 - Sistemas de distribuição de fármacos

1.5. Novos fármacos aprovados em quimioterapia

Dos novos fármacos utilizados em quimioterapia, o irinotecano é utilizado em tumores no estágio III (**Figura 3D**), e em pacientes que apresentem metástases. O irinotecano é também uma pró-droga, como a capecitabina, sendo convertido no seu metabolito ativo SN-38 (**Figura 4I**). Esta molécula anti-neoplásica inibe a

atividade da topoisomerase I, levando à quebra do ADN e, conseqüentemente a apoptose.¹⁵

O Regorafenib (**Figura 4J**), desenvolvido pela Bayer em 2012, é utilizado em cancros metastisados de doentes que já receberam diferentes tratamentos sem resultados. O regorafenib é um anti-VEGF (fator epitelial de crescimento vascular), impedindo o crescimento de novos vasos sanguíneos.

A leucovorina (**Figura 3D**) é utilizada como tratamento paliativo na quimioterapia, sendo administrado em conjunto com outros fármacos anti-neoplásicos, como o 5-FU.

A falta de seletividade e de alvos específicos destes fármacos resulta numa baixa eficácia dos tratamentos e elevados efeitos secundários.

Quando os carcinomas de CRC ganham a habilidade de se metastisar para outros órgãos, um diferente tipo de tratamento tem de ser utilizado. De forma a prevenir a metastisação de células cancerígenas, são utilizados anticorpos monoclonais humanizados, tais como Bevacizumab^{11,16}, Cetuximab^{11,16} e Panitumumab^{11,16,17}, sendo o primeiro direcionado para o VEGF, prevenindo a formação de novos vasos sanguíneos e os últimos dois direcionados para recetores de EGF (fator de crescimento epitelial).¹⁸

Recentemente foi aprovado pela FDA uma nova proteína recombinante ativa contra a angiogénese, o Aflibercept¹¹, sendo utilizado para o tratamento de metástases de CRC, numa segunda linha de tratamento, apresentando um avanço significativo comparativamente com os fármacos utilizados na fase III de tratamento.¹⁸

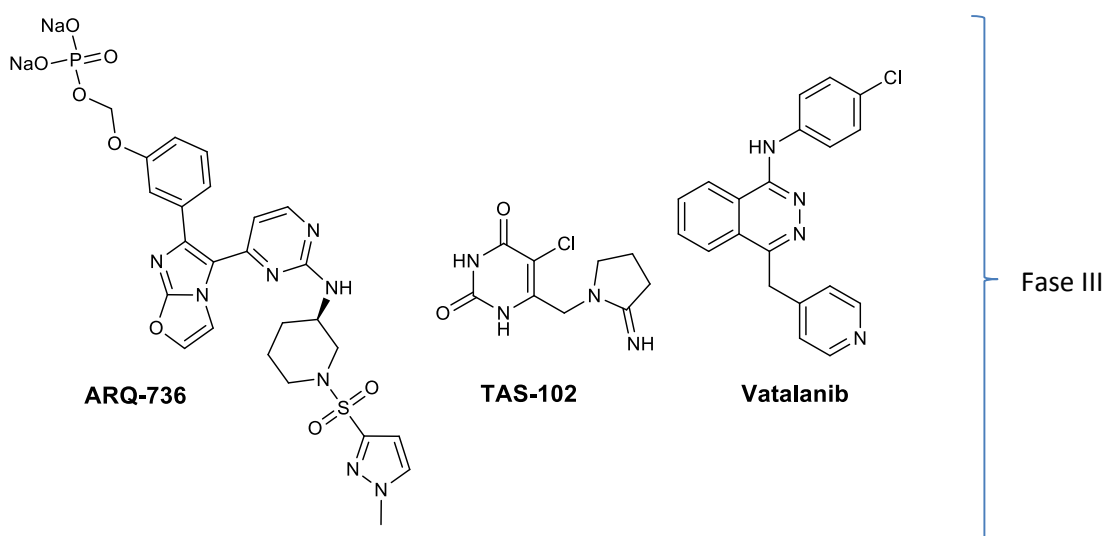
1.6. Fármacos em desenvolvimento

Atualmente quatro novos agentes terapêuticos, que tem como alvo os recetores de VEGF, encontram-se em estudos clínicos, tais como Ramucirumab, Icrucumab, Regorafenib e Vatalanib (**Figura 9**).

Em anos recentes, foi identificado um conjunto de oncogenes mutados no CRC, incluindo BRAF, KRAS, NRAS¹⁹, com frequências significativas, 6% (NRAS) até 40% (KRAS). Através destas observações foi possível identificar a existência de uma forma de resistência, quer intrínseca ou adquirida, dos tumores aos fármacos^{19,20}.

Estas mutações foram identificadas como estando associadas à falta de resposta ao Cetuximab e Panitumumab¹⁹, sugerindo que a desregulação destes caminhos de sinalização é responsável pela ocorrência de resistência do tumor aos tratamentos. Estes anticorpos ligam-se aos recetores de EGF, da superfície celular, prevenindo a ligação do ligando e a sua dimerização, o que inibe a sua ativação, bloqueando os caminhos de sinalização. Desde então, compostos chave dos caminhos de sinalização, tais como proteínas cinases, tem sido alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. Estes novos fármacos, inibidores de BRAF (ARQ-736), MEK (Selumetinib, PD-0325901), PI3K (BEZ235, BMK 120) e MET (Tivantinib) foram capazes de reverter a resistência às terapias de inibição de EGFR, em estudos pré-clínicos, encontram-se atualmente em estudos clínicos.

Na figura seguinte, encontram-se alguns fármacos atualmente em estudos clínicos.



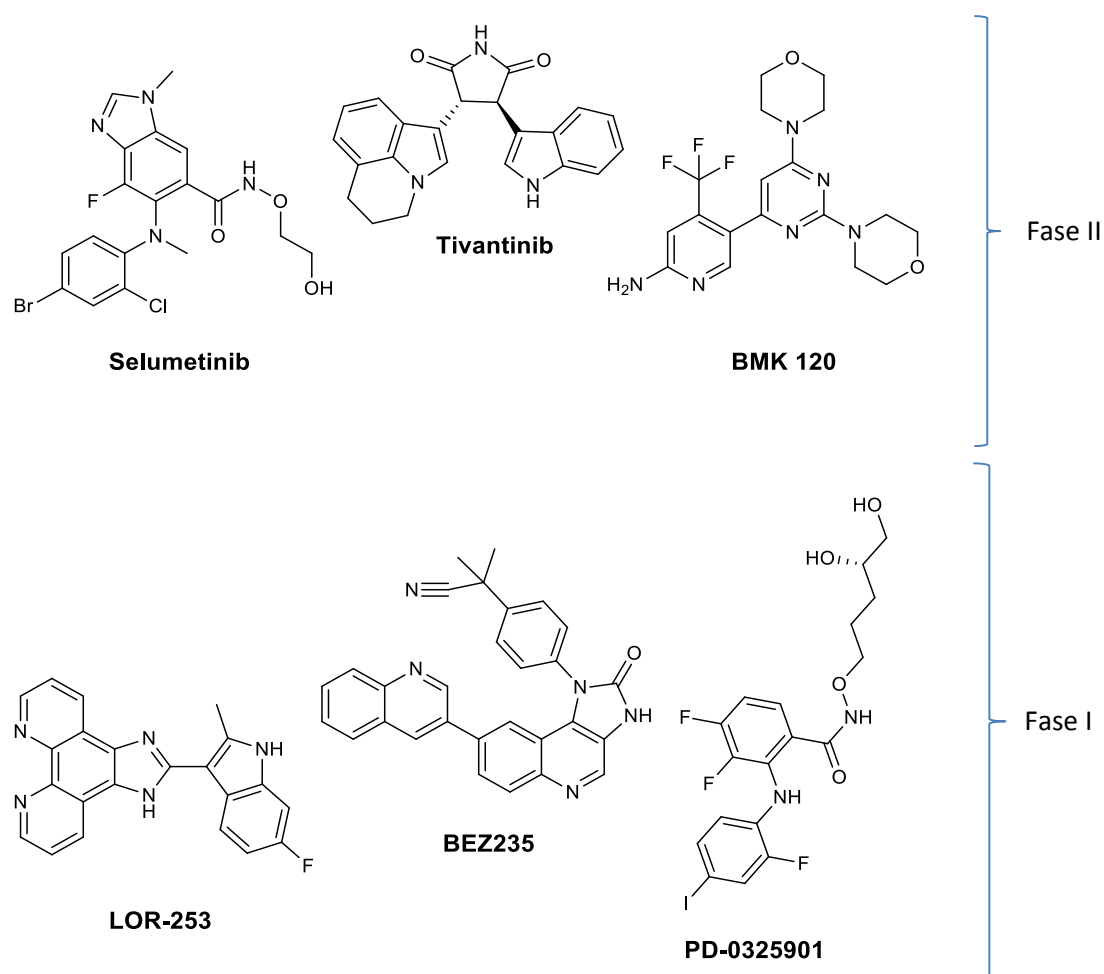


Figura 9 - Estruturas químicas de fármacos sob estudos clínicos para quimioterapia de CRC

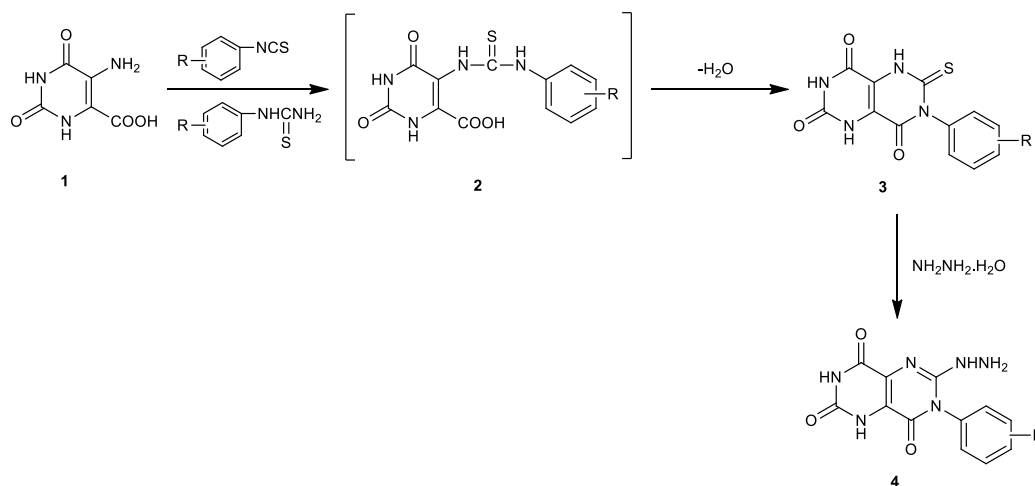
1.7. Síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas

A síntese de pirimido pirimidinas remonta ao final do século XX, onde eram investigadas por serem miméticas da purina.

Na literatura tem sido descritos diversos métodos de síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas. Alguns dos métodos serão aqui reportados.

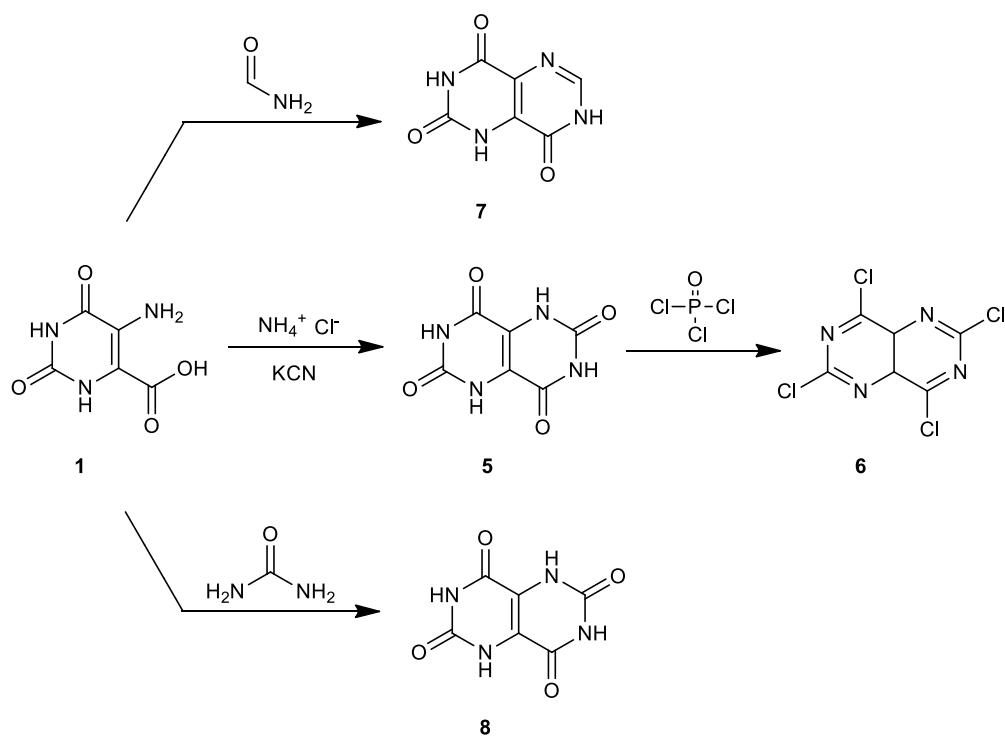
1.8. A partir de derivados de uracilo

Um dos primeiros métodos a ser reportado para a síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas (PPs), envolvia a utilização de derivados de uracilo funcionalizados com ácidos amino-carboxílicos. No método descrito por Golomolzin *et al.*²¹, os derivados de PPs **3** foram obtidos através da condensação do ácido 5-amino-carboxílico **1** com aril-isotiocianatos ou *N*-aril-tioureias, sob refluxo em DMF. O derivado final **4** foi obtido após refluxo de **3** com hidrazina mono-hidratada em DMF (**Esquema 1**).



Esquema 1

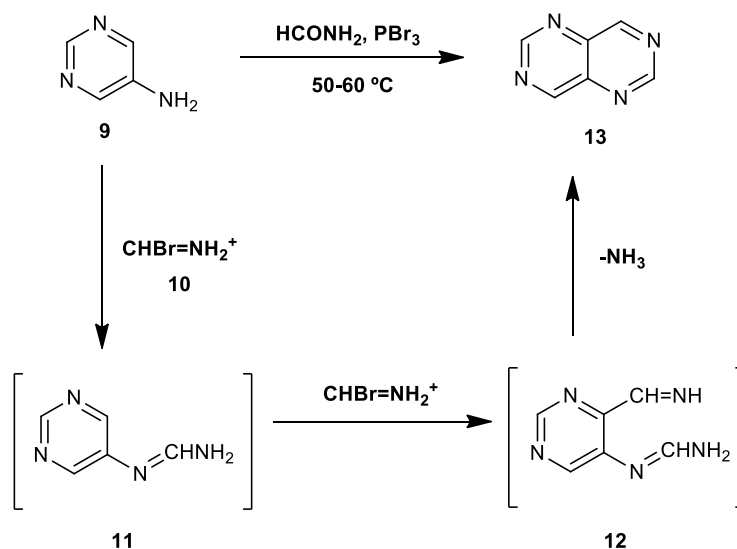
Northen *et al.*²² usaram o mesmo derivado de uracilo **1** que por reação com uma solução aquosa de ácido 5-amino carboxílico **1**, a 210°C, na presença de cloreto de amônio, e cianeto de potássio, originou a tetrona **5**. A tetrona **5** foi posteriormente convertida em **6** após o tratamento com cloreto de fosforila (**Esquema 2**). Fischer *et al.*²³ fez reagir o derivado **1** com formamida e ureia, originando os compostos **7** e **8**, respetivamente.



Esquema 2

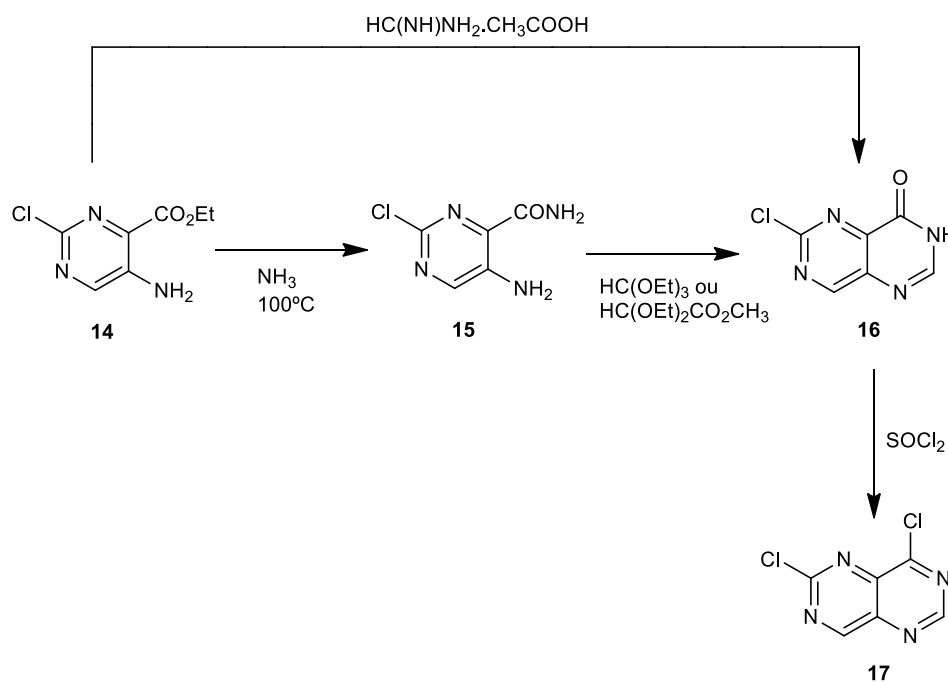
1.9. A partir de aminopirimidinas

Dos vários métodos descritos para a síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas, alguns tem atraído maior atenção, devido ao interesse económico, ecológico e principalmente pela sua eficiência. Wong *et al.*^{24,25}, reportaram um método onde geravam as pirimido[5,4-*d*]pirimidinas diretamente através da heterociclização de três componentes, utilizando a 5-aminopirimidina **9** numa reação *one-pot*, com o reagente de Vielsmeier **10**, obtendo a pirimido[5,4-*d*]pirimidina **13** com excelentes rendimentos (82-89%), como se encontra representado no esquema seguinte (Esquema 3).



Esquema 3

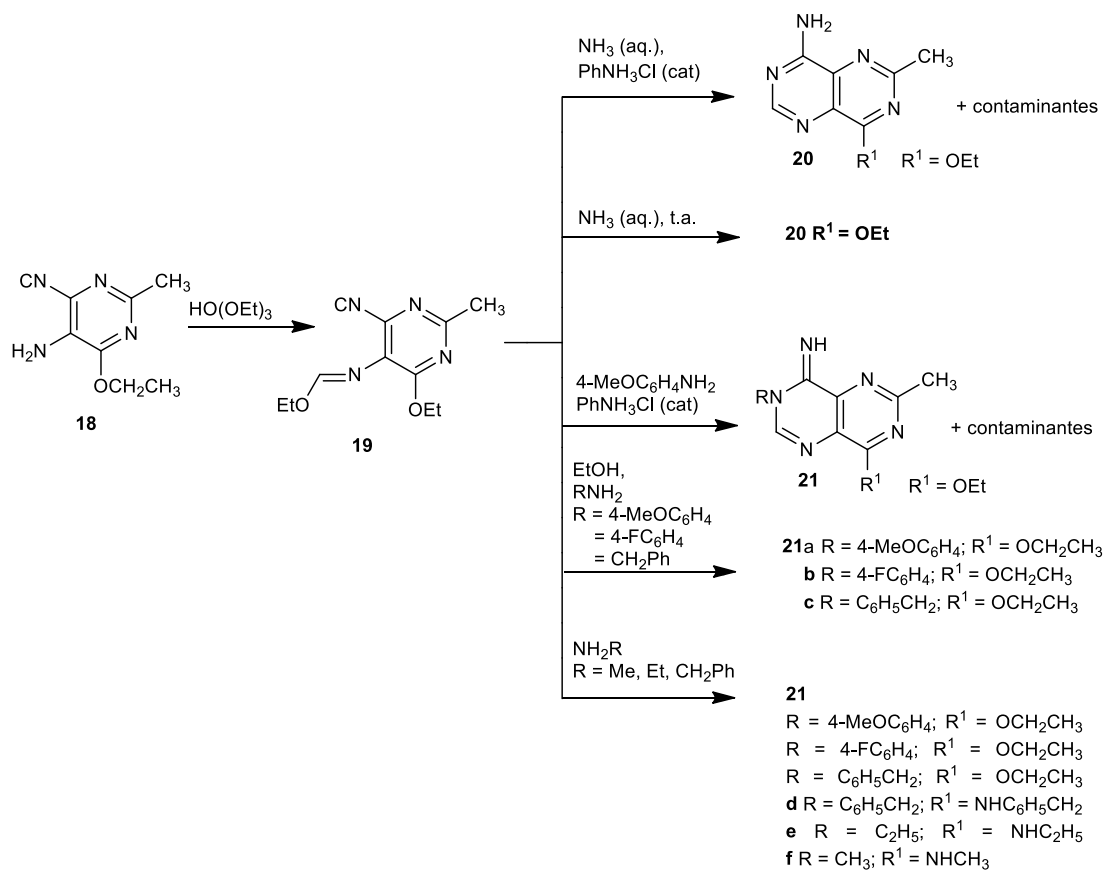
Para a síntese das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **16**, Rewcastle *et al.*²⁶ testou a conversão direta do amino éster **14** na pirimido-pirimidinona **16**, usando acetato de formamidina, contudo a reação não ocorria da forma limpa. Posteriormente, para a obtenção de **16**, o composto **14** foi refluxado em etanol com amoníaco, originando o intermediário **15**. O intermediário **15** foi convertido em **16**, com rendimentos moderados, quando era utilizado trietil ortoformiato, e com excelentes rendimentos quando era utilizado acetato de dietoxi metilo, sob condições de refluxo. A reação de **16** com SOCl_2 , em DMF, deu origem à pirimido-pirimidinona **16** (Esquema 4).



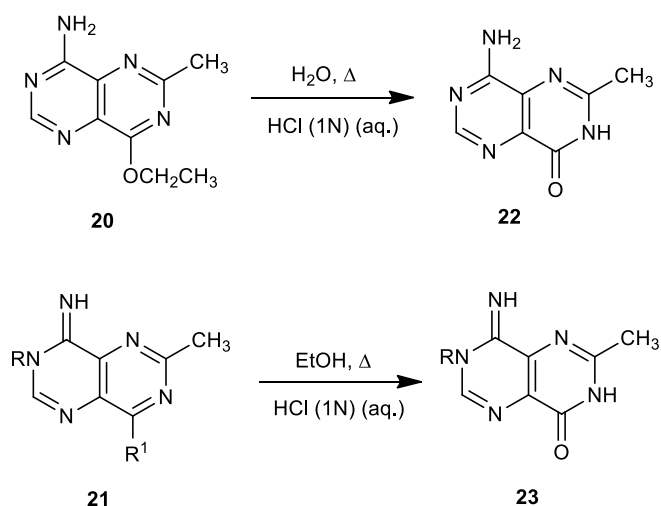
Esquema 4

No método descrito por Al-Azmi²⁷, a pirimidina **18** foi refluxada em excesso de TEOF, dando origem ao derivado **19**. Quando **19** foi colocado a reagir com uma solução aquosa de amoníaco ou 4-metoxianilina, sob catálise de cloreto de anilíneo, as pirimidopirimidinas **20** e **21** foram geradas, respetivamente. No entanto, quando se utilizava catálise ácida os rendimentos eram baixos e os produtos não eram isolados puros. As reações seguintes foram efetuadas sem catálise. O iminoformiato **19** foi colocado a reagir com uma solução de amoníaco à temperatura ambiente, gerando a pirimido[5,4-*d*]pirimidina **20**. De seguida, o iminoformiato **19** foi colocado a reagir com as 4-metoxi e 4-flúor anilinas, em etanol, gerando as pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **21** (R = 4-MeOC₆H₄, 4-FC₆H₄). O iminoformiato **19** foi ainda colocado a reagir com grande excesso de metilamina, etilamina e benzilamina. As reações com metilamina e etilamina foram efetuadas usando soluções aquosas, tendo sido isolados as pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **21e-f** (R = Me, Et). A reação com benzilamina, foi efetuada usando a amina como solvente e gerou pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **21d** (Esquema 5). Quando eram utilizadas as aminas alquílicas, em condições *neat*, o composto **21** era formado, resultando de ciclização e substituição do grupo etóxido do anel de pirimidina.

Posteriormente, Al-Azmi tratou o composto **20** com uma solução aquosa de ácido clorídrico, tendo obtido o composto **22**. Quando tratou os compostos **21a-b** com ácido clorídrico em etanol, isolou os produtos **23a-b** (Esquema 6)



Esquema 5

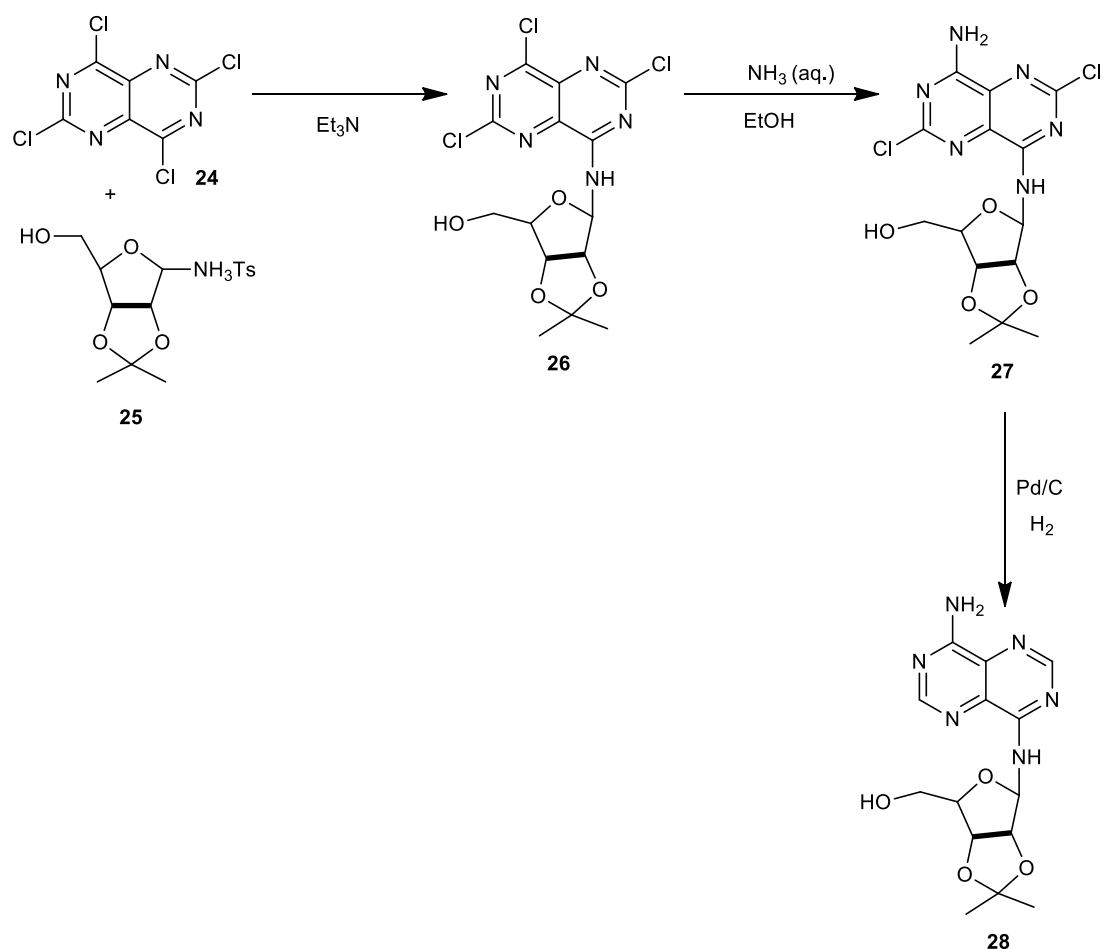


Esquema 6

1.10. A partir de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas tetra-cloradas

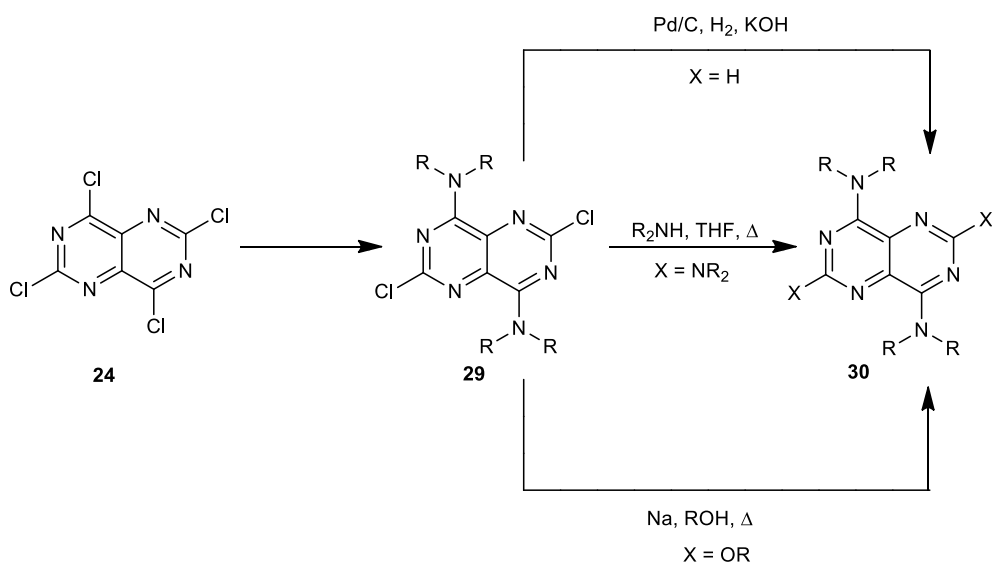
Nos métodos reportados para a síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas, é frequente o uso do reagente comercial pirimido[5,4-*d*]pirimidina 2,4,6,8-tetra-clorada **24**.

Um dos primeiros métodos a ser reportado para a síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas a partir de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas 2,4,6,8-tetracloradas, foi por Sanghvi *et al.*²⁸, onde as PPs foram geradas através da condensação de **24** com o amino-açúcar **25**. O tratamento de **26** com uma solução aquosa de amoníaco em EtOH, originou o derivado **27**, que posteriormente por hidrogenação com Pd/C, originou a pirimido[5,4-*d*]pirimidina **28** (Esquema 7).



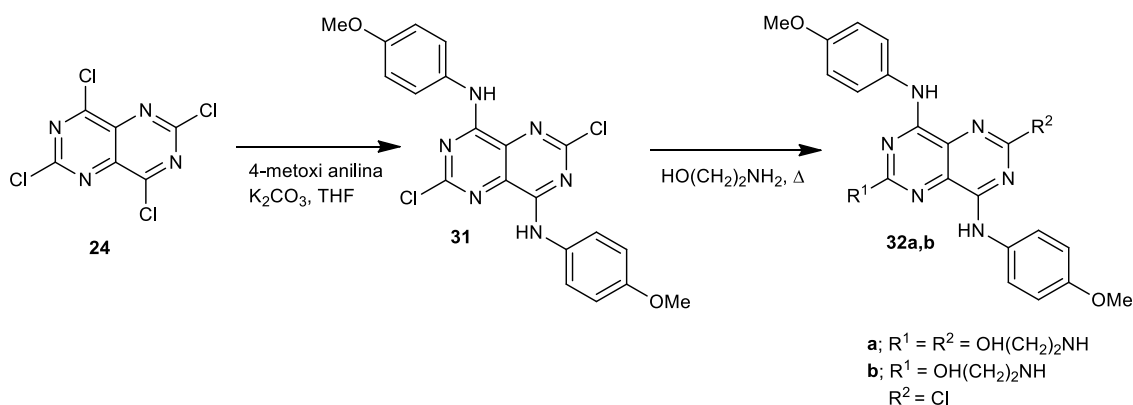
Esquema 7

Adicionalmente, Curtin *et al.*²⁹, sintetizou pirimido[5,4-*d*]pirimidinas semelhantes às reportadas por Sanghvi. As PPs, sintetizadas por Curtin foram obtidas por reação com diferentes aminas nucleofílicas. Inicialmente, para a obtenção dos compostos **30**, foi utilizado o método descrito por Sanghvi. Os compostos **29** foram obtidos por reação nucleofílica seletiva de aminas com **24**. Os compostos **30** foram obtidos a partir de **29** por hidrogenação com $\text{Pd}/\text{H}_2/\text{KOH}$. No segundo método, as PPs **30** foram geradas utilizando um excesso de amina, sob refluxo, em THF. As PPs **30** ($\text{X} = \text{OR}$) foram obtidas por reação com o alcóxido de sódio, utilizando o respectivo álcool como solvente, sob refluxo (Esquema 8). Os métodos reportados por Curtin geraram os produtos com excelentes rendimentos.



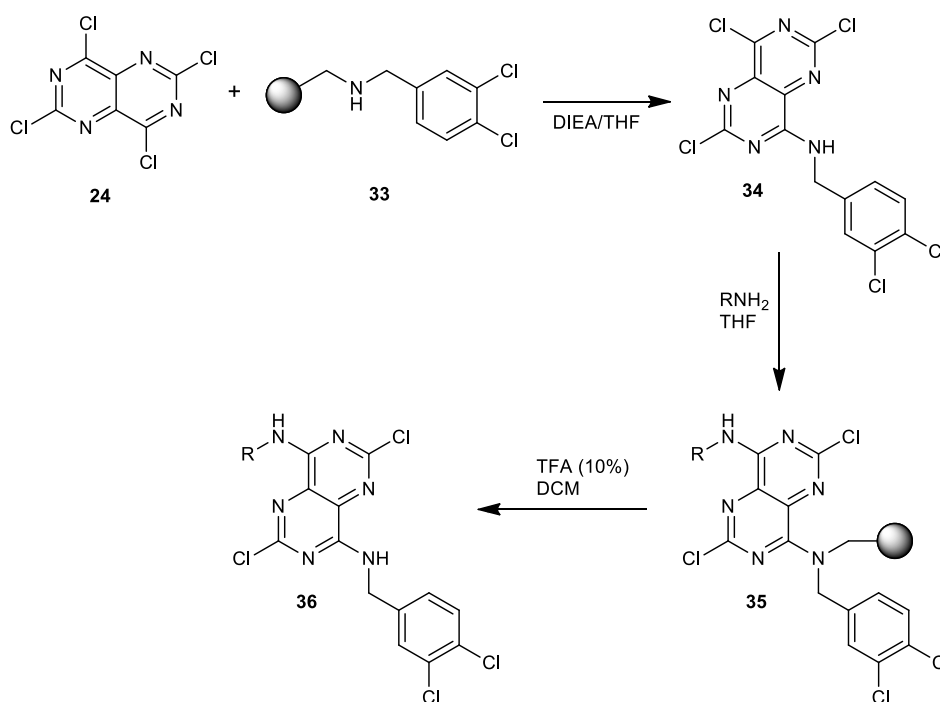
Esquema 8

Northen *et al.*²² reportaram a síntese de novos derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **32** através de aminação seletiva de **24**²². Por reação de **24** com 4-metoxi anilina em THF, obteve-se o composto **31**. O composto **31** foi colocado a reagir com etanolamina em THF, gerando seletivamente a 4, 8 - bis(4-metoxianilino) - 6 - cloro - 2 -(hidroxiethylamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidina **32b**. No entanto, quando a etanolamina era utilizada em condições *neat*, gerava a 4, 8 - bis(4 - metoxianilino) - 2, 6 - bis(2 - hidroxiethylamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidina **32a** (Esquema 9).



Esquema 9

El-Araby *et al.*³⁰ reportou a síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas, a partir de **24** com aminas ligadas a resinas **33**, através de reação controlada, obtendo o composto mono substituído na posição 4, **34**³⁰. Por fim, sintetizou o composto **35** di-substituído, após a reação de **34** com variadas aminas primárias, tais como anilinas, anilinas fenólicas e aminas alquílicas (**Esquema 10**).



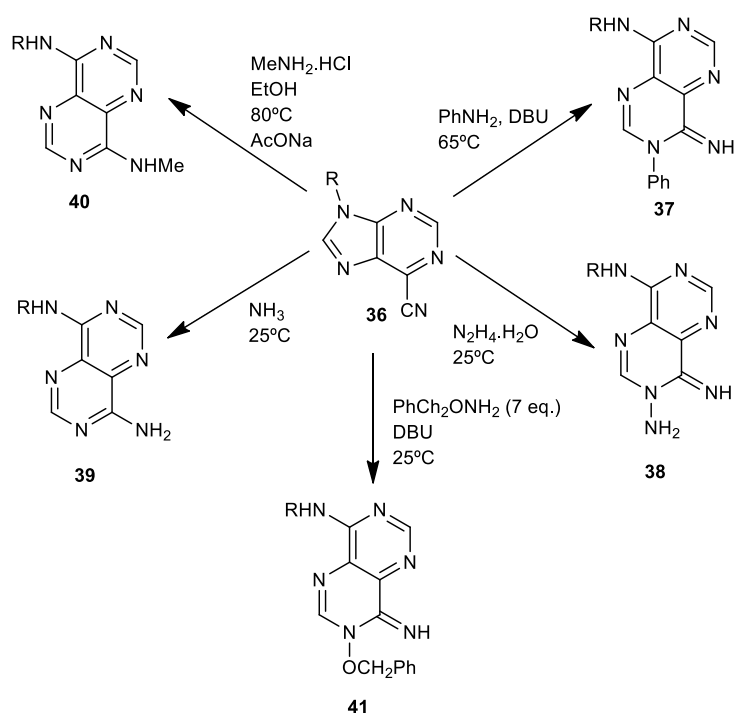
Esquema 10

1.11. A partir de purinas

Entre os vários métodos descritos de síntese de PPs, o método de síntese através da transformação do anel de purinas, pelo mecanismo ANRORC, tem sido extensivamente desenvolvido por investigadores, especialmente portugueses.

Geralmente as 6-cianopurinas **36**, que contêm um grupo ciano na posição 6, reagem com aminas nucleofílicas, gerando as PPs **37**, **38**, **39** e **41**. Quando a reação de **36** foi efetuada com cloreto de metilamina em etanol e acetato de

sódio, a 80°C, foi isolado o produto **40**. As reações das purinas com nucleófilos de nitrogénio são reações competitivas. Os derivados 4-imino PP **37**, **38**, **39** e **41** são gerados pelo ataque das aminas no carbono C8 do anel de imidazole de **36**, enquanto os derivados **40** deve resultar de um processo competitivo, que envolve inicialmente o ataque do nucleófilo ao grupo nitrilo, seguido de abertura do anel de imidazole e fecho de um novo anel de pirimidina para gerar **40** (*Esquema 11*)^{25,31,32}.

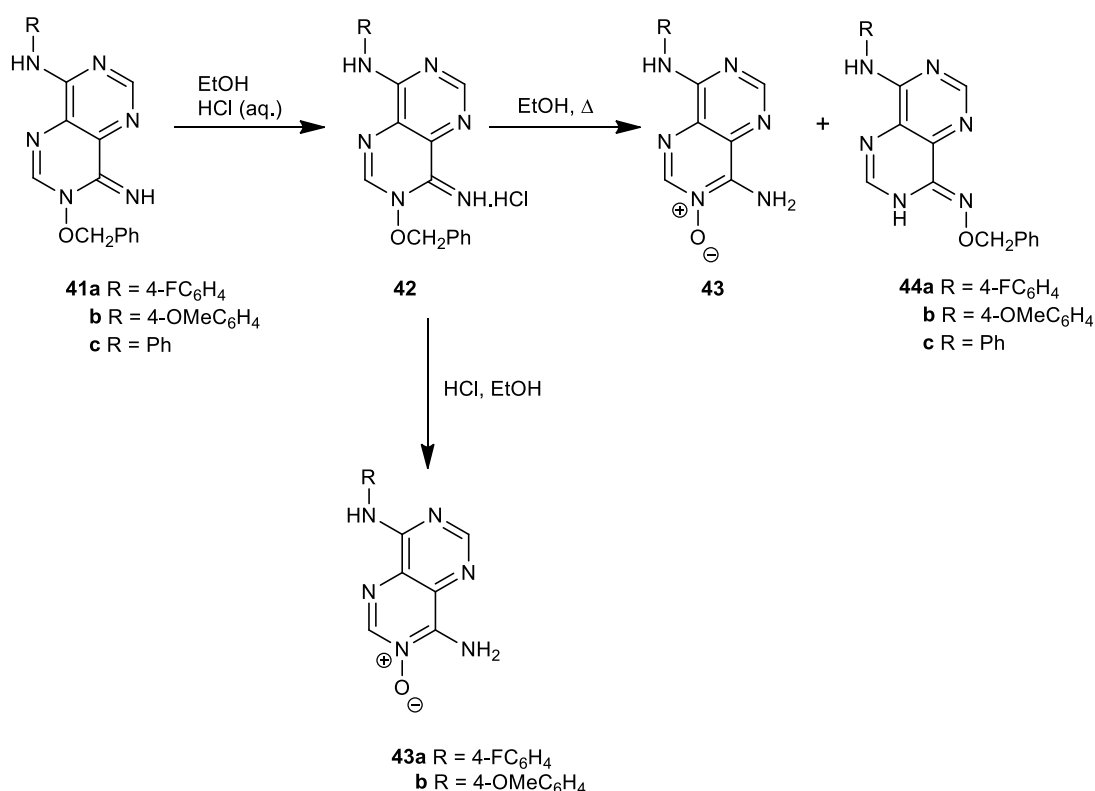


Esquema 11

Carvalho *et al.*^{31,33} reportou um método eficiente para a síntese de PPs, utilizando uma purina como precursor, a 6-cianopurina **36**, que por reação com diferentes aminas nucleofílicas originava as 4-imino PPs **37** e **38**, ou as 4-amino PPs **39** e **40**. (*Esquema 11*).

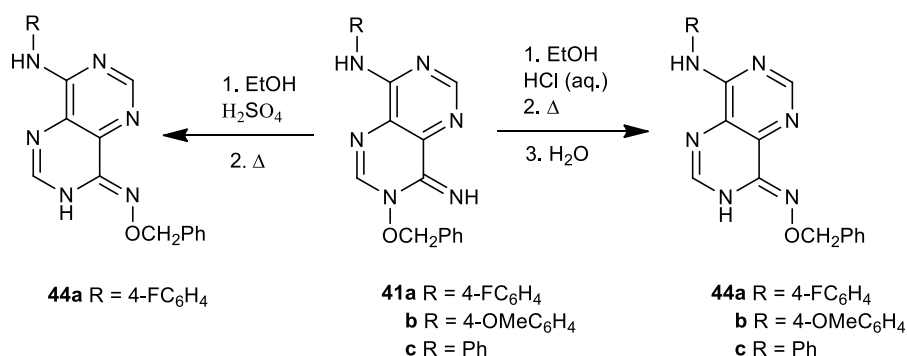
Após obtenção de **41**, Ribeiro *et al.*³⁴ testaram a sua conversão para o produto aromático, **44**. A conversão foi inicialmente tentada, utilizando condições ácidas, visto que, o composto **41** tinha sido obtido de um meio básico. Na reação, foi utilizada uma solução concentrada de ácido clorídrico em etanol, à temperatura

ambiente, obtendo-se o hidrocloreto **42**. O hidrocloreto **42** foi refluxado, em etanol, originando uma mistura onde o produto pretendido (**44**) foi identificado como produto minoritário e, o produto maioritário, identificado como o composto **43**, sendo assim reportado pela primeira vez a formação de óxidos de pirimido pirimidinas. Os óxidos **43a,b** foram obtidos por tratamento de **42a,b** com uma solução de ácido clorídrico, em etanol, à temperatura ambiente (**Esquema 12**).



Esquema 12

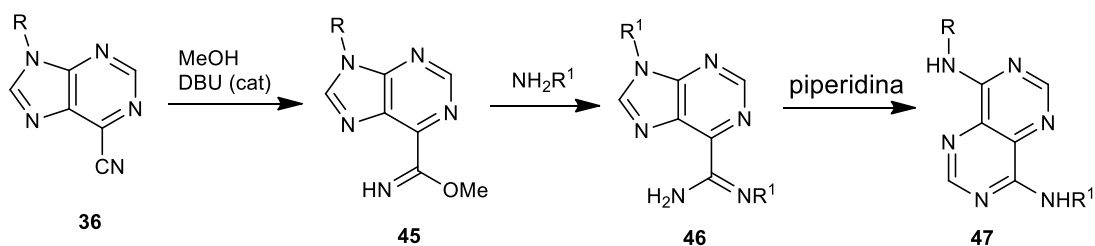
Posteriormente foram realizados estudos para a obtenção seletiva dos produtos **43** e **44**. Para a obtenção seletiva de **44**, foi necessária a adição de um grande excesso de uma solução aquosa de ácido clorídrico em etanol. A mistura foi posteriormente refluxada, até o reagente de partida ser totalmente consumido e o produto **44** foi isolado na forma de sal de cloreto. A neutralização foi efetuada por lavagem do sólido com água (**Esquema 13**).



Esquema 13

O produto **44a** foi igualmente obtido, por tratamento de **41a** com uma solução de ácido sulfúrico, em etanol, sob condições de refluxo.

Mais recentemente, Rocha *et al.*³⁵ reportaram um método eficiente para a síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **47** a partir de 6-carbohidrazonamidinopurinas **46**, que provaram ser excelentes percussores daqueles compostos. Estes percussores foram reportados anteriormente por Carvalho *et al.*³², sendo obtidos a partir da 6-cianopurina **36** em metanol, na presença de uma quantidade catalítica de DBU. Este tipo de reação ocorre seletivamente no carbono do grupo ciano, dando origem às imidatopurina **45** (**Esquema 14**).



Esquema 14

Na presença de hidrazidas e meio ácido, as imidatopurinas **45** geraram os compostos **46** com excelentes rendimentos³⁵. A conversão de **46** para **47**, ocorreu na presença de piperidina em etanol ou uma mistura de etanol-DMF.

1.12. Objetivos de trabalho

Derivados de PPs contendo uma unidade açúcar, foram avaliados como potenciais anti cancerígenos^{36,37} em culturas celulares de diferentes tipos de cancro, especificamente melanoma, cancro renal, cancro mamário e cancro coloretal.

Recentemente, no nosso grupo de investigação, foi identificada uma nova estrutura base de pirimido[5,4-*d*]pirimidina com elevada atividade anti cancerígena na linha celular HCT116 (*p53-wt*). O núcleo de pirimido[5,4-*d*]pirimidina apresenta substituintes diferentes em C4 e C8 do heterociclo. De acordo com os resultados dos testes biológicos, verificou-se que, ambos os substituintes afetavam a atividade.

Considerando os resultados anteriores, neste projeto pretende-se sintetizar novos derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidina, alterando o substituinte da posição 4, efetuar o *screening* dos novos compostos sintetizados a 10µM na linha celular HCT116 (*p53-wt*) e determinar o IC₅₀ para os compostos que apresentem uma inibição da viabilidade celular superior a 50%. Com base nos IC₅₀ será efetuada a discussão SAR e apresentada uma proposta de farmacóforo para a posição 4 da pirimido[5,4-*d*]pirimidina. Será ainda efetuado o *screening* e a determinação de IC₅₀ de derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidina substituída em C8, que estão a ser sintetizados por outros membros do grupo de investigação. A linha celular, HCT116 (*p53-wt*), foi selecionada por ser uma das mais utilizadas na identificação de compostos ativos no cancro coloretal^{36,38}.

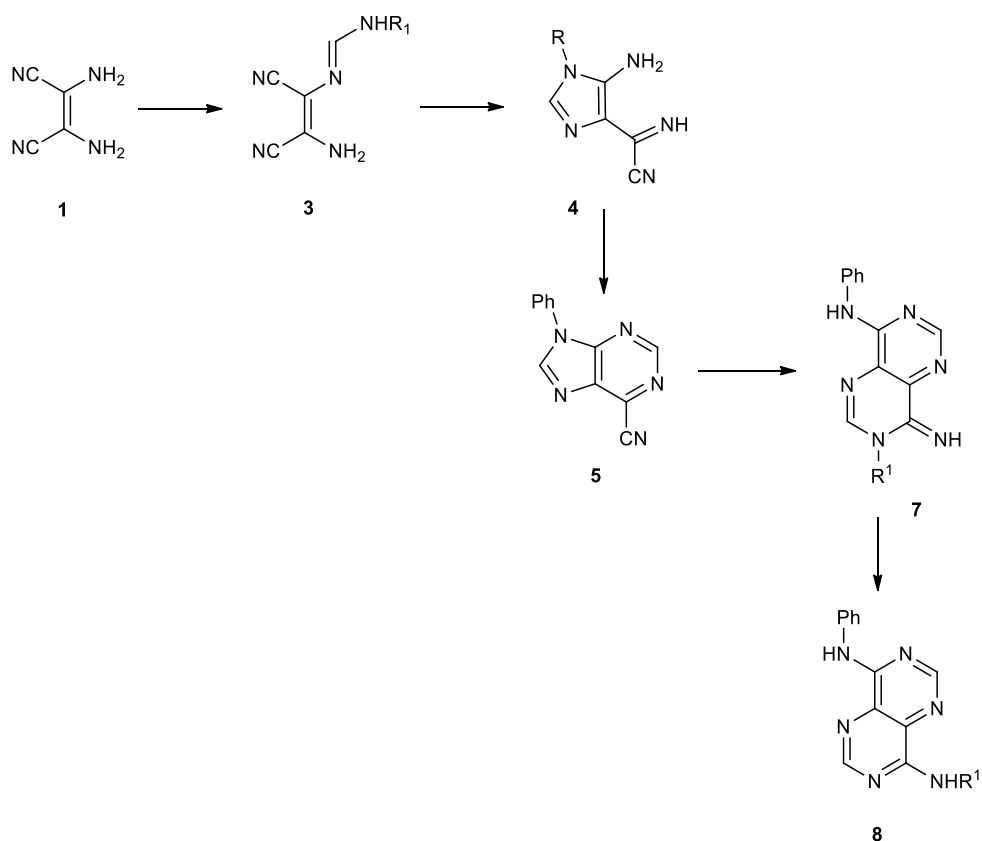
Capítulo 2. Discussão de Resultados

2. Discussão de Resultados

No grupo de investigação em que este projeto se encontra inserido tem sido desenvolvidos novos derivados de compostos heterocíclicos, que posteriormente foram submetidos a testes biológicos, contra células cancerígenas do cancro coloretal, alguns apresentando excelentes resultados.

Os resultados obtidos anteriormente permitiram identificar diversos substituintes nas diferentes posições das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas que potenciam a sua atividade contra as células de cancro coloretal utilizadas (HCT116 *p53-wt*).

Com base nestes resultados os objetivos deste trabalho centraram-se na síntese de diferentes derivados que foram preparados de acordo com o esquema reacional geral seguinte (**Esquema 15**).

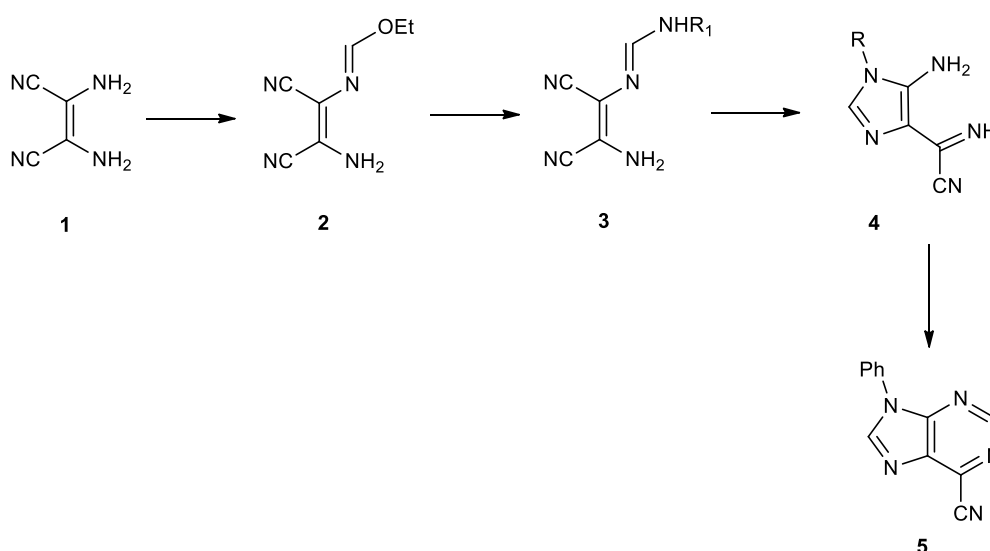


Esquema 15 - Mecanismo de obtenção das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas

2.1. Síntese de reagentes de partida

Para a realização deste trabalho, o reagente de partida utilizado foi a 6-cianopurina **5**, que já se encontra descrita como precursor na síntese de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas, pelo nosso grupo de trabalho^{33,39,40}.

Como a 6-cianopurina **5** não se obtém comercialmente, é necessário a realização de vários passos para a sua obtenção, a partir de reagentes comerciais, como se encontra descrito no esquema seguinte (**Esquema 16**).



Esquema 16 - Síntese da 6-cianopurina **6**

O imidato **2** é o primeiro precursor do processo de obtenção dos reagentes de partida, sendo obtido a partir dos reagentes comerciais diaminomaleonitrilo **1** e ortoformiato de etilo.

A reação para a obtenção do imidato **2**, é realizada, fazendo reagir **1** com ortoformiato de etilo sob refluxo em dioxano, reação que foi realizada num sistema de destilação fracionada.

De acordo com trabalhos realizados no nosso grupo de trabalho⁴¹, o imidato **2** reagiu com aminas primárias na presença de catálise ácida originando as

amidinas **3**. As amidinas **3** na presença de base (DBU) ciclizaram, originando o imidazole **4**.

Em estudos posteriores³³, realizados no nosso grupo de trabalho, o imidazole **4** pode ser obtido de dois métodos distintos.

No primeiro método, o imidazole **4**, foi obtido a partir da amidina **3**. No segundo método, o imidato **2** foi convertido na amidina **3**, que é convertida *in situ* no imidazole **4**.

Neste trabalho, o imidazole **4** foi obtido, utilizando-se o segundo método, isto é, realizando-se a conversão *in situ*, da amidina **3** para imidazole **4**.

Em trabalhos anteriores³³, a 6-cianopurina **5** foi também obtida, através de dois métodos.

Num dos métodos, a 6-cianopurina **5** foi obtida, fazendo reagir a amidina **3** com trietilortoformiato, sob refluxo. No outro, a 6-cianopurina foi obtida, fazendo reagir o imidazole com um excesso de trietilortoformiato com catálise ácida à temperatura ambiente³³.

Neste trabalho, a 6-cianopurina **5**, foi obtida utilizando-se o segundo método.

2.2. Reação da 6-cianopurina com aminas nucleofílicas

A 6-cianopurina tem sido utilizada no nosso grupo de trabalho, como precursor, de forma a obter as pirimido[5,4-*d*]pirimidinas 4,8-disubstituídas.^{31,35} Assim após preparação de quantidade adequada de composto **5**, este fez-se reagir com aminas nucleofílicas.

2.2.1. Reação com aminas nucleofílicas

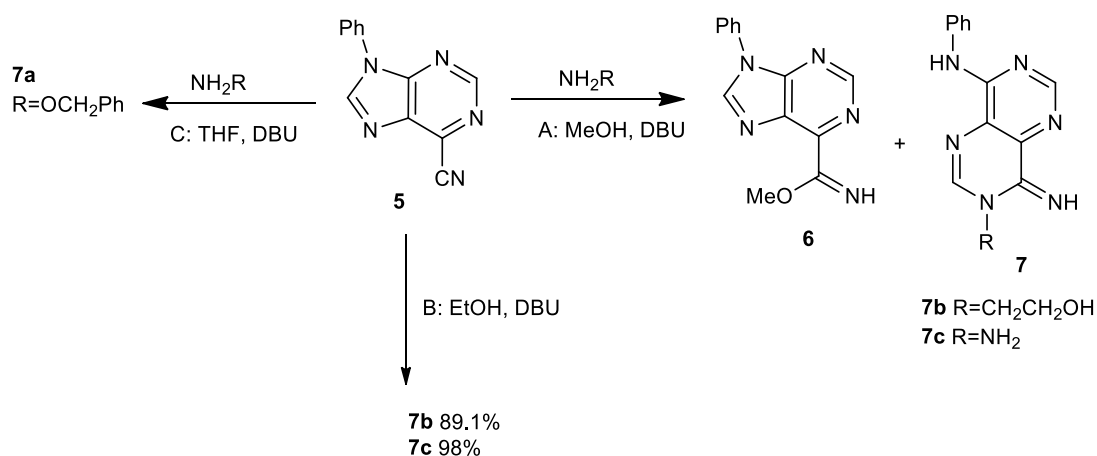
A reação com aminas primárias foi realizada através de métodos descritos anteriormente pelo nosso grupo de trabalho^{31,35,42}.

Inicialmente para a síntese das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **7b** e **7c**, utilizou-se metanol como solvente com catálise básica (DBU) (método A). Numa fase

posterior, testou-se a síntese dos produtos **7b** e **7c** em etanol (método B), obtendo-se assim as pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **7b** e **7c** puras.

Para a obtenção da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **7a**, utilizou-se um método diferente, descrito anteriormente³⁴, utilizando-se THF como solvente, na presença de catálise básica (DBU).

No esquema seguinte (**Esquema 17**) encontra-se representada síntese das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **7**.



Esquema 17 - Síntese das pirimido pirimidinas **7**

A *o*-benzilhidroxilamina (7 equiv.) foi colocada a reagir com a 6-cianopurina **5**, em THF à temperatura ambiente. A reação foi deixada durante a noite sob agitação magnética e após 17h recolheu-se o produto **7a** com 57% de rendimento.

Nas tentativas de obtenção das pirimido pirimidinas **7b** e **7c**, inicialmente utilizaram-se 2,5 equivalentes da amina, como solvente usou-se metanol e a reação fez-se com catálise básica de DBU.

Ao fim de 1 hora de reação foram recolhidos os sólidos, que por análise de ¹H RMN, verificou-se a existência de uma mistura. A mistura foi caracterizada como sendo os produtos pretendidos **7b** e **7c** e a imidatopurina **6**.

De forma a obter apenas os produtos desejados **7**, selecionou-se o etanol para solvente e as reações repetiram-se, mantendo-se as restantes condições. Os produtos desejados foram isolados após 1 hora de reação com rendimentos entre 89 a 98%. Todos os compostos isolados foram analisados por TLC e/ou ^1H RMN e comparados com padrões.

2.3. Reatividade de 3,4-dihidropirimido[5,4-*d*]pirimidinas

2.3.1. Conversão de 3,4-dihidropirimido[5,4-*d*]pirimidinas nos derivados aromáticos

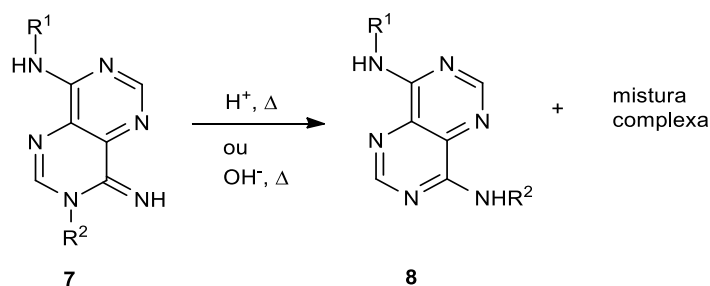
Após a obtenção das pirimido pirimidinas **7** na forma não aromática, o passo seguinte foi a sua conversão, pelo método de Dimroth, para a forma aromática.

Anteriormente no nosso grupo de trabalho, foi descrito um método para a obtenção das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **7**, onde eram utilizadas condições ácidas ou básicas, sob temperatura para a sua conversão^{31,35} como se encontra representado no esquema (**Esquema 18**).

Em estudos realizados por Carvalho *et. al.*³¹, a conversão de **7** em **8**, ocorria após longos tempos de reação, utilizando-se metanol como solvente e catálise ácida ou básica, sob refluxo ou à temperatura ambiente.

Em estudos posteriores, para a conversão de **7** em **8**, Rocha *et. al.*³⁵, testou a utilização de etanol como solvente, com catálise ácida, utilizando ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético e ácido clorídrico, sob refluxo. Após os novos estudos, verificou que em cada caso obtinha o mesmo resultado, uma mistura onde o produto desejado **8** era identificado como sendo o produto maioritário.

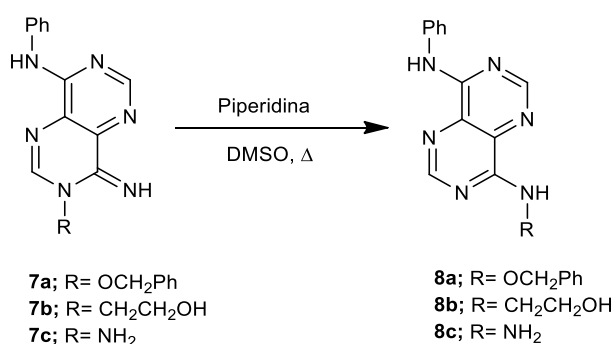
Quando eram utilizadas condições básicas, utilizando-se etanol como solvente e uma solução aquosa de hidróxido de sódio, o mesmo resultado era obtido, neste caso, identificando-se o produto desejado como produto minoritário.



Esquema 18 - Conversão da pirimido pirimidina não aromática **7** na sua forma aromática **8**

Após verificar-se que nas condições anteriormente testadas, o produto desejado não se obtinha puro, testou-se a síntese de **8** a partir de amidinopurinas, derivados da 6-cianopurina **5** que são gerados através da reação de imidatopurinas com hidrazidas sob condições ácidas, utilizando-se etanol ou uma mistura de etanol-DMF, quando os reagentes eram pouco solúveis, na presença de piperidina, sob refluxo. No final de cada reação, o produto era obtido puro com excelentes rendimentos.

Após a análise deste estudo, neste trabalho, para a conversão das pirimido pirimidinas não aromáticas **7** em pirimido[5,4-*d*]pirimidinas aromáticas **8**, foram utilizadas condições básicas, utilizando-se piperidina como base, temperatura de 80°C e DMSO como solvente. (**Esquema 19**).



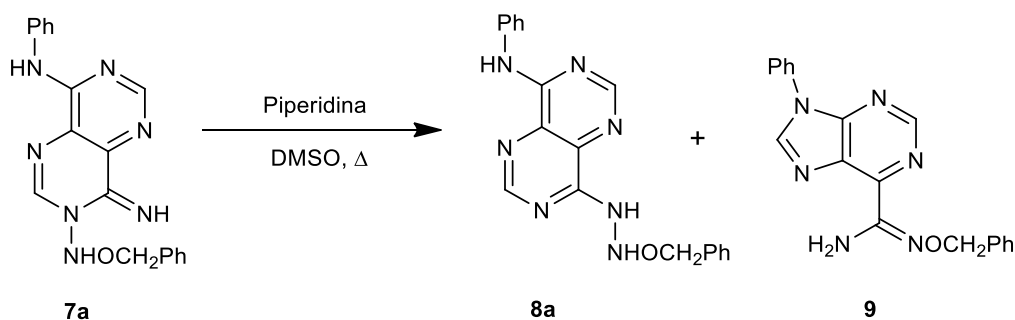
Esquema 19 - Síntese das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **8**

Inicialmente, para a síntese da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c**, utilizou-se como solvente etanol e piperidina. Após 7 dias de reação, esta ainda não se

encontrava terminada. Decidiu-se então utilizar DMSO como solvente, mantendo as restantes condições.

Após 15 horas de reação, o sólido isolado foi analisado por TLC e ^1H RMN, verificando-se a presença do produto desejado puro **8c**. As mesmas condições reacionais foram adotadas para as pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **8a** e **8b**. Apenas o produto **8b** foi obtido puro.

Na reação de conversão da pirimido pirimidina **7a** para **8a**, recolhia-se uma mistura de produtos. Após análise do espectro de ^1H RMN do sólido recolhido, os componentes da mistura foram identificados como sendo o produto desejado **8a** e o isómero amidinopurina **9**. Esta reação foi repetida várias vezes e em cada uma obtinha-se uma mistura de **8a** e **9a** em diferentes proporções, 76:24 após 13 horas, 75:25 após 16 horas, 84:16 após 7 dias e 95:5 após 91 horas de reação, como se encontra representado no esquema (**Esquema 20**).



Esquema 20 – Reação de **7a** com piperidina em DMSO

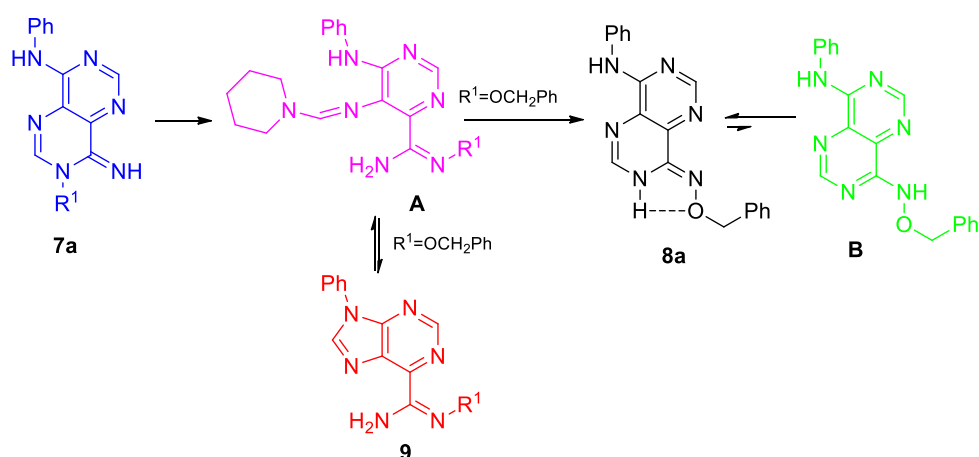
Após se verificar que, nas várias tentativas de conversão de **7a** em **8a**, o sólido recolhido era uma mistura de dois produtos, decidiu-se efetuar a reação em tubo de RMN.

O estudo por ^1H RMN foi iniciado com a obtenção do espectro de ^1H RMN do composto **7a**, à temperatura ambiente e também o espectro da mistura **7a** com 7 equivalentes de piperidina. A esta temperatura não ocorre reação. O tubo de ^1H RMN foi depois colocado a 80°C e foram obtidos espectros ao longo do tempo. O sinal do grupo CH_2 correspondente ao substituinte OCH_2Ph foi usado para

estabelecer a proporção de cada componente presente na mistura reacional. Para o composto **7a** o sinal surge a $\delta=5,35\text{ppm}$, para o composto **9** o sinal surge a $\delta=5,18\text{ppm}$, para o composto **B** o sinal surge a $\delta=4,95\text{ppm}$. Para determinar a percentagem relativa do par de tautómeros **D** e **E** foram ainda considerados os sinais dos prótons H_6 , dos respetivos compostos, que surgem respetivamente a $\delta=8,32\text{ppm}$ e $\delta=8,58\text{ppm}$.

A análise dos espetros permitiu verificar que inicialmente a reação ocorre com abertura do anel de **A** para gerar o intermediário **B**. Este evolui muito rapidamente para gerar a purina **C**. Após meia hora de reação já não existe composto **A** no meio reacional, existe cerca de 90% de composto **C** e 10% de composto **B**. Começam a surgir os sinais dos compostos **D** e **E**. Ao longo do restante tempo a percentagem de composto **B** baixa para aproximadamente 2% mantendo-se constante, e a percentagem de **D** vai aumentando progressivamente até atingir a percentagem de 85%, ao fim de 200h. Ao fim desse tempo a percentagem de **C** e **E** são aproximadamente de 7% e não se verifica alteração das proporções relativas dos constituintes da mistura após mais 50 h de reação o que indica que se atingiu o equilíbrio.

A **Figura 10** apresenta, esquematicamente, a composição da mistura reacional ao longo do tempo da reação entre o composto **A** e piperidina, em DMSO, a 80°C .



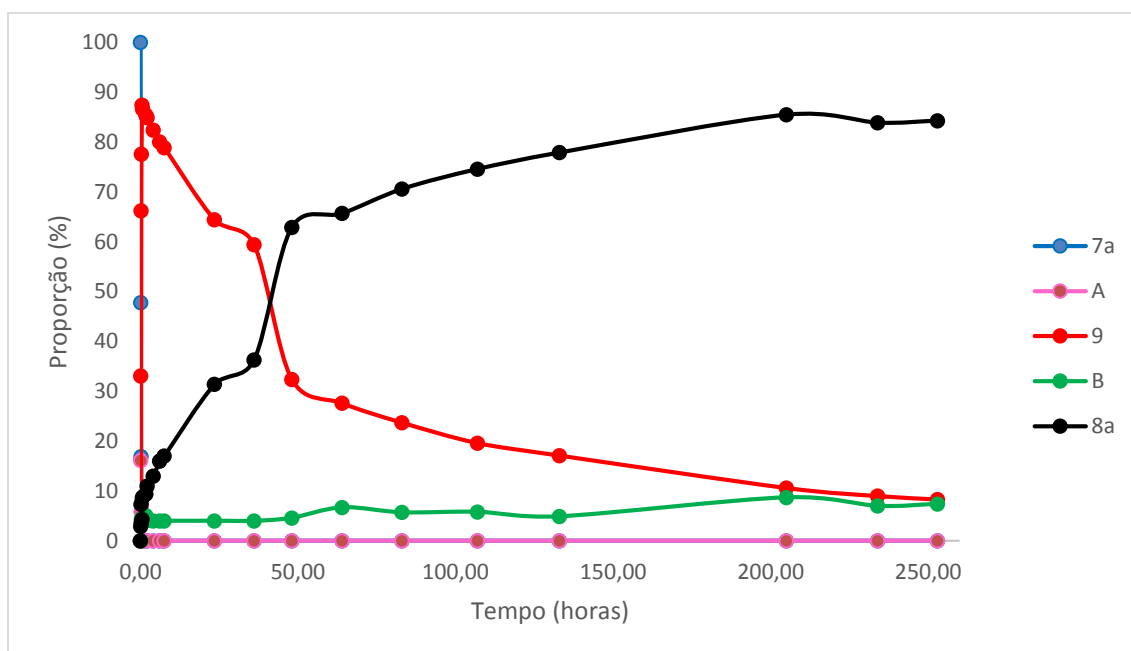


Figura 10 - Gráfico da composição da mistura reacional

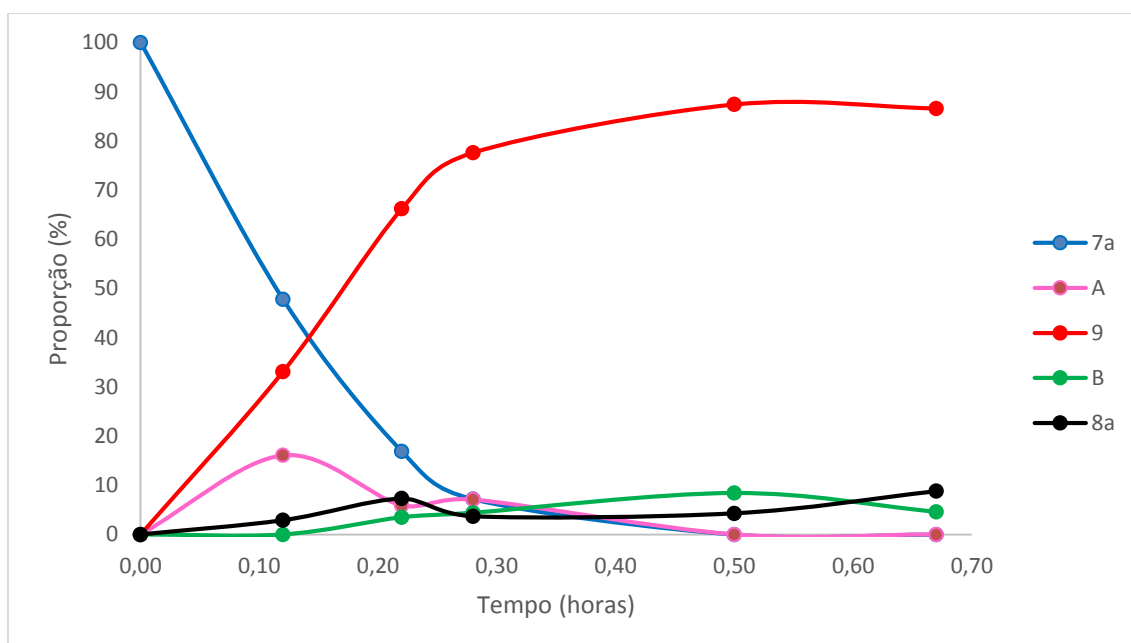


Figura 11 - Expansão do gráfico

Após verificar-se pelo estudo realizado por ^1H RMN, que a reação de conversão de **7a** em **8a**, ocorria mais lentamente e obtinha-se sempre uma mistura, comparando com **8b** e **8c**, testou-se a conversão por outro método já descrito.

O produto **8a** havia sido anteriormente obtido e publicado pelo nosso grupo de trabalho³⁴.

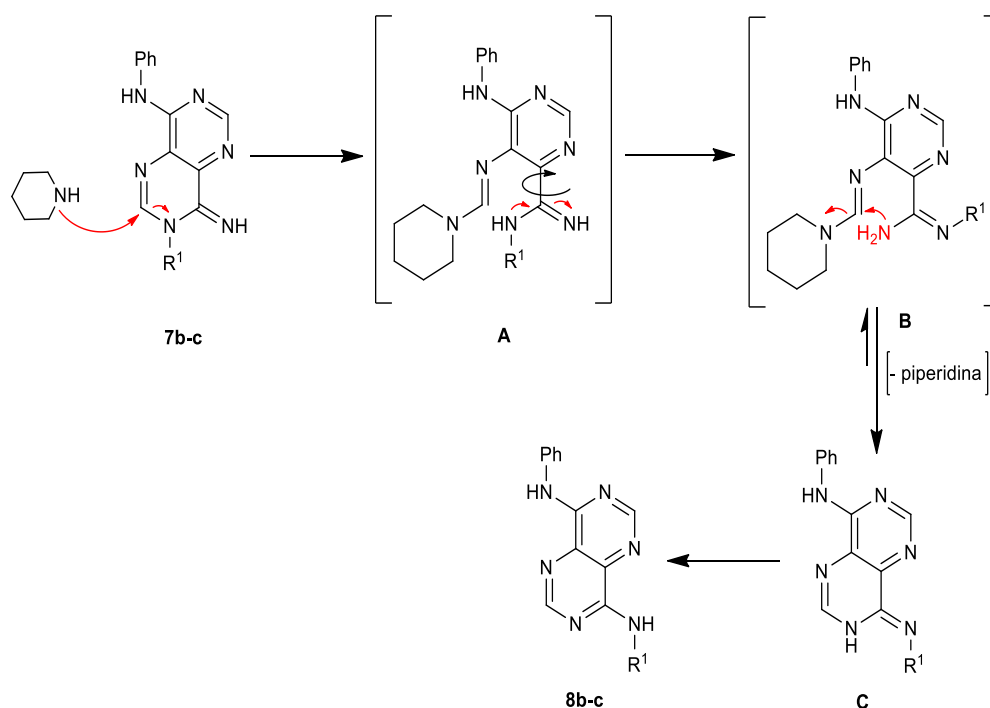
Pelo método descrito por *Ribeiro et al.*³⁴, o produto **8a** era obtido por tratamento de **7a**, com uma solução concentrada de HCl. A reação era iniciada à temperatura ambiente e, após 15 minutos era colocada sob refluxo. O produto era obtido puro por filtração do sólido precipitado na mistura reacional. Estas condições foram aplicadas a um novo ensaio e o produto **8a** foi isolado puro com um rendimento de 63%.

A estrutura e pureza dos compostos sintetizados foram confirmadas por comparação dos dados de ¹H RMN de cada um dos compostos isolados com os correspondentes dados espectroscópicos de amostras autênticas.

No espectro de ¹H RMN dos compostos **8** é possível identificar sinais característicos dos prótons C₂-H e C₆-H, com desvios entre δ 8,54-8,51ppm e δ 8,61-8,56ppm, respetivamente. No espectro da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8a** é possível identificar-se a presença de sinais aromáticos, referentes ao grupo fenilo introduzido e um singleto que integra para dois prótons, referente ao grupo CH₂.

Na pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8b**, é possível identificar os sinais característicos dos grupos CH₂, aparecendo como dois tripletos para dois prótons a δ 4.88ppm e δ 3.63ppm, enquanto que na pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c** verifica-se a presença de um singleto largo a δ 4,88ppm, correspondente ao grupo NH₂.

O mecanismo da reação dos produtos **8b-c** encontra-se descrito no esquema seguinte (**Esquema 21**).

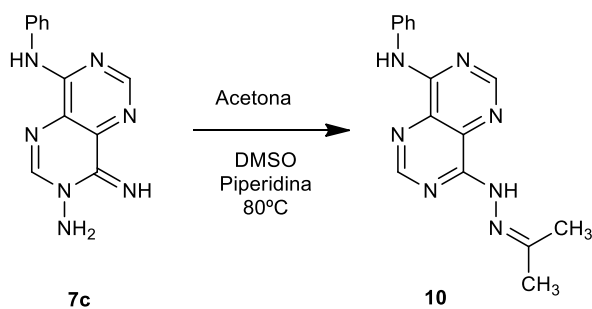


Esquema 21 - Mecanismo de reação para a obtenção de **8b-c**

A reação inicia-se pelo ataque nucleofílico da piperidina ao carbono C2 da pirimido pirimidina **7b-c**, abrindo o anel, gerando o intermediário **A**. Após rotação do carbono da função amidina, o nitrogénio, marcado a vermelho de **B**, ataca o carbono C5, eliminando a piperidina, fechando o anel, formando o composto **C** que por tautomerismo origina o composto **8b-c**.

2.3.2. Reação com acetona

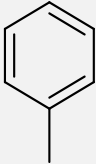

Para se obter o composto **10** fez-se reagir o composto **7c**, utilizando-se DMSO como solvente, acetona e piperidina, sob temperatura a 80°C. Após 13 horas de reação, isolou-se um sólido que foi analisado por TLC e ¹H RMN, caracterizando-se como sendo o composto **10** puro com 96,5% de rendimento.



Esquema 22 - Síntese do composto **10**

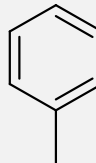

2.3.2.1. Dados analíticos da pirimido[5,4-d]pirimidina **10**

Tabela 1 - Dados analíticos da pirimido[5,4-d]pirimidina **10**

Comp.	R	R ¹	Ponto de Fusão (°C)	C, H, N, S, Valores obtidos (calculados)	Fórmula Molecular
10			223-225	54,81; 5,70; 30,28 (54,70; 5,81; 29,77)	C ₁₅ H ₁₅ N ₇ ·2·H ₂ O

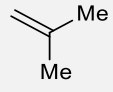
2.3.2.2. Dados espectroscópicos de IV

Tabela 2 - Dados espectroscópicos de IV do composto **10**

Comp.	R	R ¹	3500-3000	1700-1500
10			3587m; 3350f; 3416f	1640f; 1602i; 1587i; 1562i; 1536i

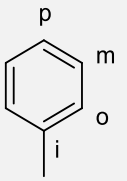
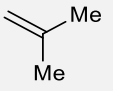
2.3.2.3. Dados espectroscópicos de ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400MHz)

Tabela 3 - Dados espectroscópicos de ^1H RMN do composto **10**

Comp.	R	R ¹	H ₂ /H ₆	R	R ¹
10			8,59 (s, 2H)	7,95 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	2,09 (s, 3H, Me) 2,05 (s, 3H, Me)

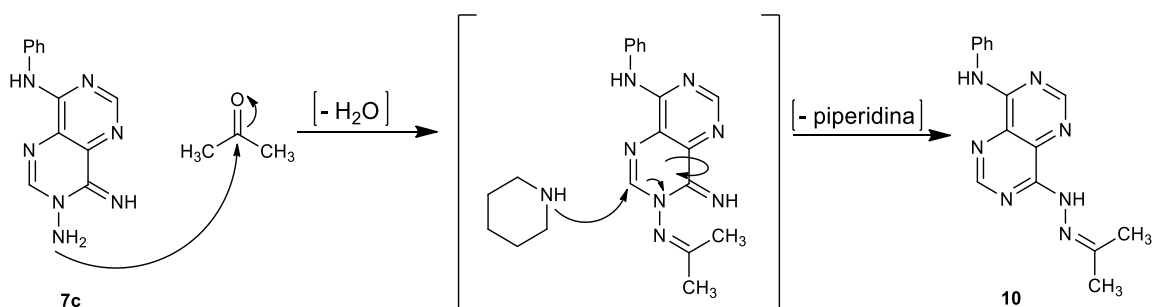
 2.3.2.4. Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100MHz)

Tabela 4 - Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN do composto **10**

Comp.	R	R ¹	C ₂ /C ₆	C ₄ /C _{4a} / C ₈ /C _{8a}	R	R ¹
10*			154,41- 153,77	154,53 130,54 156,08 131,14	138,05 (C _i) 121,10 (C _o) 128,13 (C _m) 123,49 (C _p)	158,42 (C ₉) 24,53 (CH ₃) 16,63 (CH ₃)

(*) Espectro obtido a 80°C

2.3.2.5. Mecanismo de reação com acetona



Esquema 23 - Mecanismo de reação para a obtenção de **10**

A reação inicia-se pelo ataque do grupo NH_2 de **7c** ao grupo carbonilo da acetona, libertando uma molécula de água. Em seguida ocorre o ataque da piperidina ao C2, abrindo o anel. Após a rotação do carbono da função amidina, ocorre o fecho do anel, libertando a piperidina, formando-se o composto **10**.

2.4. Reação da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c** com eletrófilos

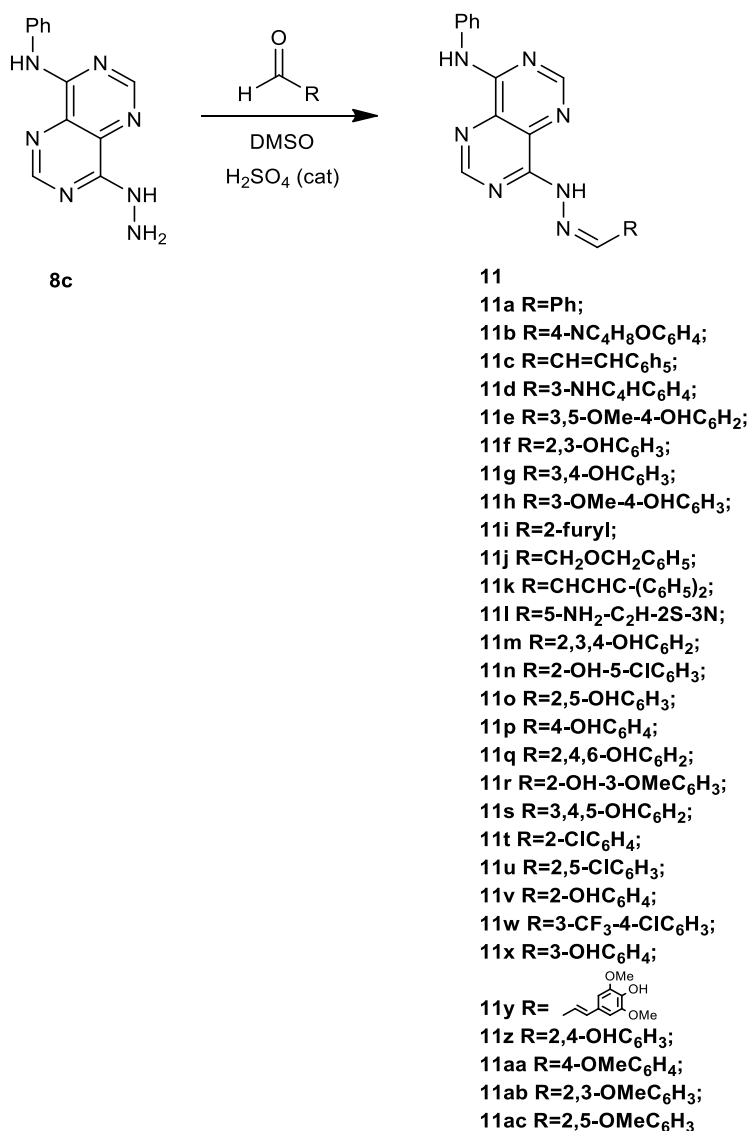
2.4.1. Aldeídos

Os compostos **11** foram sintetizados, por reação da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c** com diferentes aldeídos. Para a síntese de **11** foi utilizado DMSO como solvente e catálise ácida de H_2SO_4 e, as reações ocorreram à temperatura ambiente sob agitação magnética (**Esquema 24**). As reações estavam terminadas ao fim de 10-30min, sendo seguidas por TLC. Quando as reações estavam terminadas, os produtos foram precipitados por adição de água destilada. Os sólidos foram isolados após serem filtrados e lavados com água destilada e éter etílico frio. Com base nos espectros de ^1H RMN, os produtos foram identificados como sendo as pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **11a-11ac**. No entanto, os compostos apareciam

contaminados com DMSO e ácido sulfúrico, como pode ser comprovado na tabela de análise elementar (**Tabela 5**).

Para purificar os compostos **11b**, **11c**, **11d**, **11q**, **11u**, **11v**, **11w**, **11x**, estes foram refluxados em EtOH durante 3 horas. As suspensões resultantes foram filtradas a quente, para que as impurezas presentes permanecessem em solução. A análise dos espectros ^1H RMN das novas amostras permitiu verificar que as impurezas que eram observadas anteriormente já não estavam presentes.

Tanto os compostos isolados diretamente da mistura reacional, como os obtidos após purificação, foram isolados com bons rendimentos (85-98%). A estrutura dos compostos foi confirmada, com base nos espectros de IV (**Tabela 6**), ^1H RMN (**Tabela 7**) e ^{13}C RMN (**Tabela 8**).



Esquema 24 – Reação da pirimido[5,4-d]pirimidina **8c** com aldeídos

2.4.2. Caracterização analítica e espectroscópica dos compostos **11**

2.4.3. Dados físicos e analíticos

Na tabela 1 encontram-se representados os pontos de fusão dos derivados **11a-ac** e os resultados obtidos nas respectivas análises elementares dos compostos que foram submetidos a análise elementar.

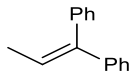
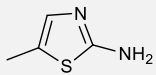
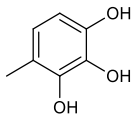
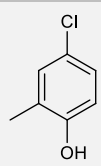
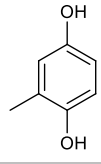
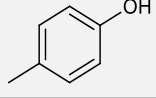
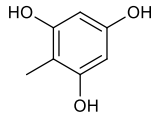
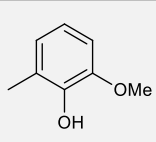
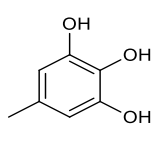
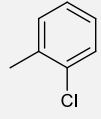
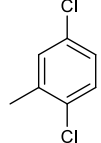
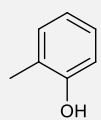
Os dados analíticos das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **11a-11p**, mostram que alguns compostos apresentam água e encontram-se contaminados com DMSO e/ou ácido sulfúrico. No entanto, não foi possível a obtenção das respectivas análises elementares dos compostos **11q-11ac**.

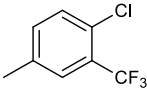
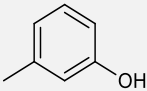
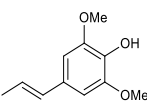
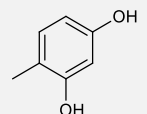
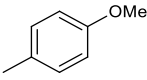
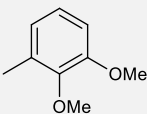
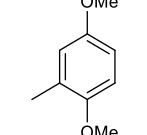
2.4.4. Dados analíticos das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **11**

Tabela 5 - Dados analíticos das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **11**

Comp.	R	R ¹	Ponto de Fusão (°C)	C, H, N, S, Valores obtidos (calculados)	Fórmula Molecular
11a			230-234	57,75; 4,72; 24,65; 1,74 (57,76; 5,31; 24,28; 1,75)	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ .2,4H ₂ O. 0,21DMSO.0,01 H ₂ SO ₄
11b			250-253	56,15; 4,91; 23,39; 3,10 (56,57; 5,08; 22,95; 3,15)	C ₂₃ H ₂₂ N ₈ O.0,48 H ₂ SO ₄ .0,82H ₂ O
11c			232-237	64,39; 4,71; 25,37; 3,25; 1,08 (64,77; 4,73; 25,16; 1,15)	C ₂₁ H ₁₇ N ₇ .0,13 H ₂ SO ₄ .0,49H ₂ O. 0,01DMSO
11d			262-264	57,73; 4,12; 26,05; 3,52 (57,75; 4,28; 25,51; 3,50)	C ₂₁ H ₁₆ N ₈ .0,42 H ₂ SO ₄ .0,72H ₂ O. 0,06DMSO
11e			288-291	57,16; 5,12; 22,57; 1,00 (57,18; 4,70; 22,17; 1,09)	C ₂₁ H ₁₉ N ₇ O ₃ .0,12 H ₂ SO ₄ .0,6 H ₂ O.0,03DMSO
11f			284-289	56,55; 4,50; 24,66; 1,58 (56,57; 4,39; 24,08; 1,42)	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O ₂ .0,09 H ₂ SO ₄ .1H ₂ O.0,09 DMSO
11g			269-272	(53,49; 4,61; 23,36; 2,26) 53,89; 4,71; 22,65; 2,22	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O ₂ .0,21 DMSO.1,9H ₂ O. 0,09H ₂ SO ₄
11h			242-244	55,18; 5,04; 22,92; 0,9 (55,29; 5,15; 22,32; 0,8)	C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O ₂ .2,4 H ₂ O.0,11DMSO
11i			227,3-228	58,30; 4,14; 28,41; 0,969 (58,31; 4,35; 27,68; 0,91)	C ₁₇ H ₁₃ N ₇ O.0,84 H ₂ O.0,1DMSO

Capítulo 2. Discussão de resultados

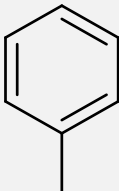
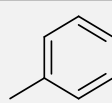
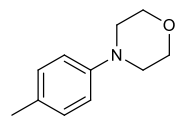
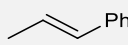
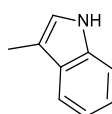
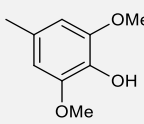
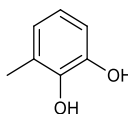
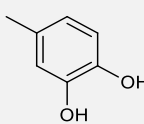
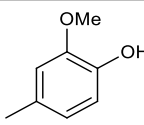
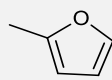
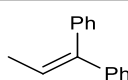
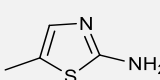
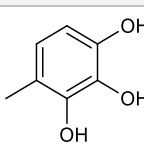
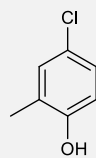
Comp.	R	R ¹	Ponto de Fusão (°C)	C, H, N, S, Valores obtidos (calculados)	Fórmula Molecular
11k			222,3-224,7	66,89; 5,26; 19,72; 3,51 (66,87; 5,23; 19,36; 3,86)	C ₂₇ H ₂₁ N ₇ ·0,84H ₂ O .0,6DMSO
11l			217,1-218	40,38; 4,59; 27,57; 9,63 (40,33; 4,65; 26,46; 9,42)	C ₁₆ H ₁₃ N ₉ S·0,4 H ₂ SO ₄ ·4,1H ₂ O
11m			273,7-275	(55,33; 4,09; 24,54; 0,60) 55,13; 4,19; 23,64; 0,62)	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O ₃ ·0,02 DMSO
11n			258,6-260	(52,89; 4,23; 22,89; 2,35) 52,83; 4,34; 21,96; 2,30	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₇ O·0,32 DMSO·1,65H ₂ O
11o			293,1-294	(53,20; 4,85; 23,56; 0,59) 53,35; 4,96; 22,75; 0,52	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O ₂ ·2,9 H ₂ O·0,07DMSO
11p			281,4-283	(54,75; 4,65; 24,43; 1,97) 54,62; 4,96; 23,15; 1,97	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O·0,13 DMSO·2,4H ₂ O· 0,13H ₂ SO ₄
11q			248,1-249	(58,61; 3,88; 25,18)	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O ₃
11r			249,1-250,5	(62,01; 4,42; 25,31)	C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O ₂
11s			300-301,1	(58,61; 3,88; 25,18)	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O ₃
11t			225,6-226,1	(60,72; 3,75; 26,09)	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₇
11u			255,8-257,2	(55,62; 3,19; 23,90)	C ₁₉ H ₁₃ Cl ₂ N ₇
11v			276,3-277,8	(63,86; 4,23; 27,44)	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O

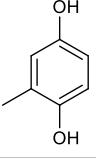
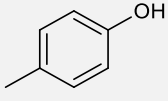
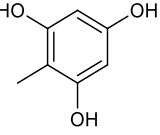
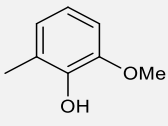
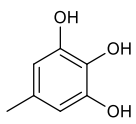
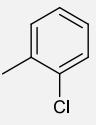
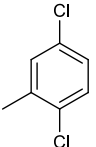
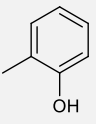
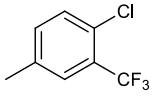
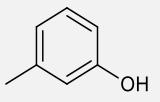
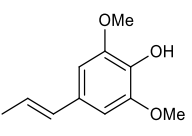
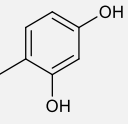
Comp.	R	R ¹	Ponto de Fusão (°C)	C, H, N, S, Valores obtidos (calculados)	Fórmula Molecular
11w			232,9-324,1	(54,13; 2,95; 22,09)	C ₂₀ H ₁₃ ClF ₃ N ₇
11x			263,8-285,1	(63,86; 4,23; 27,44)	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O
11y			269,5-271	(62,29; 4,77; 22,11)	C ₂₃ H ₂₁ N ₇ O ₃
11z			279,6-282	(61,12; 4,05; 26,26)	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O ₂
11aa			228-229	(64,68; 4,61; 26,40)	C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O
11ab			211,1-212	(62,83; 4,77; 24,42)	C ₂₁ H ₁₉ N ₇ O ₂
11ac			220,8-221,7	(62,83; 4,77; 24,42)	C ₂₁ H ₁₉ N ₇ O ₂

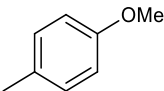
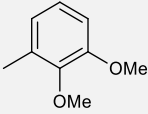
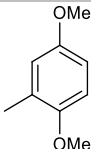
2.4.5. Dados espectroscópicos IV

No espectro de IV das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **11** surgem bandas largas de intensidade média ou intensas, na zona 3500-3100 cm⁻¹, atribuídas às vibrações de estiramento da ligação O-H e N-H. Algumas destas bandas são largas devido às pontes de hidrogénio formadas intra e intermolecularmente. Nos compostos **11d**, **11e**, **11f**, **11r**, **11t**, **11u**, **11v**, **11x** e **11ac**, na zona 3100-3000 cm⁻¹, é possível a observação de bandas de intensidade média ou intensa, atribuídas às vibrações de estiramento da ligação =C-H⁴³. Na região situada entre 1700-1500 cm⁻¹, surgem bandas características das vibrações de estiramento das ligações C=N e C=C em anéis aromáticos. Os valores das bandas observadas encontram-se na tabela (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados espectroscópicos de IV dos compostos 11

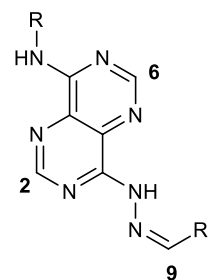
Comp.	R	R ¹	3500-3000	1700-1500
11a			3427m; 3360m	1653m; 1603i; 1567i; 1533m
11b			3458m; 3265m	1649m; 1604i; 1588i; 1565i; 1536i; 1518i;
11c			3353i; 3338i;	1630i; 1599i; 1583i;
11d			3362i; 3319m; 3298m; 3180m	1617i; 1539i; 1568i; 1537i; 1490m
11e			3321i; 3281i; 3167i; 3006m;	1594i; 1566i; 1513i
11f			3369m; 3344m; 3305m; 3219m; 3053m	1604i; 1591i; 1565i; 1539i
11g			3352m; 3289m	1653m; 1596i; 1563i; 1521i
11h			3346f; 3269f	1599m; 1566m; 1537i; 1513m
11i			3444f; 3258f; 3192f	1667i; 1604m; 1572i; 1557i; 1522m
11k			3407m; 3342m	1675f; 1638f; 1602i; 1539i;
11l			3356m; 3250m	1599m; 1570m; 1537m;
11m			3387i; 3338m; 3285i	1615i; 1594i; 1561i; 1537i; 1514i;
11n			3512m; 3347i	1622m; 1600i; 1572i; 1538i

Comp.	R	R ¹	3500-3000	1700-1500
11o			3470m; 3382i;	1604m; 1586i; 1564i; 1539i
11p			3342f; 3302f	1595i; 1554i; 1537i; 1518i
11q			3316m; 3211m	1617i; 1595m; 1575m; 1545i; 1521m; 1503i;
11r			3342i; 3342i; 3217m; 3097f; 3065f	1660m; 1599i; 1582i; 1562i; 1541i;
11s			3348m; 3258m	1596i; 1543i
11t			3436i; 3353i; 3232m; 3069m	1697f; 1627m; 1603i; 1577i; 1557i; 1537i;
11u			3338i; 3243i; 3106m; 3061m	1607i; 1563i; 1523i
11v			3346m; 3320m; 3049f	1606i; 1589i; 1569i; 1543i;
11w			3413m; 3339m; 3195m	1660m; 1605i; 1571i; 1546i;
11x			3223m; 3309m; 3046m	1599i; 1566i; 1543i
11y			3340f; 3290m; 3172f	1660f; 1622m; 1602i; 1564i; 1535i; 1512i
11z			3369m; 3230m;	1685f; 1632i; 1607i; 1590i; 1561i; 1534i

Comp.	R	R ¹	3500-3000	1700-1500
11aa			3350i; 3313m	1651f; 1603i; 1556i; 1534i; 1510i
11ab			3354m; 3310m	1560m; 1581i; 1563i; 1540i;
11ac			3499m; 3346m; 3288m; 3043f	1657f; 1622m; 1599i; 1561i; 1536i;

2.4.6. Dados espectroscópicos de ¹H RMN (DMSO-d₆, 400MHz) para os compostos **11**

Os espectros de ¹H RMN das pirimido[5,4-d]pirimidinas **11**, apresentam dois ou três singletos bem definidos no intervalo δ 9,11-8,56ppm correspondentes aos prótons H₂, H₆ e H₉ (*Tabela 7*). O próton H₆ foi identificado através do espectro de HMBC, através do acoplamento a 2 ligações do NH₈ com o C₈. Como o H₆ acopla com C₈ a 3 ligações, foi possível a sua identificação. O H₂ foi identificado por exclusão de partes. Relativamente aos compostos **11c**, **11k** e **11y** o próton H₉ aparece como um duplete, devido aos prótons adjacentes presentes na molécula, com um desvio entre δ 8,48-8,45ppm. Na zona aromática é possível observar-se um duplete no intervalo δ 8,0-7,95ppm que integra para dois prótons, referente aos prótons *orto*, um triplete a δ 7,41-7,38ppm a integrar para dois prótons e um triplete no intervalo de δ 7,19-7,12ppm a integrar para um próton, referentes aos prótons *meta* e *para* do anel aromático da posição 8.

Tabela 7 - Dados espectroscópicos de ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6) dos compostos **11**


Comp.	R	R ¹	H _z /H ₆	R	R ¹
11a			8,59 (s,1H) 8,74 (s,1H)	7,93 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,41 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,19 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	8,75 (s, 1H, H ₉) 7,91 (s, 2H, 7,6Hz, H _o ') 7,52 (s, 3H, H _m ' + H _p ')
11b			8,61 (s,1H) 8,69 (s, 1H)	7,94 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,40 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,17 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	8,56 (s, 1H, H ₉) 7,73 (d, 2H, 8,8Hz, H _o ') 7,03 (d, 2H, 8,8Hz, H _m ') 3,73 (t, 4H, H ₁₁ , 4,4Hz) 3,25 (t, 4H, H ₁₀ , 4,4Hz)
11c			8,61 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	7,97 (d, 2H, H _o , 7,6Hz) 7,14 (t, 1H, 7,6Hz, H _p) a)	8,48 (d, 1H, 6,4Hz, H ₉) 7,62 (d, 2H, 8,4Hz, H _o ') 7,42-7,38 (m, 5H, H _m + H _m ' + H _p ') 7,08 (m, 2H, H ₁₀ +H ₁₁)
11d			8,70 (s, 1H) 8,62 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,40 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,16 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	11,8 (sl, 1H, N ₃ H), 8,92 (s, 1H, H ₉), 8,47 (d, 1H, 6,8Hz, H ₇) 7,95 (d, 1H, 3,2Hz, H ₂ '), 7,47 (dd, 1H, 6,8Hz, H ₄ '), 7,25 (m, 2H, H ₅ +H ₆)
11e			8,64 (s, 1H) 8,66 (s, 1H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	8,94 (sl, 1H, OH) 8,54 (s, 1H, H ₉) 7,02 (s, 2H, H _o ') 3,84 (s, 6H, OMe)
11f			8,73 (s, 1H) 8,69 (s, 1H)	8,01 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,14 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	12,39 (sl, 1H, OH) 11,54 (sl, 1H, OH) 8,80 (s, 1H, H ₉) 6,92 (d, 1H, 7,6Hz, H _o ') 6,86 (dd, 1H, 7,6Hz, H _p ') 6,75 (t, 1H, 7,6Hz, H _m ')

Comp.	R	R ¹	H ₂ /H ₆	R	R ¹
11g			8,60 (s, 1H) 8,66 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,14 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	9,49 (sl, 1H, OH) 9,26 (sl, 1H, OH) 8,51 (s, 1H, H ₉) 7,32 (d, 1H, 2Hz, H _{o''}) 6,99 (d, 1H, 8Hz, H _{o'}) 6,81 (d, 1H, 8Hz, H _{m'})
11h			8,61 (s, 1H) 8,65 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, H _o , 8,4Hz) b) 7,14 (t, 2H, H _p +H _{o'})	8,56 (s, 1H, H ₉) 7,39 (m, 3H, H _m + H _{o''}) c) 6,86 (d, 1H, 8Hz, H _{m'}) 3,85 (s, 3H, OMe)
11i			8,64 (s, 2H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,37 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,12 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	8,55 (s, 1H, H ₉) 7,86 (d, 1H, 1,6Hz, H ₁₃) 6,94 (d, 1H, 3,2Hz, H ₁₁) 6,64 (dd, 1H, 3,6Hz, H ₁₂)
11k			8,64 (s, 1H) 8,58 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) g) 7,12 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	12,01 (sl, 1H, NH ₄) 10,07 (s, 1H, NH ₈) 8,36 (d, 1H, 10Hz, H ₉) 7,49 (m, 3H, H _{o''} + H _{p'}) 7,35 (m, 7H, H _m + H _{m'} + H _{p'}) 7,25 (dd, 2H, 8Hz, H _{o'}) 6,97 (d, 1H, 10Hz, H ₁₀)
11l			8,57 (s, 1H) 8,64 (s, 1H)	7,97 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	8,68 (s, 1H, H ₉) 8,07 (sl, 2H, NH ₂) 7,50 (s, 1H, H ₁₀)
11m			8,68 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	12,21 (sl, 1H, OH) 11,84 (sl, 1H, OH) 9,49 (s, 1H, OH) 8,68 (s, 1H, H ₉) 6,75 (d, 1H, 8,8Hz, H _{o'}) 6,41 (d, 1H, 8,8Hz, H _{m'})
11n			8,72 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,14 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	11,38 (sl, 1H, OH) 9,78 (sl, 1H, NH ₈) 8,79 (s, 1H, H ₉) 7,57 (d, 1H, 2,4Hz, H _{o'}) 7,30 (dd, 1H, 8,4/8,8Hz, H _{p'}) 6,96 (d, 1H, 8,8Hz, H _{m'})

Comp.	R	R ¹	H ₂ /H ₆	R	R ¹
11o			8,72 (s, 1H) 8,68 (s, 1H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	10,68 (sl, 1H, OH) 8,98 (sl, 1H, OH) 8,76 (s, 1H, H ₉) 6,91 (d, 1H, 1,6Hz, H _o ') 6,78-6,72 (m, 2H, H _m ' + H _p ')
11p			8,61 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	7,99 (d, 2H, 7,2Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 7,2Hz, H _m) 7,15 (t, 1H, 7,2Hz, H _p)	10,04 (sl, 1H, OH) 8,60 (s, 1H, H ₉) 7,66 (d, 2H, 8,8Hz, H _o ') 6,87 (d, 2H, 8,8Hz, H _m ')
11q			8,62 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	7,97 (d, 2H, 8Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 8Hz, H _m) 7,14 (t, 1H, 7,2Hz, H _p)	10,99 (sl, 2H, OH) 9,02 (s, 1H, H ₉) 5,85 (s, 2H, H _m ')
11r			8,71 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,14 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	8,83 (s, 1H, H ₉) 7,09 (dd, 1H, 7,6Hz, H _o ') 7,04 (dd, 1H, 8Hz, H _p ') 6,87 (t, 1H, 8Hz, H _m ')
11s			8,61 (s, 1H) 8,66 (s, 1H)	7,99 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	9,15 (sl, 1H, OH) 8,43 (s, 1H, H ₉) 6,76 (s, 2H, H _o ')
11t			8,71 (s, 1H) 8,68 (s, 1H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,2Hz, H _p)	9,11 (s, 1H, H ₉) 8,11 (dd, 1H, H _o ') 7,52- 7,45 (m, 3H, H _m ' + H _m '' + H _p ')
11u			8,71 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,15 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	9,03 (s, 1H, H ₉) 8,09 (d, 1H, 2,4Hz, H _o ') 7,54 (d, 1H, 8,8Hz, H _m '') 7,48 (dd, 1H, 8,8Hz, H _p ')
11v			8,74 (s, 1H) 8,68 (s, 1H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,14 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	11,53 (sl, 1H, OH) 8,84 (s, 1H, H ₉) 7,49 (d, 1H, 7,2Hz, H _o ') 7,31 (dt, 1H, 6,8/8,8Hz, H _p ') 6,93 (t, 2H, 7,6Hz, H _m ' + H _m '')

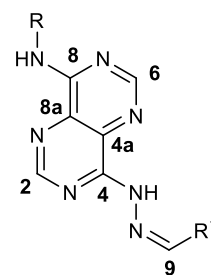
Comp.	R	R ¹	H ₂ /H ₆	R	R ¹
11w			8,69 (s, 1H) 8,66 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	10,09 (sl, 1H, NH ₈) 8,70 (s, 1H, H ₉) 8,17 (d, 1H, 2Hz, H _{o''}) 8,03 (d, 1H, 8,4Hz, H _{o'}) 7,80 (d, 1H, 8,4Hz, H _{m'})
11x			8,64 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	7,98 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6 Hz, H _m) d	8,61 (s, 1H, H ₉) e 7,15 (t, 2H, 7,6Hz, H _p + H _{p'}) 6,85 (dd, 1H, 2,4Hz, H _{o''})
11y			8,66 (s, 1H) 8,61 (s, 1H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	8,45 (d, 1H, 9,2Hz, H ₉) 7,05 (t, 1H, 6,8Hz, H ₁₀) 6,95 (s, 2H, H _{o'}) 6,91 (s, 1H, H ₁₁) 3,82 (s, 6H, OMe)
11z			8,67 (s, 1H) 8,66 (s, 1H)	7,99 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,36 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	11,68 (sl, 1H, OH) 10,01 (sl, 1H, OH) 8,72 (s, 1H, H ₉) 7,27 (d, 1H, 8,4Hz, H _{o''}) 6,37 (dd, 1H, 8,4/8,8Hz, H _{m'}) 6,33 (d, 1H, 2,4Hz, H _{m''})
11aa			8,59 (s, 1H) 8,64 (s, 1H)	7,97 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	10,07 (sl, 1H, NH ₈) 8,60 (s, 1H, H ₉) 7,72 (d, 2H, 8,8Hz, H _{o'}) 7,0 (d, 2H, 8,8Hz, H _{m'}) 3,81 (s, 3H, OMe)
11ab			8,68 (s, 1H) 8,67 (s, 1H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) f	10,08 (sl, 1H, NH ₈) 8,99 (s, 1H, H ₉) 7,56 (dd, 1H, 7,2/7,6Hz, H _{o'}) 7,12 (m, 3H, H _p + H _{m'} + H _{p'}) 3,83 (s, 3H, OMe) 3,79 (s, 3H, OMe)
11ac			8,66 (s, 2H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	8,98 (s, 1H, H ₉) 7,47 (d, 1H, 2,8Hz, H _{o'}) 7,05 (d, 1H, 8,8Hz, H _{m'}) 7,0 (dd, 1H, 8,8/9,2Hz, H _{p'}) 3,81 (s, 3H, OMe) 3,77 (s, 3H, OMe)

- a) Os prótons H_m encontram-se sobrepostos a δ 7,42-7,38ppm com os prótons H_{m'} + H_{p'};
 b) Os prótons H_m encontram-se sobrepostos a δ 7,39ppm com os prótons H_{o''};
 c) O próton H_p encontra-se sobreposto a δ 7,14ppm com os prótons H_{o'};
 d) O próton H_p encontra-se sobreposto a δ 7,15ppm com o próton H_{p'};
 e) Os prótons H_{m'} encontram-se sobrepostos a δ 7,27ppm com os prótons H_{o'};
 f) Os prótons H_p encontram-se sobrepostos a δ 7,12ppm com os prótons H_{m'} + H_{p'};
 g) Os prótons H_m encontram-se sobrepostos a δ 7,35ppm com os prótons H_{m'} + H_{m''} + H_{p'};

2.4.7. Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100MHz) para os compostos **11**

Os espectros de ^{13}C RMN, dos compostos **11**, foram obtidos a 25°C exceto alguns casos em que foi necessária a sua aquisição a 80°C, devido à baixa solubilidade de alguns compostos (**11n**, **11r**, **11u**). No espectro do composto **11u**, realizado a 80°C, não foi possível a observação dos sinais do C4a e C8a, devido ao seu alargamento. No espectro era possível observar sinais característicos. Largos para os C2, C4, C4a e C8a e os restantes sinais estreitos. Por HMBC é possível identificar-se os sinais do carbono 6 a δ 153,8-154,6ppm, através do acoplamento a 2 ligações de NH8 com o C8 a δ 156,3-156,4ppm. Como o H6 acopla a 3 ligações com o C8 é possível a sua identificação. Através do acoplamento a 3 ligações do H6 foi possível identificar o carbono 4a com um desvio químico de δ 131,2-131,8ppm. O C2 a δ 149,19-153,6ppm é atribuído por exclusão de partes, após a atribuição de C6 e pelo sinal característico apresentado por C2, um sinal largo de baixa intensidade. Os sinais do anel da pirimido[5,4-*d*]pirimidina, C4 e C8a, são atribuídos através do acoplamento a 3 ligações do H2 com o C4 a δ 150,9-154,9ppm e com C8a a δ 131,2-132,6ppm.

Os carbonos do grupo fenilo da posição 8 foram também identificados através do espectro de HMBC. Nestes espectros, é possível observar-se o acoplamento a 3 ligações do NH8 com o carbono *orto* a δ 122,46-121,18ppm. Os carbonos *meta*, *ipso* e *para* do grupo fenilo apresentam interação com os H_o o que permite as suas atribuições (**Tabela 8**). O C_i foi identificado com base no acoplamento, a 2 ligações, com o próton H_9 . A correlação a 3 ligações entre H_9 e os Co' de R^1 permitiu também a atribuição dos Co' sem qualquer dúvida.

Tabela 8 - Dados espectroscópicos de ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) dos compostos **11**


Comp.	R	R ¹	C ₂ /C ₆	C ₄ , C _{4a} , C ₈ , C _{8a}	R	R ¹
11a			149,19 154,47	151,01 (C ₄) 132,16 (C _{4a}) 156,58 (C ₈) 131,0 (C _{8a})	137,76 (C _i) 122,46 (C _o) 128,62 (C _m) 124,77 (C _p)	153,18 (C ₉) 133,62 (C _{i'}) 128,09 (C _{o'}) 128,96 (C _{m'}) 131,19 (C _{p'})
11b			149,38 154,69	150,89 (C ₄) 132,52 (C _{4a}) 156,43 (C ₈) 130,91 (C _{8a})	137,99 (C _i) 122,19 (C _o) 128,6 (C _m) 124,48 (C _p)	152,89 (C ₉ +C _{i''}) 123,43 (C _{i'}) 122,19 (C _{o'}) 114,09 (C _{m'}) 65,92 (C ₁₁) 47,17 (C ₁₀)
11c			152,81 154,16	153,55 (C ₄) 131,56 (C _{4a}) 156,45 (C ₈) 132,04 (C _{8a})	138,22 (C _i) 121,89 (C _o) 128,54 (C _m) 124,15 (C _p)	152,16 (C ₉) 125,38 (C ₁₀) 140,05 (C ₁₁) 135,8 (C _{i'}) 127,22 (C _{o'}) 128,9 (C _{m'}) 129,09 (C _{p'})
11d			150,95 154,41	151,27 (C ₄) 132,89 (C _{4a}) 156,34 (C ₈) 130,89 (C _{8a})	138,19 (C _i) 121,9 (C _o) 128,55 (C _m) 124,19 (C _p)	149,05 (C ₉) 111,46 (C _{1'}) 132,39 (C _{2'}) 112,0 (C _{4'}) 120,84 (C _{5'}) 122,96 (C _{6'}) 122,39 (C _{7'}) 137,18 (C _{8'}) 124,19 (C _{9'})
11e			154,22 (C ₂ +C ₆)	153,99 (C ₄) 132,01 (C _{4a} +C _{8a}) 156,36 (C ₈)	138,16 (C _i) 121,6 (C _o) 128,5 (C _m) 123,84 (C _p)	149,94 (C ₉) 124,64 (C _{i'}) 104,84 (C _{o'}) 56,07 (C _{OMe})
11f			154,37 154,22	154,61 (C ₄) 131,19 (C _{4a}) 156,45 (C ₈) 132,57 (C _{8a})	138,33 (C _i) 121,74 (C _o) 128,51 (C _m) 123,98 (C _p)	149,94 (C ₉) 118,67 (C _{i'}) 120,42 (C _{o'}) 119,16 (C _{m'}) 117,42 (C _{p'})
11g			153,28 154,12	153,74 (C ₄) 131,73 (C _{4a}) 156,41 (C ₈) 131,85 (C _{8a})	138,35 (C _i) 121,77 (C _o) 128,56 (C _m) 124,03 (C _p)	125,69 (C _{i'}) 121,0 (C _{o'}) 113,19 (C _{o''}) 115,65 (C _{m'}) 145,78 (C _{OHm''}) 148,78 (C _{OHp'})

Comp.	R	R ¹	C ₂ /C ₆	C ₄ , C _{4a} , C ₈ , C _{8a}	R	R ¹
11h			153,28 154,17	153,72 (C ₄) 131,82 (C _{4a}) 156,43 (C ₈) 131,92 (C _{8a})	138,38 (C _i) 121,77 (C _o) 128,60 (C _m) 124,06 (C _p)	125,71 (C _i) 122,64 (C _o) 115,55 (C _m) 109,51 (C _o '') 148,13 (COMe) 149,38 (COH) 55,71 (COMe)
11i			154,19 154,11	154,69 (C ₄) 131,49 (C _{4a}) 156,46 (C ₈) 132,32 (C _{8a})	138,41 (C _i) 121,73 (C _o) 128,57 (C _m) 124,0 (C _p)	138,71 (C ₉) 149,67 (C ₁₀) 113,69 (C ₁₁) 112,43 (C ₁₂) 145,36 (C ₁₃)
11k			154,59 153,88	154,77 (C ₄) 131,30 (C _{4a}) 156,38 (C ₈) 132,48 (C _{8a})	138,40 (C _i) 121,65 (C _o) 128,52 (C _m) 123,86 (C _p)	149,35 (C ₉) 124,37 (C ₁₀) 138,0 (C ₁₁) 140,57 (C _i) 148,83 (C _i '') 130,10 (C _o) a)
11l			153,11 154,07	153,04 (C ₄) 131,82 (C _{4a}) 156,35 (C ₈) 131,66 (C _{8a})	138,31 (C _i) 121,74 (C _o) 128,52 (C _m) 124,0 (C _p)	143,75 (C ₉) 121,56 (C ₁₀) 142,98 (C ₁₁) 170,72 (C ₁₂)
11m			154,42 154,11	154,36 (C ₄) 131,21 (C _{4a}) 156,4 (C ₈) 132,37 (C _{8a})	138,38 (C _i) 121,69 (C _o) 128,53 (C _m) 123,94 (C _p)	150,91 (C ₉) 110,98 (C _i) 121,38 (C _o) 107,74 (C _m) 147,63 (C _o '') 132,82 (C _m '') 148,81 (C _p '')
11n			154,14 153,77	154,66 (C ₄) 130,91 (C _{4a}) 156,10 (C ₈) 132,35 (C _{8a})	137,94 (C _i) 121,18 (C _o) 128,07 (C _m) 123,53 (C _p)	147,14 (C ₉) 120,18 (C _i) 127,97 (C _o) 117,97 (C _m '') 130,21 (C _p '') 155,90 (COH'') 122,60 (C _m '')
11o			154,39 154,18	154,56 (C ₄) 131,22 (C _{4a}) 156,44 (C ₈) 132,5 (C _{8a})	138,56 (C _i) 121,73 (C _o) 128,52 (C _m) 123,97 (C _p)	149,17 (C ₉) 118,8 (C _i) 114,43 (C _o) 117,18 (C _m '') 119,02 (C _p '') 150,47 (C _o '') 149,86 (C _m '')
11p			152,63 154,16	153,30 (C ₄) 131,9 (C _{4a}) 156,38 (C ₈) 131,65 (C _{8a})	138,29 (C _i) 121,79 (C _o) 128,53 (C _m) 124,04 (C _p)	150,7 (C ₉) 125,15 (C _i) 129,37 (C _o) 115,79 (C _m) 159,84 (C _p)
11q			153,6 153,84	152,72 (C ₄) 131,28 (C _{4a}) 156,38 (C ₈) 131,68 (C _{8a})	138,22 (C _i) 121,87 (C _o) 128,56 (C _m) 124,16 (C _p)	148,78 (C ₉) 99,44 (C _i) 94,45 (C _m) 159,95 (C _o) 161,96 (C _p)

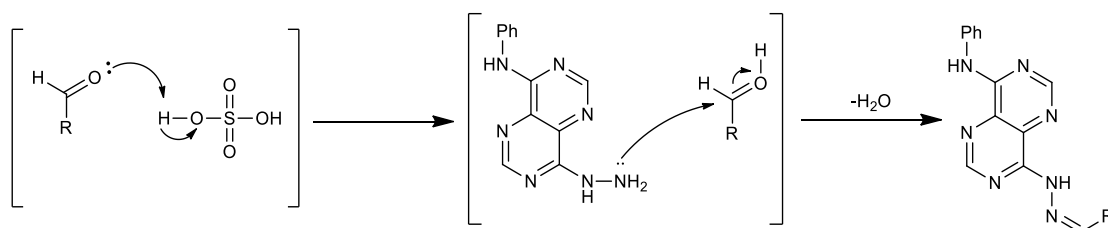
Comp.	R	R ¹	C ₂ /C ₆	C ₄ , C _{4a} , C ₈ , C _{8a}	R	R ¹
11r			154,02 153,74	154,36 (C ₄) 130,96 (C _{4a}) 156,13 (C ₈) 132,21 (C _{8a})	137,97 (C _i) 121,20 (C _o) 128,11 (C _m) 123,57 (C _p)	149,47 (C ₉) 118,67 (C _{i'}) 121,54 (C _{o'}) 118,56 (C _{m'}) 114,68 (C _{p'}) 147,55 (C _{O''}) 147,87 (C _{m''}) 56,01 (OMe)
11s			153,65 154,03	154,03 (C ₄) 131,56 (C _{4a}) 156,39 (C ₈) 131,94 (C _{8a})	138,36 (C _i) 121,72 (C _o) 128,51 (C _m) 123,95 (C _p)	150,51 (C ₉) 124,54 (C _{i'}) 106,63 (C _{o'}) 146,2 (C _{m'}) 136,12 (C _{p'})
11t			154,16 (C ₂ +C ₆)	154,97 (C ₄) 131,44 (C _{4a}) 156,45 (C ₈) 132,5 (C _{8a})	138,36 (C _i) 121,72 (C _o) 128,51 (C _m) 123,95 (C _p)	144,96 (C ₉) 131,84 (C _{i'}) 127,0 (C _{o'}) 127,55 (C _{m'}) 131,44 (C _{p'}) 129,95 (C _{m''})
11u			153,33 153,8	154,22 (C ₄) 156,10 (C ₈)	137,96 (C _i) 121,18 (C _o) 128,08 (C _m) 123,53 (C _p)	142,77 (C ₉) 133,45 (C _{i'}) 125,82 (C _{o'}) 131,21 (C _{m''}) 130,32 (C _{p'}) 131,36 (C _{o''}) 131,94 (C _{m'})
11v			154,34 154,21	154,59 (C ₄) 132,53 (C _{4a}) 156,44 (C ₈) 131,21 (C _{8a})	138,35 (C _i) 121,73 (C _o) 128,51 (C _m) 123,98 (C _p)	149,46 (C ₉) 118,62 (C _{i'}) 129,97 (C _{o'}) 119,36 (C _{m'}) 116,55 (C _{m''}) 131,41 (C _{p'}) 157,63 (C _{o''})
11w			153,83 154,22	154,68 (C ₄) 131,74 (C _{4a}) 156,43 (C ₈) 132,31 (C _{8a})	138,34 (C _i) 121,72 (C _o) 128,51 (C _m) 123,96 (C _p)	146,32 (C ₉) 134,22 (C _{i'}) 132,31 (C _{m'}) 131,58 (C _{o''}) 127,17 (q; 30Hz; C _{m''}) 126,75 (q; 5Hz; C _{p'}) 125,63 (q; 16Hz; C _{o'}) 121,34 (q; 272Hz; CF ₃)
11x			153,05 154,15	153,89 (C ₄) 138,25 (C _{4a}) 156,43 (C ₈) 131,99 (C _{8a})	138,25 (C _i) 121,83 (C _o) 128,52 (C _m) 124,08 (C _p)	157,51 (C _{m''}) 150,16 (C ₉) 129,91 (C _{m'}) 119,04 (C _{o'}) 117,72 (C _{p'}) 113,06 (C _{o''})
11y			153,97 (C ₂ +C ₆)	154,29 (C ₄) 131,42 (C _{4a}) 156,4 (C ₈) 132,21 (C _{8a})	138,37 (C _i) 121,69 (C _o) 128,49 (C _m) 123,92 (C _p)	151,76 (C ₉) 123,12 (C ₁₀) 140,26 (C ₁₁) 126,46 (C _{i'}) 104,93 (C _{o'}) 148,09 (C _{m'+m''}) 137,0 (C _{p'}) 56,01 (OMe)

Comp.	R	R ¹	C ₂ /C ₆	C ₄ , C _{4a} , C ₈ , C _{8a}	R	R ¹
11z			154,30 154,11	156,39 (C ₄ +C ₈) 131,30 (C _{4a}) 132,24 (C _{8a})	138,39 (C _i) 121,68 (C _o) 128,53 (C _m) 123,94 (C _p)	150,34 (C ₉) 110,66 (C _i) 131,70 (C _o) 107,81 (C _m) 102,78 (C _m) 160,87 (C _o +p)
11aa			152,51 154,13	153,28 (C ₄) 131,81 (C _{4a}) 153,33 (C ₈) 131,65 (C _{8a})	138,25 (C _i) 121,75 (C _o) 128,49 (C _m) 124,02 (C _p)	156,33 (C ₉) 126,67 (C _i) 129,13 (C _o) 114,32 (C _m) 161,13 (C _p) 55,32 (OMe)
11ab			154,30 154,03	154,88(C ₄) 131,38 (C _{4a}) 156,41 (C ₈) 132,33 (C _{8a})	138,4 (C _i) 121,66 (C _o) 128,49 (C _m) 124,34 (C _p)	152,75 (C _m) 148,16 (C _o) 128,05 (C _i) 117,15 (C _o) 123,88 (C _m) 114,22 (C _p) 61,35 (OMe _{o'}) 55,75 (OMe _{m'})
11ac			154,25 154,03	154,75 (C ₄) 131,59 (C _{4a}) 156,39 (C ₈) 132,25 (C _{8a})	138,44 (C _i) 121,63 (C _o) 128,51 (C _m) 123,80 (C _p)	144,65 (C ₉) 123,26 (C _i) 109,61 (C _o) 113,63 (C _m) 117,54 (C _p) 152,45 (C _o) 153,28 (C _m) 56,40 (OMe _{o'}) 55,53(OMe _{m'})

a) Não foi possível a atribuição dos restantes sinais, Ho'', Hm', Hm'', Hp' e Hp'' com confiança

2.4.8. Mecanismo de reação com aldeídos

No esquema (Esquema 25) está representado o mecanismo de reação para a síntese dos derivados das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **11**.



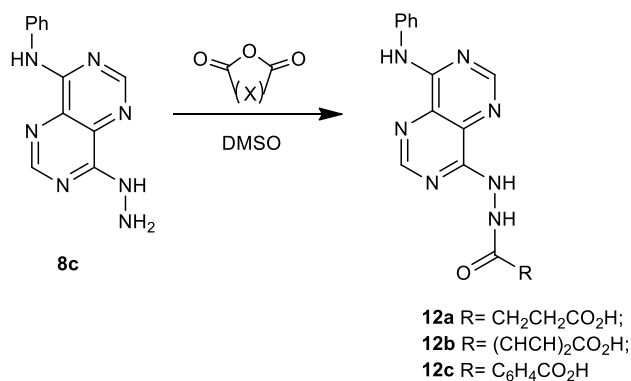
Esquema 25- Mecanismo de síntese das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **11**

O mecanismo reacional entre a hidrazina **8c** e aldeídos, de forma a obter-se os produtos **11a-ac**, inicia-se pela protonação do carbonilo do aldeído, pelo ácido utilizado na catálise, formando-se um intermediário com uma estrutura com um carbono eletropositivo. O carbono positivo sofre um ataque nucleofílico por parte do NH₂ da unidade de hidrazina.

Após o ataque da amina ocorre a transferência de um próton do nitrogénio para o grupo hidroxilo, facilitando a sua saída na forma de H₂O. Em seguida o par de eletrões livre do nitrogénio é transferido para o carbono quaternário, libertando o grupo H₂O, formando a pirimido[5,4-*d*]pirimidina **11**.

2.5. Anidridos

Os compostos **12** foram sintetizados, por reação da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c**, com anidridos, respetivamente anidrido succínico, anidrido maléico e anidrido ftálico. Para a síntese de **12** foi utilizado DMSO como solvente e as reações ocorreram à temperatura ambiente sob agitação magnética (**Esquema 26**). As reações estavam terminadas ao fim de 1 hora de reação, sendo seguidas por TLC. Quando as reações estavam terminadas, os produtos foram precipitados por adição de água destilada. Os sólidos foram isolados após serem filtrados e lavados com água destilada e éter etílico frio. A estrutura dos compostos foi confirmada, com base nos espetros de ¹H RMN (**Tabela 11**), ¹³C (**Tabela 12**) e IV (**Tabela 10**) Os compostos **12b-c** apareciam contaminados com DMSO, como pode ser comprovado na tabela de análise elementar (**Tabela 9**).



Esquema 26 - Síntese das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **12a-c**

Os compostos isolados diretamente da mistura reacional, foram isolados com bons rendimentos (95-98%).

Para a síntese do derivado **12a**, inicialmente foi utilizado DMSO como solvente e catálise ácida de H₂SO₄. A reação ocorreu à temperatura ambiente sob agitação magnética. Após 1 hora de reação, controlada por TLC, precipitou um sólido no meio reacional. O sólido foi isolado sob vácuo e lavado com água destilada e éter etílico frio. Quando o sólido foi analisado por espectroscopia de ¹H RMN, no espectro era possível apenas a identificação de sinais pertencentes aos prótons H₂ e H₆ e os prótons *orto*, *meta* e *para* de **8c**.

Uma vez que no espectro de ¹H RMN era possível apenas a identificação do reagente de partida, procedeu-se a um novo teste, modificando-se a temperatura a que a reação era efetuada. A reação foi efetuada a 80°C, e após 30 minutos, precipitou um sólido. O sólido foi isolado sob vácuo e lavado com água destilada e éter etílico frio. Após análise do sólido isolado, por ¹H RMN, identificou-se novamente a presença dos sinais pertencentes aos prótons H₂ e H₆ e os prótons *orto*, *meta* e *para* de **8c**. Após os resultados obtidos em ambas as condições reacionais, testou-se a utilização de catálise básica.

A reação foi repetida, utilizando-se EtOH e DMSO como solventes, e catálise básica, Et₃N, em ambos os casos. Os sólidos isolados em ambas as reações foram analisados por ¹H RMN, onde se verificava novamente a presença de sinais pertencentes aos prótons H₂ e H₆ e os prótons *orto*, *meta* e *para* do reagente de partida **8c**.

A reação foi ainda efetuada usando 5 equivalentes de anidrido, em DMSO. Após 22 horas de reação à temperatura ambiente, o sólido que foi isolado do meio reacional foi analisado por ^1H RMN, verificando-se novamente a presença de sinais pertencentes aos prótons H_2 e H_6 e os prótons *orto*, *meta* e *para* de **8c**.

Após análise dos espectros de ^1H RMN dos sólidos isolados, onde era possível apenas a identificação dos sinais dos prótons do grupo fenilo e do anel de pirimido pirimidina de **8c**, decidiu-se utilizar um anidrido diferente, o anidrido maleico. A reação com anidrido maleico foi realizada com catálise de H_2SO_4 e sem catálise, usando DMSO como solvente. Após 1 hora de reação, reação controlada por TLC, os sólidos que precipitaram no meio reacional, foram isolados e analisados por TLC e por espectroscopia de ^1H RMN.

Pelo espectro de ^1H RMN foi possível a identificação de um conjunto de dupletos a δ 6,48-6,45ppm e a δ 6,36-6,33ppm. Estes sinais foram identificados como sendo sinais pertencentes aos grupos $\text{CH}=\text{CH}$ da unidade de anidrido maleico introduzida e o produto foi identificado como sendo o composto **12b**.

Verificando-se que a reação entre **8c** e anidrido maleico ocorria à temperatura ambiente, sem necessitar de catálise, o sólido recolhido após a última tentativa de reação com anidrido succínico, foi analisado por espectroscopia de ^{13}C (**Figura 13**). No espectro de ^{13}C foi possível identificar-se a presença de dois sinais com desvios químicos de δ 28,86 e δ 28,23ppm, referente aos dois grupos CH_2 . Por análise do espectro de HSQC (**Figura 14**), é possível identificar-se a correlação dos sinais a δ 28,86 e δ 28,23ppm com o sinal do DMSO- d_6 . Na análise do espectro de HMBC, é possível identificar-se duas correlações entre os prótons a δ 2,49ppm e os grupos carbonilo da molécula (**Figura 15**).

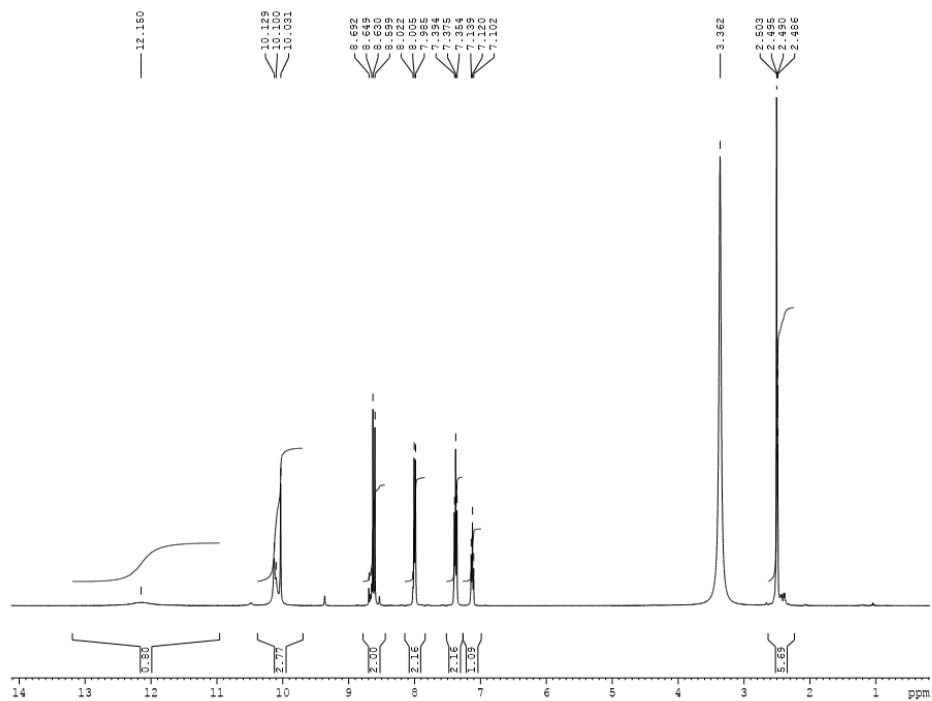


Figura 12 - Espectro de ^1H RMN do composto **12a** obtido a 400MHz em DMSO-d_6

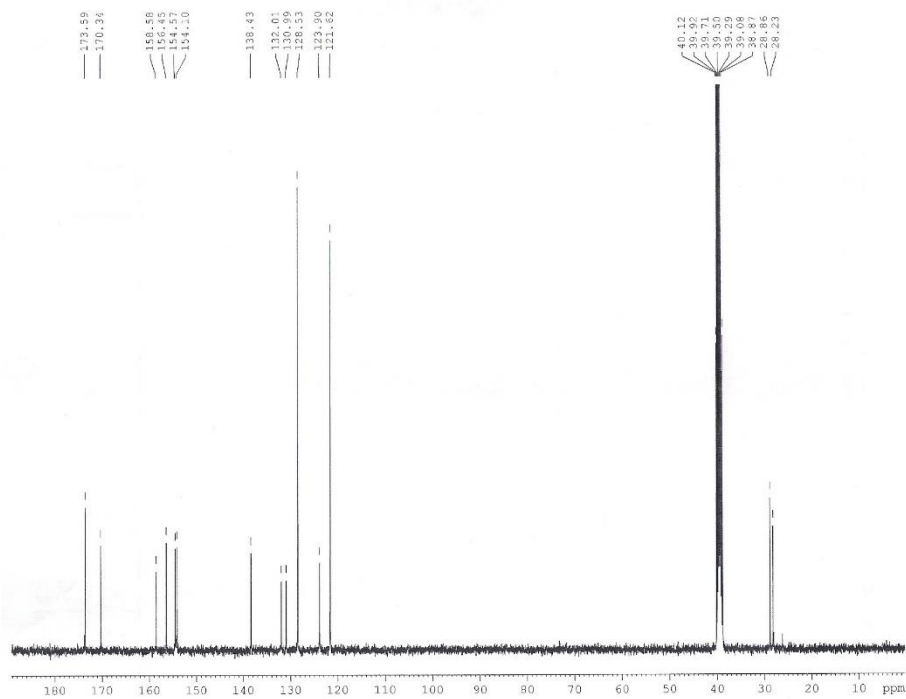


Figura 13 - Espectro de ^{13}C do composto **12a** obtido a 100MHz em DMSO-d_6

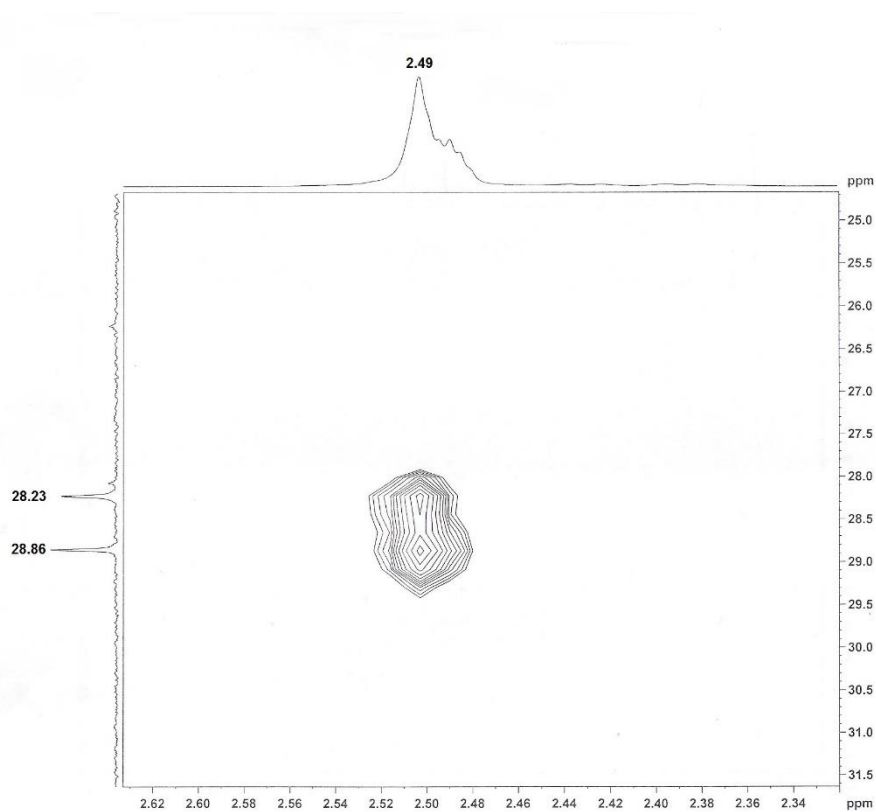


Figura 14 - Expansão do espectro de HSQC do composto **12a** obtido a 100MHz em DMSO- d_6

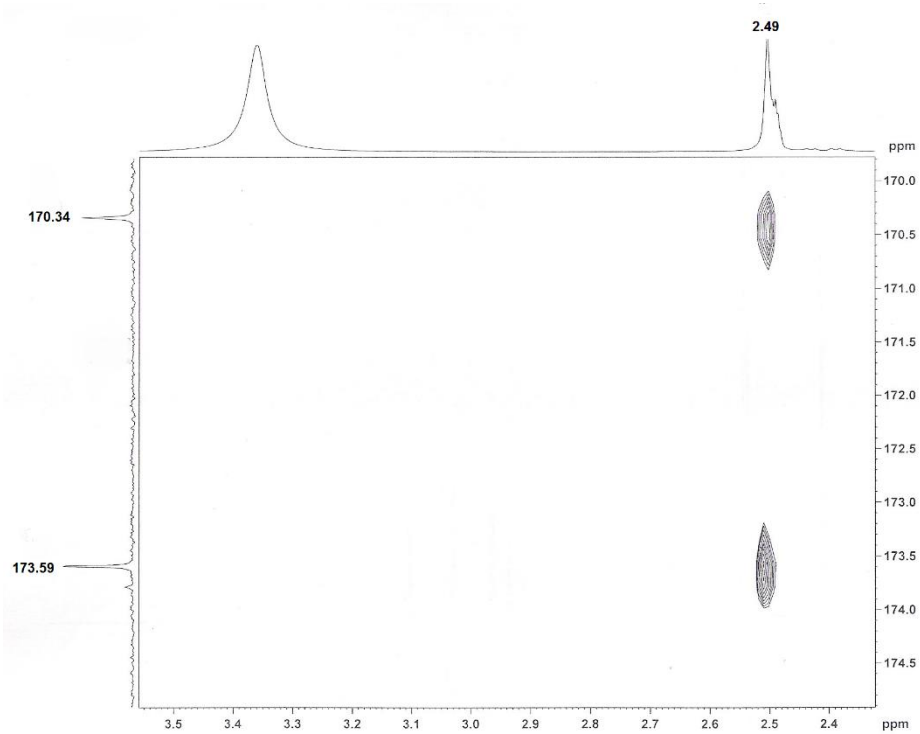


Figura 15 - Expansão do espectro de HMBC do composto **12a** obtido a 100MHz em DMSO- d_6

A abordagem utilizada para a síntese de **12a** e **12b** foi repetida para a síntese do composto **12c**. O composto **12c** foi obtido através da reação de **8c** com anidrido ftálico, em DMSO à temperatura ambiente. Após 1 hora de reação, por TLC, verificou-se que a reação estava concluída. O sólido foi isolado e analisado por espectroscopia de ^1H RMN, tendo-se identificado a presença de **8c**, do anidrido ftálico e do produto **12c**.

Com base no que se observou na reação anterior, repetiu-se a reação, utilizando 3 equivalentes de anidrido. Ao fim de 1 hora, o TLC mostrava o desaparecimento do reagente limitante. O sólido foi isolado e analisado por ^1H RMN, onde foi caracterizado como sendo o produto **12c**.

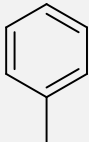
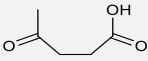

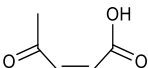
Caracterização analítica e espectroscópica dos compostos **12**

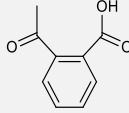
2.5.1. Dados físicos e analíticos

Na tabela (Tabela 9) encontram-se representados os pontos de fusão dos derivados **12a-12c** e os resultados obtidos nas respectivas análises elementares.

Os dados analíticos das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **12**, mostram que o composto **12a** apresenta água e os compostos **12b-c** encontram-se contaminados com DMSO.

Tabela 9 - Dados analíticos das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **12**

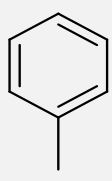
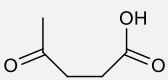
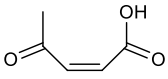
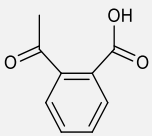
Prod.	R	R ¹	Ponto de fusão (°C)	C, H, N, S, Valores obtidos (calculados)	Formula Molecular
12a			190-196	50,18; 4,65; 26,33 (50,17; 4,82; 25,60)	C ₁₆ H ₁₅ N ₇ O ₃ . 1,65H ₂ O
12b			197-201	53,29; 3,94; 27,24; 0,49 (52,46; 4,04; 26,57; 0,50)	C ₁₆ H ₁₃ N ₇ O ₃ . 0,73H ₂ O.0,06 DMSO

12c		>303,4	56,43; 4,13; 22,86; 0,19 (56,50; 4,18; 22,99; 0,23)	C ₂₀ H ₁₅ N ₇ O ₃ . 1,26H ₂ O.0,03 DMSO
------------	---	--------	---	--

2.5.2. Dados espectroscópicos de IV

No espectro de IV das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **12** surgem bandas de intensidade média ou intensa na zona 3500-3000 cm⁻¹, atribuídas às vibrações de estiramento da ligação O-H e N-H. A banda correspondente à vibração de estiramento C-H em anéis aromáticos é visível próximo dos 3040 cm⁻¹. Na região situada entre 1700-1500 cm⁻¹, surgem bandas características das vibrações de estiramento das ligações C=N e C=C em anéis aromáticos. Os valores das bandas observadas encontram-se na tabela (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados espectroscópicos de IV dos compostos **12**

Prod.	R	R ¹	3500-3000	1700-1500
12a			3366i; 3239i; 3038m	1680i; 1600i; 1575i; 1525i
12b			3338m; 3284m; 3046f	1673i; 1607i; 1572i; 1545i;
12c			3444f; 3258m; 3040m	1731f, 1667i; 1603i; 1572i; 1557i; 1522i

2.5.3. Dados espectroscópicos de ¹H RMN (DMSO, 400MHz) para os compostos **12**

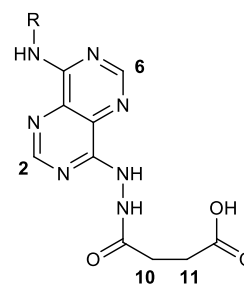
Os espectros de ¹H RMN das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **12a** e **12b**, apresentam dois singletos bem definidos no intervalo δ 8,65-8,59ppm correspondente aos

protões H₂ e H₆. O protão H₆ foi identificado através do espectro de HMBC, através do acoplamento a 2 ligações do NH₈ com o C₈. Como o H₆ acopla com C₈ a 3 ligações, foi possível a sua identificação. O H₂ foi identificado por exclusão de partes. No caso da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **12c**, verifica-se apenas um singlete a δ 8,67ppm, atribuído as protões H₂ e H₆ (Tabela 11).

Na zona aromática é possível observar-se um duplete no intervalo δ 8,02-7,99ppm que integra para dois protões, referente aos protões *orto*, um triplete a δ 7,39-7,37ppm a integrar para dois protões e um triplete a δ 7,13ppm a integrar para um protão, referentes aos protões *meta* e *para* do anel aromático da posição 8, respetivamente.

Os protões das posições H₁₀ e H₁₁ surgem a δ 2,49ppm no composto **12a** e 6,47-6,36ppm para o composto **12b**. No composto **12c** os sinais dos protões H_{o'}, H_{m'} e H_{m''} surgem como um triplete aparente e dois tripletos, com desvios químicos entre δ 7,80-7,60ppm, respetivamente.

Tabela 11 - Dados de ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆) dos compostos **12**



Comp.	R	R ¹	H ₂ /H ₆	R	R ¹
12a			8,59 (s, 1H) 8,63 (s, 1H)	8,0 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,37 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,12 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	2,49 (s, 4H, CH ₁₀ + CH ₁₁)
12b			8,65 (s, 1H) 8,63 (s, 1H)	7,99 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,38 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	6,47 (d, 1H, 12,4Hz, H ₁₀) 6,36 (d, 1H, 12,4Hz, H ₁₁)
12c			8,67 (s, 2H)	8,02 (d, 2H, 7,6Hz, H _o) 7,39 (t, 2H, 7,6Hz, H _m) 7,13 (t, 1H, 7,6Hz, H _p)	7,80 (ta, 2H, 7,6Hz, H _{o'}) 7,67 (t, 1H, 7,6Hz, H _{m'}) 7,60 (t, 1H, 7,6Hz, H _{m''})

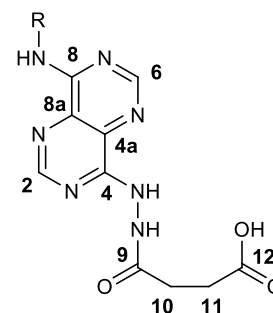
2.5.4. Dados espectroscópicos de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) para os compostos **12**

No espectro é possível observar sinais característicos, largos para C_2 , C_4 , C_{4a} e C_{8a} e os restantes sinais estreitos. Por HMBC é possível identificar-se os sinais de C_6 a δ 154,24-154,10ppm, através do acoplamento a 2 ligações de NH_8 com o C_8 a δ 156,46ppm. Como o H_6 acopla a 3 ligações com C_8 é possível a sua identificação. Através do acoplamento a 3 ligações do H_6 foi possível identificar o C_{4a} a δ 130,99ppm. O C_2 a δ 154,6-154,36ppm é atribuído por exclusão de partes, após a atribuição de C_6 e pelo sinal característico apresentado por C_2 , um sinal largo de baixa intensidade. Os sinais do anel da pirimido[5,4- d]pirimidinas, C_4 e C_{8a} , são atribuídos através do acoplamento a 3 ligações do H_2 com o C_4 a δ 158,73-158,07ppm e com C_{8a} a δ 132,09-132,01ppm. (Tabela 12).

Os carbonos do grupo fenilo da posição 8 foram também identificados através do espectro de HMBC. Nestes espectros, é possível observar-se o acoplamento a 3 ligações do NH_8 com o carbono *orto* a δ 121,6ppm. Os carbonos *ipso* e *para* do grupo fenilo apresentam interação com os H_o o que permite as suas atribuições.

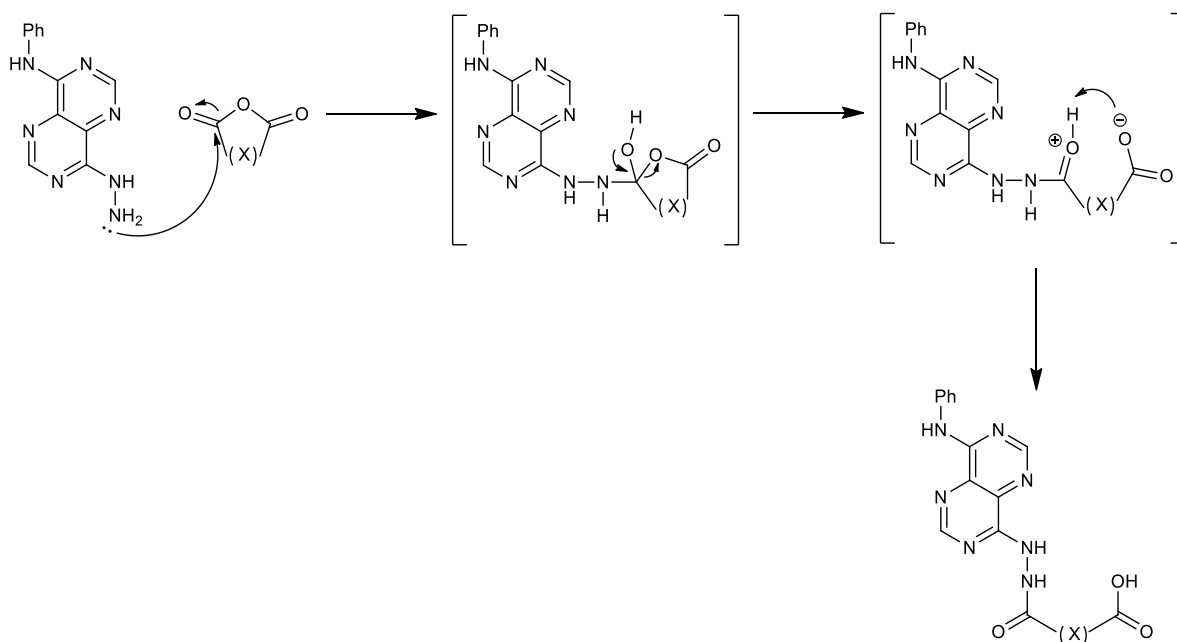
Os sinais dos C_{10} e C_{11} foram atribuídos através dos desvios químicos e acoplamentos a 2 ligações com os carbonos C_9 e C_{12} .

Tabela 12 - Dados espectroscópicos de ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) dos compostos 12



Prod.	R	R ¹	C ₂ /C ₆	C ₄ , C _{4a} , C ₈ , C _{8a}	R	R ¹
12a			154,57 154,10	158,58 (C ₄) 130,99 (C _{4a}) 156,45 (C ₈) 132,01 (C _{8a})	138,43 (C _i) 121,62 (C _o) 128,53 (C _m) 123,9 (C _p)	173,59 (C ₁₂) 170,34 (C ₉) 28,86; 28,23 (C ₁₀ , C ₁₁)
12b			154,36 154,24	158,07 (C ₄) 130,99 (C _{4a}) 156,46 (C ₈) 132,09 (C _{8a})	138,38 (C _i) 121,67 (C _o) 128,5 (C _m) 123,92 (C _p)	163,01 (C ₉) 133,79-126,04 (C ₁₀ , C ₁₁) 167,08 (C ₁₂)
12c			154,6 154,16	158,73 (C ₄) 130,98 (C _{4a}) 156,46 (C ₈) 132,07 (C _{8a})	138,43 (C _i) 121,6 (C _o) 128,51 (C _m) 123,87 (C _p)	167,97 (C ₉) 131,84 (C ₁₀) 128,47 (C _o) 130,13 (C _m) 130,98 (C _{m''}) 135,55 (C ₁₁) 167,09 (C ₁₂)

2.5.5. Mecanismo geral de reação com anidridos



Esquema 27 - Mecanismo de reação da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c** com anidridos

No mecanismo reacional entre a pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c** com anidridos, o passo inicial acontece através do ataque nucleófilo do grupo amina ao carbono eletropositivo, do anidrido.

Após o ataque, o oxigênio que captou um próton do grupo amina, regenera a ligação carbonílica, ocorrendo a abertura do anel.

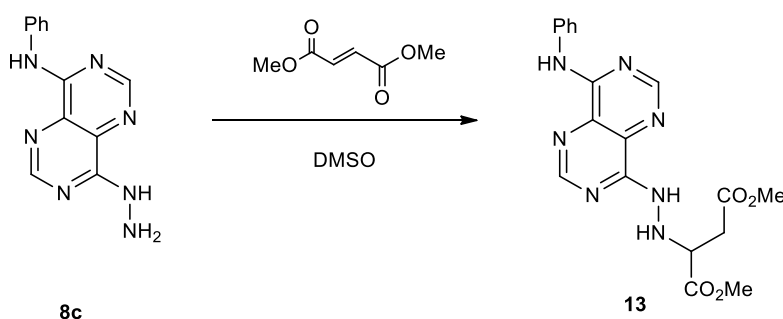
O oxigênio negativo, ataca o próton do grupo oxigênio eletropositivo, formando o grupo hidroxilo, originando assim os derivados pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **12a-c**.

2.6. Ésteres

2.6.1. Tentativa de reação com dimetil fumarato

Na tentativa de sintetizar o composto **13** a partir da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c**, fez-se reagir **8c** com o dimetil fumarato.

A reação foi efetuada em DMSO e mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética (**Esquema 28**).



Esquema 28 – Tentativa de síntese para a obtenção das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **13**

Após 24 horas de reação, controlada por TLC, não se verificou a formação de novos produtos, a reação foi colocada num banho a 80°C. Após 24 horas, a 80°C, o TLC ainda apresentava reagentes de partida. Em seguida, foi adicionado, à mistura reacional, uma quantidade catalítica de H₂SO₄. Após mais 24 horas de reação, não se observando a formação de novos produtos, por TLC, isolou-se o sólido em suspensão que se identificou como **8c**.

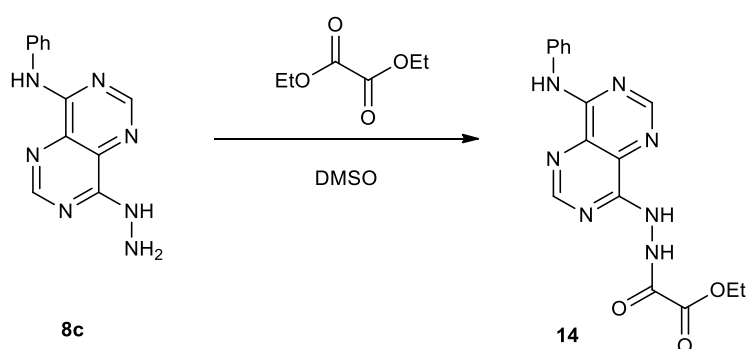
Em seguida, foram testadas novas condições reacionais. Selecionou-se acetonitrilo como solvente e catálise ácida de TFA, colocando-se a reação à temperatura ambiente sob agitação magnética. Após 24 horas, por TLC, como não se observou a formação de novos produtos, a reação foi colocada em refluxo, durante 3 horas. Após as 3 horas, o sólido foi isolado e analisado por ¹H RMN. Novamente verificou-se apenas a presença dos sinais correspondentes a **8c**. Verificando-se que a reação não era influenciada pelo solvente, utilizou-se

novamente DMSO, visto ser o solvente em que **8c** é mais solúvel, e as reações foram realizadas com catálise ácida, testando-se a influência de vários ácidos. Para a catálise foi utilizado ácido acético, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido nítrico. As reações foram colocadas num banho a 40°C e foram controladas durante 50 horas por TLC, não se observando a formação de novos produtos. Os sólidos foram isolados e identificados como **8c**.

Após se verificar que com as condições utilizadas anteriormente não se observava formação de novos produtos, foram testadas condições básicas. No novo estudo foi utilizado carbonato de cézio e trietilamina, como bases. A reação onde foi utilizado carbonato de cézio, utilizou-se DMSO como solvente, e a reação foi colocada a 40°C. Após a reação ser controlada durante 24 horas e não se observando a formação de novos produtos, isolou-se o sólido da reação e confirmou-se que se tratava do reagente de partida **8c**.

Quando se testou o uso de trietilamina, em DMSO, a reação foi mantida a 40°C durante 26 horas. Não se verificando a formação de novos produtos, por TLC, o sólido foi isolado e analisado por ¹H RMN, verificando-se, mais uma vez, apenas a presença de reagente de partida.

2.6.2. Tentativa de reação com dietil oxalato



Esquema 29 – Tentativa de reação com dietil oxalato

Na tentativa de sintetizar o composto **14** a partir da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c**, fez-se reagir **8c** com dietil oxalato.

Inicialmente, fez-se reagir **8c** com dietilo oxalato, utilizando-se DMSO como solvente e a reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética (**Esquema 29**).

Após 7 dias, por TLC, era possível a observação apenas das manchas dos reagentes utilizados. A reação foi posteriormente colocada sob refluxo, durante 4 dias. Passados 4 dias, o sólido foi isolado e analisado por ¹H RMN, onde se verificou que apenas existia o composto **8c**.

Na literatura⁴⁴, há reações reportadas entre aminas primárias e dietil oxalato, em que se utiliza etanol como solvente. A reação com o dietil oxalato foi repetida em EtOH. A reação foi mantida sob refluxo, durante 4 dias. Após 4 dias de reação, o sólido foi isolado e analisado por ¹H RMN. Mais uma vez o sólido recolhido era apenas o composto **8c**.

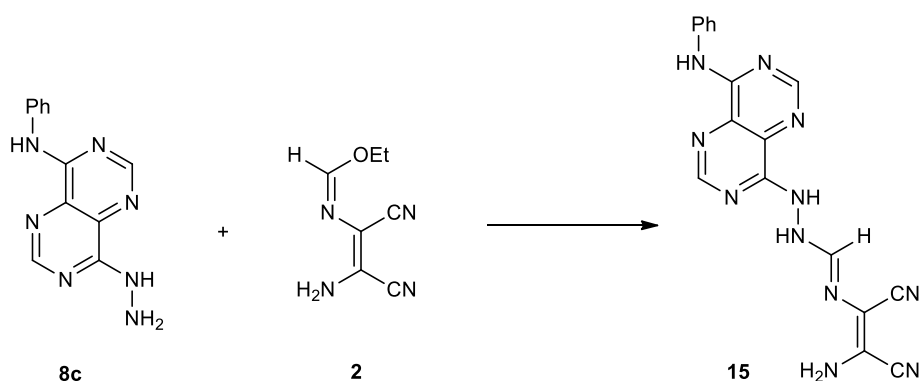
A reação foi realizada novamente, utilizando-se catálise básica, com carbonato de potássio, em DMSO e etanol. As duas reações foram mantidas sob refluxo durante 48 horas. Os sólidos isolados em ambas as reações eram mais uma vez reagente de partida, **8c**.

Posteriormente, foram utilizadas condições ácidas, com ácido sulfúrico e ácido acético. As reações foram efetuadas, em DMSO à temperatura ambiente, sendo seguidas por TLC. A reação onde foi utilizado ácido sulfúrico foi mantida sob agitação durante 7 dias. Não se verificando a formação de novos produtos, por TLC, colocou-se a reação num banho a 80°C, durante 3 dias. Após 3 dias a 80°C, por TLC, não se observou a formação de novos produtos. Por fim o sólido foi isolado e analisado por ¹H RMN, onde se verificou a presença de apenas **8c**. A reação, onde foi utilizada catálise com ácido acético, foi mantida à temperatura ambiente durante 48 horas. Após as 48 horas, como não se verificou a formação de novos produtos, colocou-se a reação num banho a 80°C. Após 3 dias a 80°C, por TLC, não se observou a formação de novos produtos. Por fim o sólido foi isolado e analisado por ¹H RMN, onde se verificou a presença de **8c**.

Os resultados obtidos nos vários ensaios efetuados permitiram concluir que as condições testadas, não eram adequadas para a síntese de novos compostos, neste caso os compostos **13** e **14**.

2.6.3. Tentativa de reação com imidato

Na tentativa de sintetizar o composto **15**, testou-se a sua síntese, utilizando **8c** e o imidato **2**, como se encontra representado no esquema (**Esquema 30**).



Esquema 30 – Tentativa de síntese para a obtenção da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **15**

Para solvente de reação foi selecionado o DMSO. A reação foi colocada sob agitação magnética à temperatura ambiente, sendo controlada por TLC. Após 24 horas, no TLC, ainda era possível observar-se as manchas correspondentes aos reagentes de partida. A reação foi colocada num banho a 40°C. Após 6 horas num banho a 40°C, por TLC não se verificou a formação de novos produtos, observando-se as manchas dos reagentes de partida. Foi então utilizado cloreto de anilíneo, de forma a promover a reação. Após a adição do catalisador, a reação foi analisada por TLC, onde se observou o desaparecimento das manchas dos reagentes de partida e o aparecimento de uma nova mancha, com um R_f diferente dos reagentes de partida. O sólido em suspensão foi isolado e analisado por ¹H RMN. A análise do sólido isolado mostrou maioritariamente o reagente de partida **8c** e outros componentes que não se conseguiram identificar. Posteriormente, tentou-se a reação com catálise ácida de ácido

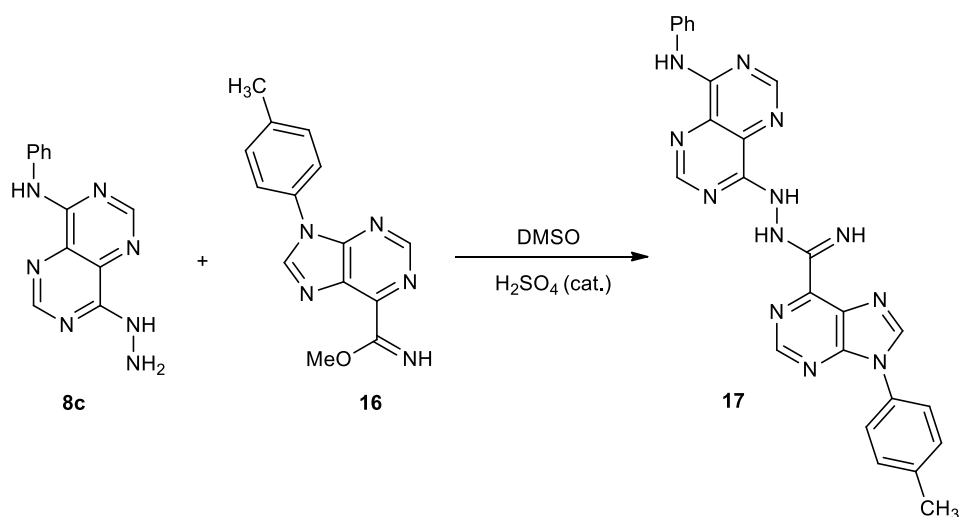
sulfúrico. Após 45 minutos, no TLC observou-se o aparecimento de uma mancha com R_f diferente dos reagentes de partida. O sólido foi isolado e analisado por ¹H RMN, verificando-se que não tinha ocorrido a formação de novos produtos e que o sólido era ainda **8c**.

A reação foi testada, tanto em etanol como em DMSO, com catálise de cloreto de anilíneo. Após 1 hora, da reação efetuada em etanol, no TLC observou-se o aparecimento de uma nova mancha, diferente da dos reagentes de partida e as manchas dos reagentes de partida. A reação foi controlada de 12 em 12 horas, verificando-se sempre o mesmo padrão de manchas no TLC. Após 48 horas, no TLC, era possível a observação de três manchas com R_fs diferentes dos observados inicialmente. O sólido foi isolado e analisado por ¹H RMN, onde se verificou que o sólido isolado continha o reagente **8c** e o imidato degradado. Na reação efetuada em DMSO, após 1 hora de reação no TLC observou-se a formação de uma nova mancha. Após 24 horas, verificou-se que as manchas correspondentes aos reagentes de partida tinham desaparecido, sendo possível apenas a observação de uma mancha. O sólido foi isolado e analisado, onde se verificou que o sólido isolado era composto pelo reagente **8c** e os produtos da degradação do imidato.

Após várias tentativas de reação, verificou-se que nas condições utilizadas, não era possível a síntese do composto pretendido **15**.

2.6.4. Tentativa de reação com imidatopurina

Numa tentativa de sintetizar o composto **17**, utilizaram-se as condições experimentais utilizadas quando se fez reagir **8c** com aldeídos. A imidatopurina **16** utilizada foi sintetizada anteriormente pelo nosso grupo de trabalho³⁵.



Esquema 31 - Tentativa de síntese para a obtenção da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **17**

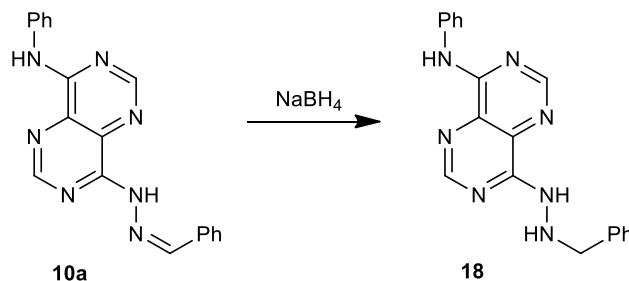
A pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c** foi combinada com a imidatopurina **16**, utilizando-se DMSO como solvente e catálise ácida de H₂SO₄. A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente, sendo controlada por TLC. Quando, por TLC se verificou que a reação estava terminada, o produto foi precipitado por adição de água destilada. O sólido foi isolado após ser filtrado e lavado com água destilada e éter etílico frio. O sólido isolado foi analisado por ¹H RMN. A análise do espectro de ¹H RMN do sólido isolado permitiu identificar a presença do composto **17**, como o componente maioritário numa mistura complexa. A reação foi repetida mais duas vezes mas os sólidos isolados continuavam a ser misturas.

Na tentativa de purificar os produtos obtidos, tentou-se a recristalização. Contudo não foi possível purificar os sólidos.

2.7. Tentativas de redução da imina da cadeia lateral

Na literatura, a redução de iminas pode ser conseguida através da utilização de agentes redutores^{45,46}, tais como boro hidreto de sódio⁴⁵, tri-acetoxi boro hidreto de sódio⁴⁵ ou complexos de amino-boratos⁴⁷. No nosso trabalho selecionamos o boro hidreto de sódio (NaBH₄) para tentar a redução.

O procedimento descrito por Seyden *et al.*^{45,46} foi utilizado para tentar a conversão de **10a** em **19** (Esquema 32).



Esquema 32 - Tentativa de redução para a obtenção da pirimido[5,4-*d*]pirimidina **19**

A reação foi realizada, utilizando-se água como solvente, e um equivalente de NaBH₄. A reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética. Após 48 horas, por TLC, não se verificava a formação de novos produtos. Após a análise por TLC, a reação foi colocada num banho a 40°C. Após 6 dias, a 40°C, continuou a não se verificar a formação de novos produtos, por TLC. Após a análise por TLC, aumentou-se novamente a temperatura, desta vez para 80°C. Após 8 dias, a 80°C, não se verificando a formação de novos produtos, o sólido foi isolado, tendo-se verificado que era apenas reagente de partida, **10a**.

De forma a contornar o problema da solubilidade, observada quando se utilizou água como solvente, testaram-se outros solventes como EtOH, DMSO, mistura entre DMSO/H₂O e CH₃CO₂H. Quando se utilizou EtOH e uma mistura de DMSO/H₂O, as reações foram mantidas à temperatura ambiente e após 24 e 18 horas de reação, respetivamente, por TLC, não se verificou a formação de novos produtos.

Após se verificar que as condições utilizadas não eram adequadas para a redução da imina, foi utilizado DMSO como solvente e um equivalente de NaBH₄ durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após 1 hora de reação foi adicionado mais um equivalente de NaBH₄. Passada mais 1 hora, foi adicionado outro equivalente de NaBH₄. Após 72 horas, por TLC, não se verificando formação de

novos produtos, a reação deu-se como terminada e o sólido foi isolado foi identificado como **10a**.

A reação foi mais uma vez repetida em DMSO, a 80°C e foi adicionado 0,5 equivalentes de NaBH₄ de hora a hora. Após 7 horas de reação, isolou-se o sólido em suspensão, que mais uma vez era **10a** de acordo como o espectro de ¹H RMN.

Após nova revisão bibliográfica sobre redução de hidrazonas⁴⁸, utilizou-se EtOH como solvente, catálise ácida de ácido acético, um equivalente de NaBH₄, em refluxo. Após 24 horas de reação, não se verificando a formação de novos produtos, à mistura reacional foi adicionado mais um equivalente de NaBH₄. Após 4 dias, sob refluxo, à mistura reacional foram adicionados mais dois equivalentes de NaBH₄. Não se verificando a formação de novos produtos, por TLC, após 24 horas, deu-se a reação como terminada. Mais uma vez a amostra só continha o composto **10a**. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que as condições utilizadas para a redução da imina não são as adequadas.

2.8. Atividade biológica das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas

Após serem sintetizados os novos derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas, **8b**, **10**, **11a-11ac** e **12a-c**, avaliou-se a sua capacidade destes para atuarem como potenciais agentes anticancerígenos. Inicialmente, foi avaliada a viabilidade celular de cada composto, por um *screening* a 10μM. O objetivo principal destes ensaios centra-se na avaliação dos perfis anticancerígenos de cada composto, podendo desta forma, estabelecer uma relação estrutura-atividade (SAR) por determinação do valor de IC₅₀. Todos os compostos testados apresentam a mesma estrutura central, o núcleo heterocíclico (**Figura 16**). Diferentes substituintes R e R¹ foram incorporados, de forma a determinar a importância de cada grupo na atividade.

Em trabalho realizado anteriormente, no nosso grupo de investigação⁴⁹, foram sintetizados e testados derivados do composto representado na **Figura 16**, tendo-se verificado que a atividade dependia quer do substituinte R quer de R¹.

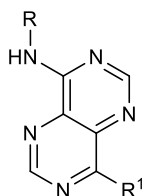
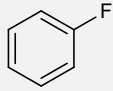
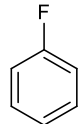
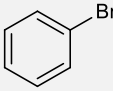
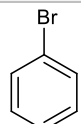


Figura 16

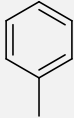
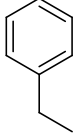
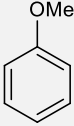
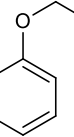
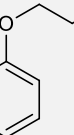
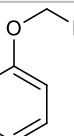
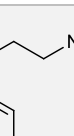
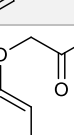
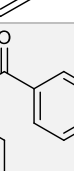
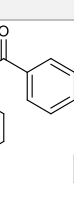
Neste trabalho, de modo a estudar a importância de R e de R¹, testaram-se uma série de novos derivados em que se fixou o substituinte R¹ e se variou apenas o substituinte R. Os compostos que apresentam este padrão de substituição foram sintetizados por um elemento do nosso grupo de trabalho (**Tabela 13**).

Numa diferente abordagem, novos derivados do composto da figura 1 foram testados, onde se manteve o grupo R fixo, em que R = Ph.

Tabela 13 – Viabilidade celular das células HCT116 (*p53-wt*) na presença dos compostos testados a 10 μ M e o valor de IC₅₀. Valores resultantes da média \pm desvio padrão obtidos de três experiências independentes

Entrada	Ref.	R	Viab. Cel. (% a 10 μ M)	% Inibição	IC ₅₀
1	19		16 \pm 5	84 \pm 5	1,1
2	20		9 \pm 4	91 \pm 4	0,84
3	21		24 \pm 14	76 \pm 14	0,75
4	22		12 \pm 4	88 \pm 4	0,73

Capítulo 2. Discussão de resultados

Entrada	Ref.	R	Viab. Cel. (% a 10 μ M)	% Inibição	IC ₅₀
5	23		-	-	1*
6	24		9 \pm 2	98 \pm 2	1,05
7	25		29 \pm 8	71 \pm 8	0,61**
8	26		11 \pm 5	89 \pm 5	0,93
9	27		14 \pm 4	76 \pm 4	1,4
10	28		11 \pm 4	88 \pm 4	0,44
11	29		70 \pm 14	30 \pm 14	-
12	30		38 \pm 7	62 \pm 7	***
13	31		37 \pm 0,1	63 \pm 0,1	***
14	32		72 \pm 12	28 \pm 12	-

(*) Resultado anterior

(**) Resultado anterior

(***) Não foi determinado o IC₅₀

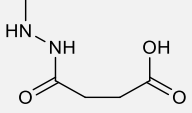
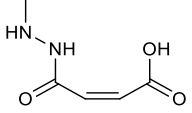
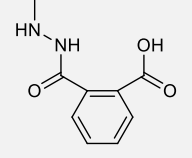
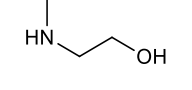
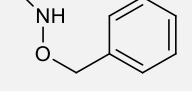
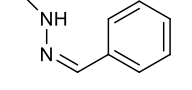
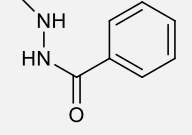
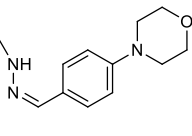
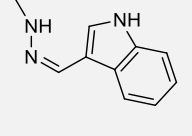
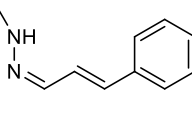
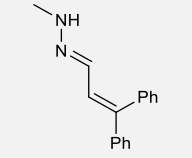
Por análise dos resultados obtidos com os derivados das entradas 1-4, é possível verificar-se que a introdução de um halogéneo no grupo R e a sua posição em torno do anel aromático influenciam a atividade. Quando se observa os resultados, verifica-se que é preferível a presença de um bromo à de um flúor, em ambas as posições.

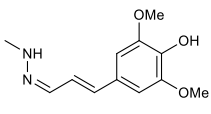
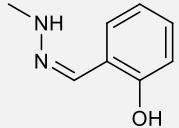
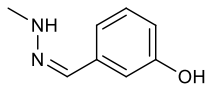
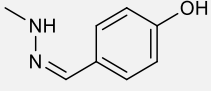
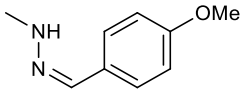
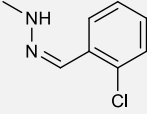
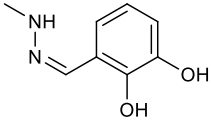
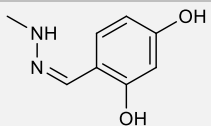
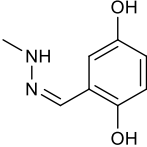
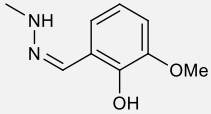
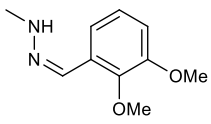
De modo a avaliar a influência da distância do sistema aromático R ao anel de pirimidina foi sintetizado o composto **24** (entrada 6). Anteriormente, tinha sido encontrado um valor de $IC_{50}=1\mu M$ para o composto **23** em que o $R=Ph$. O valor de $IC_{50}=1,05\mu M$ obtido para o composto em que o $R=CH_2Ph$ mostra que, o afastamento do sistema aromático, relativamente ao anel de pirimidina faz baixar a atividade.

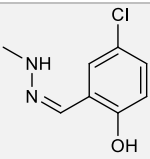
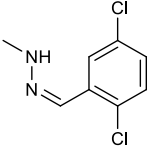
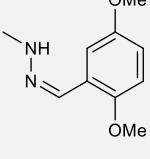
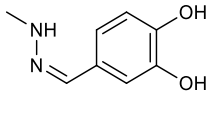
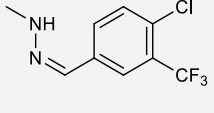
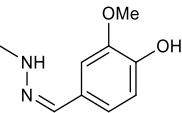
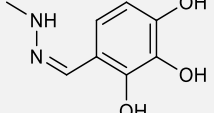
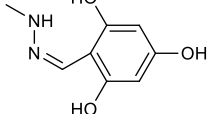
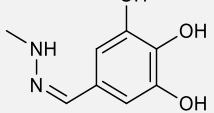
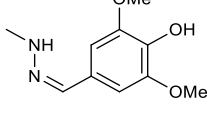
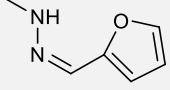
Para avaliar o espaço disponível para acomodar o grupo R no alvo, foram sintetizados os derivados das entradas 7-14. Os resultados obtidos permitem verificar que o grupo da posição *para* de R afeta drasticamente a atividade, uma vez que o IC_{50} varia entre 0,6 e $1,4\mu M$, e ainda os compostos mais volumosos apresentam uma viabilidade celular acima de 80% a $10\mu M$. Se compararmos as entradas 7-9, em que há um aumento gradual do volume do grupo R, verifica-se um aumento também gradual do IC_{50} , de 0,6 a $1,4\mu M$. Isto significa que grupos volumosos na posição *para* de R fazem baixar a atividade. Este resultado é confirmado quando se analisam os resultados obtidos com os compostos nas entradas 12-14, em que a viabilidade celular varia entre 72 e 38%, a $10\mu M$. A análise dos resultados das entradas 13 e 14, em comparação com a entrada 12, mostra que a existência de um oxigênio ou nitrogênio na posição *para* do grupo R gera compostos com atividade equivalente. O resultado da entrada 10 permite verificar que, a introdução do grupo *O*-benzil aumentou a atividade. Este resultado mostra que, grupos pouco volumosos mas planares são permitidos nesta posição.

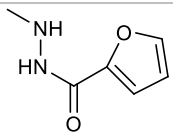
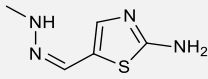
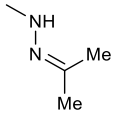
Na **Tabela 14**, encontram-se os resultados de atividade biológica de uma série de novos compostos em que se manteve o substituinte $R = Ph$ e o grupo R^1 vai sendo alterado.

Tabela 14 – Viabilidade celular das células HCT116 (*p53-wt*) na presença dos compostos testados a 10 μ M e o valor de IC₅₀. Valores resultantes da média \pm desvio padrão obtidos de três experiências independentes

Entrada	Ref.	R ¹	Viab. Cel. (% a 10 μ M)	% Inibição	IC ₅₀
1	12a		75 \pm 3	25 \pm 3	-
2	12b		84 \pm 10	16 \pm 10	-
3	12c		45 \pm 10	55 \pm 10	9,68
4	8b		83 \pm 10	17 \pm 10	-
5	8a		25 \pm 8	75 \pm 8	3,21
6	11a		25 \pm 14	75 \pm 14	0,45
7	33		23 \pm 3,9	77 \pm 3,9	0,65
8	11b		31 \pm 16	69 \pm 16	2,36
9	11d		73 \pm 9	27 \pm 9	-
10	11c		6 \pm 4	94 \pm 4	1,24
11	11j		9 \pm 2	91 \pm 2	0,61

Entrada	Ref.	R ¹	Viab. Cel. (% a 10µM)	% Inibição	IC ₅₀
12	11y		88±6	12±6	-
13	11v		6±2	94±2	0,82
14	11x		84±14	16±14	-
15	11p		74±19	26±19	-
16	11aa		48±5	52±5	-
17	11t		33±9	67±9	6,1
18	11f		15±4	85±4	1,39
19	11z		22±11	78±11	0,58
20	11o		42±8	42±8	-
21	11r		6±2	98±2	<0,5
22	11ab		86±7	14±7	-

Entrada	Ref.	R ¹	Viab. Cel. (% a 10µM)	% Inibição	IC ₅₀
23	11n		27±14	73±14	1,12
24	11u		70±7	30±7	-
25	11ac		71±11	19±11	-
26	11g		55±11	45±11	-
27	11w		47±3	53±3	-
28	11h		25±13	75±13	5,45
29	11m		9±2	91±2	0,88
30	11q		10±2	90±2	3,18
31	11s		72±7	28±7	-
32	11e		73±9	27±9	-
33	11i		21±13	79±13	2,72

Entrada	Ref.	R ¹	Viab. Cel. (% a 10µM)	% Inibição	IC ₅₀
34	33		23±1,6	77±1,6	0,99
35	11k		49±5	51±5	-
36	10		55±7	45±7	-

Por análise dos resultados dos derivados das entradas 1-3, é possível verificar-se que a diferença de volume, da cadeia de R¹ tem influência na atividade. Quando se compara os resultados das entradas 1 a 3 verifica-se que a introdução do grupo fenilo aumenta a atividade relativamente aos derivados das entradas 1 e 2, o que poderá significar que é possível a introdução de substituintes planares nesta posição.

Quando se compara os resultados das entradas 1 e 4, verifica-se que a presença de uma cadeia alquílica não é favorável para a atividade.

De modo a avaliar a influência do grupo NHCO, no grupo R¹, foram testados os compostos das entradas 5 e 6 e comparados com o resultado obtido anteriormente (entrada 7). Anteriormente, tinha sido encontrado um valor de IC₅₀ = 0,65µM para o composto 33 em que o R=Ph. O valor de IC₅₀ = 0,45µM obtido para o composto da entrada 6 parece mostrar que, o grupo NHCO não é importante para a atividade. Permite ainda confirmar que a presença de um grupo volumoso CH₂ (entrada 5), não favorece a atividade.

Para avaliar o espaço disponível para acomodar o grupo R¹ no alvo, foram sintetizados os derivados das entradas 8-12. Os resultados obtidos permitem verificar que é possível o alongamento da cadeia, dando a perceber que existe espaço disponível no alvo. Quando se compara os resultados das entradas 8 e 10, verifica-se que a presença de grupos volumosos baixa a atividade e a presença de grupos planares favorece a atividade. Se compararmos o derivado

da entrada 12 com os derivados das entradas 10 e 11, em que existe um aumento do volume, devido à introdução de grupos metoxilo, verifica-se uma perda de atividade, enquanto com a introdução de um segundo grupo fenilo verifica-se um aumento.

Após se verificar que, no alvo eram permitidos grupos não volumosos planares, foram introduzidos diferentes substituintes no anel de fenilo, de forma a determinar se eram possíveis diferentes tipos de interações. Por análise dos derivados das entradas 13-15, verifica-se que a introdução do grupo hidroxilo, na posição 2 do grupo fenilo, influencia positivamente a atividade, enquanto os grupos hidroxilos nas posições 3 e 4, influenciam negativamente.

De forma a analisar o efeito do grupo hidroxilo da posição 2, este foi substituído por um cloro, verificando-se um aumento do IC₅₀, entrada 17, ou seja o grupo hidroxilo parece estar envolvido em interação com o alvo.

Comparando os valores de inibição da viabilidade celular dos derivados das entradas 15 e 16, verifica-se que, com o aumento do volume do substituinte, o valor de viabilidade celular diminui.

Após a análise dos resultados, com os derivados com um grupo hidroxilo, foram sintetizados novos derivados di-substituídos. Quando se compara os resultados das entradas 18-20, verifica-se que a presença do segundo grupo hidroxilo é essencial para a atividade, dependendo da posição em que se encontra. A situação mais favorável é aquela em que os grupos hidroxilo ocupam as posições *orto* e *para*, simultaneamente, apresentando um IC₅₀ = 0,58µM.

Quando se compara os resultados das entradas 18 e 21, é possível verificar-se que na posição *meta*, do fenilo, é preferível um grupo volumoso a um grupo dador de hidrogênio para pontes de hidrogênio. No entanto quando se compara os valores das entradas 21 e 22, verifica-se que com a substituição do grupo hidroxilo, da posição *orto*, por um grupo metoxi a atividade diminui drasticamente, confirmando a importância do OH em *orto*.

Os resultados dos derivados das entradas 23-25 podem ser comparados com o resultado do derivado da entrada 20, visto terem o mesmo padrão de substituição. Quando se compara os resultados, observa-se que os que

apresentam melhor atividade tem o grupo hidroxilo presente na posição *orto*. Contudo a presença de um segundo hidroxilo em posição *para* relativamente ao primeiro hidroxilo baixa a atividade.

Quando se compara os resultados das entradas 26 e 27, verifica-se que grupos halogenados ou grupos hidroxilo tem uma influência semelhante na atividade.

O resultado do derivado da entrada 28 pode ser comparado com o resultado do derivado da entrada 21. Os resultados parecem indicar que a presença do grupo OMe na posição *meta* é favorável para a atividade mas a presença do hidroxilo em posição *orto* é essencial.

Para avaliar a influência de três grupos hidroxilo na atividade, foram sintetizados os derivados das entradas 29-31. Os resultados obtidos permitem verificar que a presença de um grupo hidroxilo na posição *orto* é essencial para a atividade. A existência de um segundo grupo hidroxilo em posição *orto*, relativamente à função imina não favorece a atividade (entradas 29 e 30).

Posteriormente, foram analisados compostos que não apresentavam o grupo fenilo em R¹.

De modo a avaliar a influência de sistemas heterocíclicos planares no grupo R¹ foram sintetizados e testados os compostos das entradas 33 e 35. Anteriormente, tinha sido encontrado um valor de IC₅₀ = 0,99µM para o derivado da entrada 34. Os novos resultados (entrada 33 e 35) parecem indicar que a presença de sistemas heterocíclicos não favorece a atividade. Por outro lado, o grupo NHCO presente no composto da entrada 34 e ausente no composto da entrada 33 parece aumentar a atividade.

De modo a avaliar a importância da presença/ausência do anel aromático na atividade, testou-se o derivado da entrada 36. Os resultados mostram mais uma vez que é essencial para a atividade a presença de um sistema plano.

2.9. Morfologia Celular

A morfologia das células HCT116 (*p53-wt*) foi analisada após incubação com os compostos selecionados após 48 horas (Figura 17).

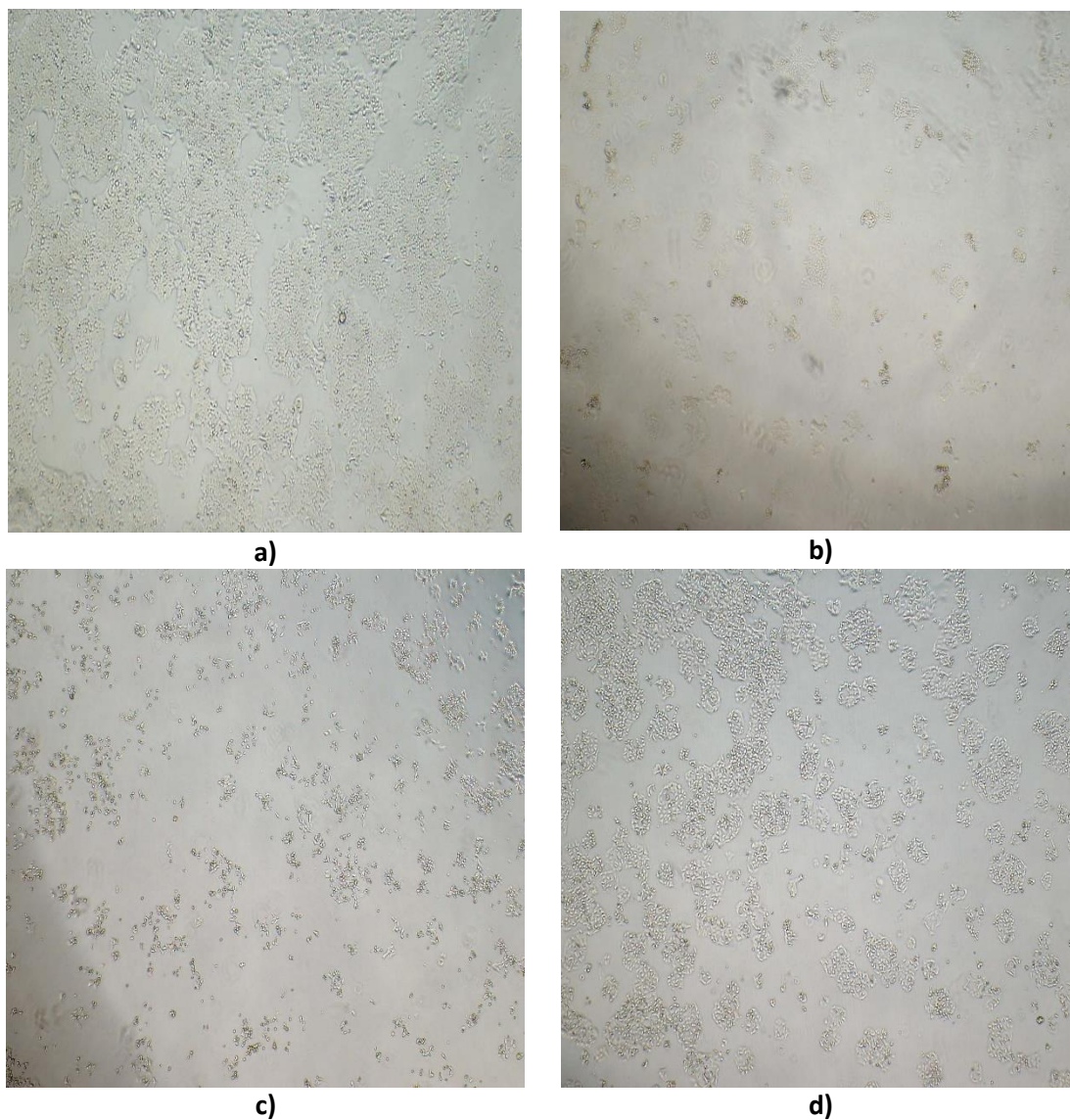


Figura 17 - Morfologia celular da linha celular HCT116 (*p53-wt*). As imagens em cima foram obtidas com um microscópio invertido Olympus IX71 com uma câmara em modo de contraste de fase após incubação do composto **11v** a 10 μ M (b), a 5 μ M (c) e 1 μ M (d). Imagem a) é referente ao controlo.

As células foram incubadas com 10 μ M do composto **11v** (**Figura 17b**), 5 μ M (**Figura 17c**) e 1 μ M (**Figura 17d**). Relativamente ao controlo (**Figura 17a**), sem a adição de composto, é visível um maior número de células vivas (aglomerado), enquanto nas diferentes concentrações é visível o aumento de células mortas (redondas e a boiar), nas concentrações mais elevadas, 10 μ M e 5 μ M.

Na análise por MTT, do mesmo composto, é visível que as células vivas apresentam uma coloração azul, devido à metabolização do MTT, enquanto as células mortas são incolores.

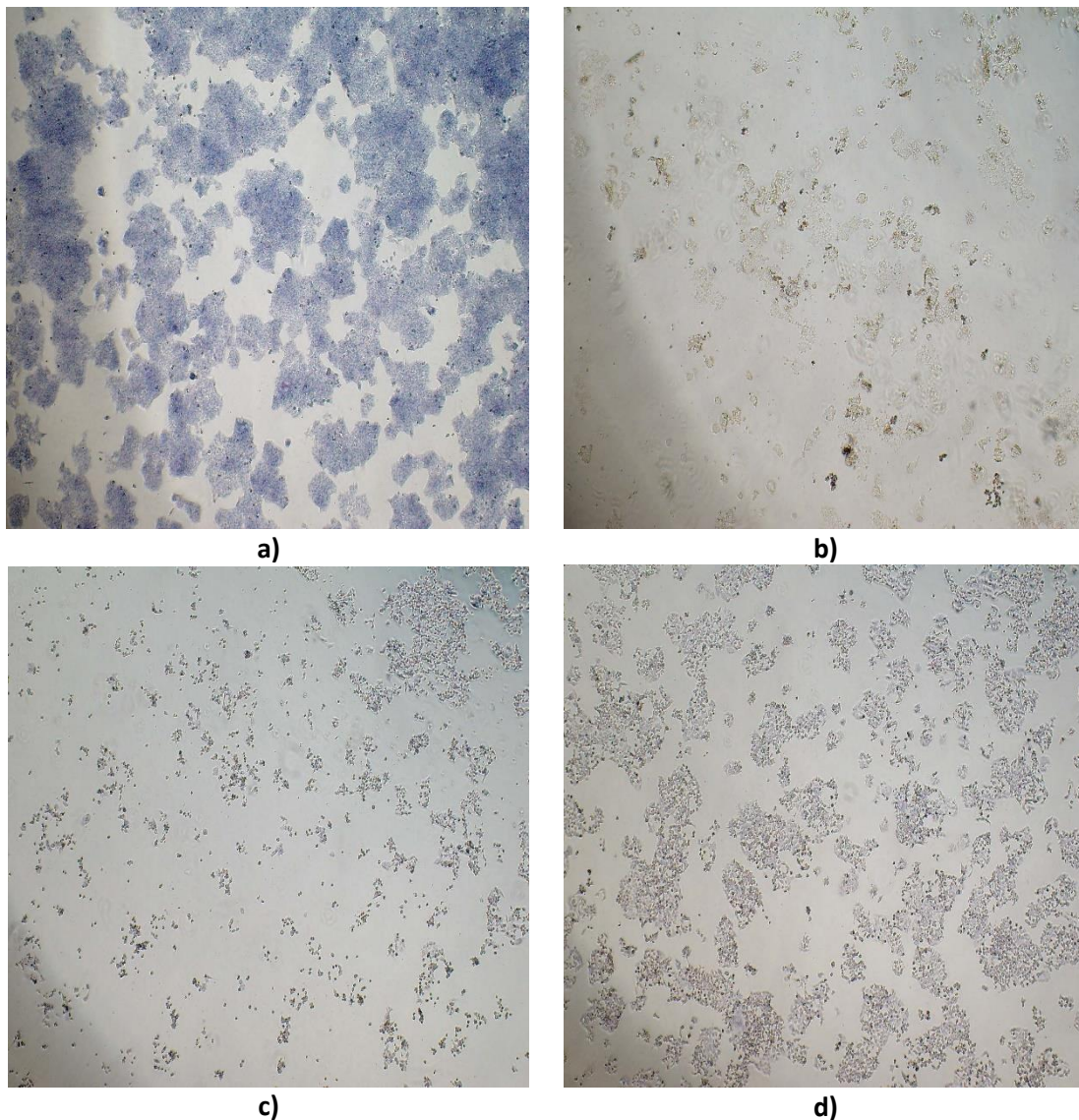


Figura 18 - Morfologia celular da linha celular HCT116 (*p53-wt*) após análise por MTT. As imagens em cima foram obtidas com um microscópio invertido Olympus IX71 com uma câmara em modo de contraste de fase após incubação do composto **11v** a 10 μ M (b), a 5 μ M (c) e 1 μ M (d). Imagem a) é referente ao controlo.

Capítulo 3. Conclusão e perspetivas futuras

3. Conclusão e perspectivas futuras

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese de mestrado permitiu a síntese de trinta e quatro novos derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas contendo uma unidade de fenilamina em C8, das quais vinte e dois contêm uma unidade hidrazonoarilo substituído em C4, três contêm uma unidade hidrazono heteroaromática e as restantes possuem diferentes unidades de hidrazida, alquilamina ou benziloxiamina. Os novos derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidina foram caracterizados estruturalmente recorrendo a técnicas analíticas e espectroscópicas.

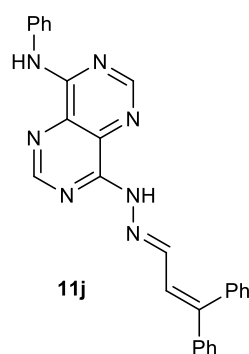
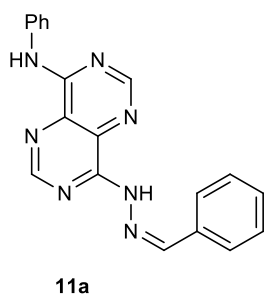
As abordagens sintéticas utilizadas para a síntese dos derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidina, permitiram o isolamento dos compostos com excelentes rendimentos.

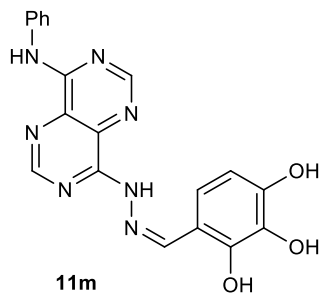
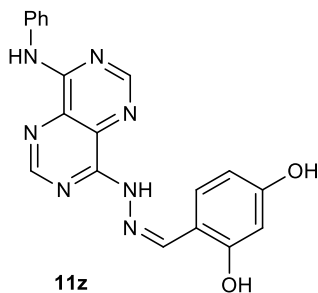
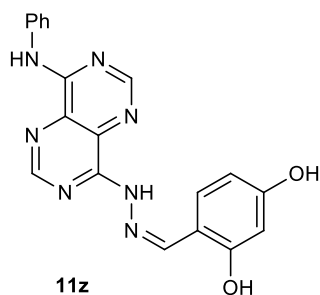
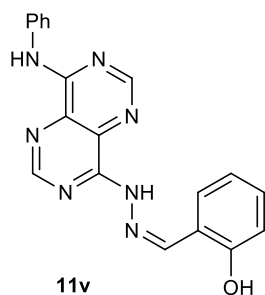
A atividade anti cancerígena dos novos compostos foi avaliada *in vitro* usando a linha celular HCT116 (*p53-wt*). De todos os compostos foi realizado um *screening* inicial, e os que apresentassem um valor de inibição superior a 50% era determinado o seu IC₅₀.

Os compostos **12c**, **11t** e **11h**, apresentaram um valor de IC₅₀ entre 5µM < IC₅₀ < 10µM.

Os compostos **8a**, **11b**, **11c**, **11f**, **11n**, **11q** e **10i** apresentaram um valor de IC₅₀ entre 1µM < IC₅₀ < 5µM.

Os compostos **11a**, **11j**, **11v**, **11z**, **11r** e **11m** apresentaram um valor de IC₅₀ entre 1µM < IC₅₀.





A relação estrutura atividade permitiu concluir que a atividade aumenta quando o substituintes em C4 apresenta uma estrutura planar.

Foram também testados 12 novos derivados de pirimido[5,4-*d*]pirimidinas com a unidade de furilcarbohidrazida em C4 e diferentes substituintes em C8 seguindo a abordagem descrita anteriormente. Dos doze compostos testados, 8 apresentaram um valor de $IC_{50} < 1,4\mu M$. Os resultados permitiram concluir que em C8 são permitidos grupos NH aril substituídos. A atividade foi melhor quando o grupo em C8 apresentou unidades do tipo $NHC_6H_4-p-OCH_2R$ em que R era um grupo planar. Quando R era volumoso a atividade diminuía.

Em trabalho futuro, para completar os estudos SAR, será necessário determinar o IC_{50} do derivado **11v**, uma vez que não foi testado a concentrações necessárias para a sua determinação.

Por outro lado, é necessário determinar os mecanismos de ação dos novos derivados.

Capítulo 4. Parte Experimental

4.1. Procedimentos Gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear ^1H foram obtidos através de Bruker Avance III (^1H : 400MHz, ^{13}C : 100MHz), à temperatura ambiente ou a 80°C , incluindo os espectros de correlação de ^1H ou ^{13}C (HMBC e HSQC), sendo utilizado DMSO deuterado como solvente.

Os espectros de IV foram obtidos com FT-IR Bomem MB 104, utilizando nujol e células de NaCl.

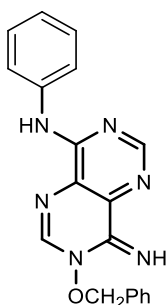
A análise elementar foi realizada numa LECO CHNS-932.

As reações foram controladas com através cromatografia de camada fina (TLC), usando placas de sílica gel 60 F_{254} (Merck).

Os pontos de fusão foram determinados com um Stuart SMP3 e não foram corrigidos.

Os reagentes de partida foram obtidos através de métodos reportados anteriormente. O imidato **2** [50USP2534331], a amidina **3**⁵⁰, o imidazole **4**³³ e a 6-cianopurina **5**³³.

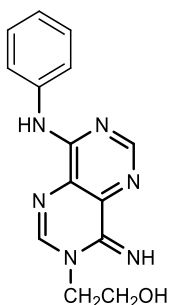
4.2. Síntese das 7,8-dihidropirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-amina **7**



O hidrocloreto de *o*-benzilhidroxilamina (1,27g; 7,93mmol) foi adicionado a uma solução aquosa de NaOH (1M) (35mL). A solução resultante foi extraída com éter etílico (4 x 35mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO_4 . O agente secante foi eliminado por filtração e a solução resultante foi concentrada sob vácuo, recolhendo-se um óleo. O óleo foi dissolvido em THF (4mL), a 6-cianopurina **5** (0,25g; 1,13mmol) foi adicionada à solução e ainda uma quantidade catalítica de DBU. A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e a reação foi controlada por TLC

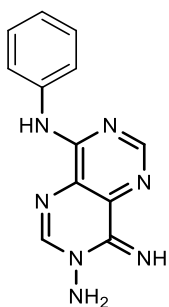
(DCM/EtOH 9:1). Após 17h de reação, por TLC, verificou-se a ausência do reagente limitante. O solvente foi evaporado, e o sólido precipitado foi filtrado sob vácuo, lavado com EtOH frio e éter etílico frio. O sólido isolado foi analisado e identificado, através de técnicas espectroscópicas (IV, ^1H RMN), como sendo a pirimido pirimidina **7a** (0,22g; 0,64mmol; 57%).

4.3. 2-(8-anilino-4-iminopirimido[5,4-d]pirimidin-3(4H)-il)etanol – **7b**



A 6-cianopurina **5** (0,50g; 2,27mmol) e a etanolamina (0,35g; 5,67mmol; 0,34mL) foram combinadas num balão de fundo redondo e dissolvidas em EtOH (10mL) com uma quantidade catalítica de DBU. A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente, sendo a reação controlada através de TLC (DCM/EtOH, 9:1). Após 2 horas de reação, por TLC, verificou-se a ausência de reagente limitante. A suspensão foi filtrada sob vácuo, o sólido lavado com EtOH e éter etílico. O sólido isolado foi analisado e identificado, através de técnicas espectroscópicas (IV, ^1H RMN), como sendo a pirimido pirimidina **7b** (0,57g; 2,0mmol; 89,1%).

4.4. 4-imino-N8-fenilpirimido[5,4-d]pirimidina-3,8(4H)-diamina – **7c**

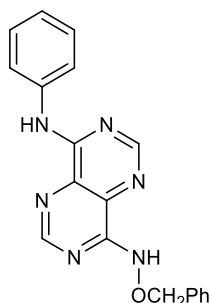


A 6-cianopurina **5** (1,0g; 4,53mmol) foi dissolvida em EtOH (10mL) num balão de fundo redondo e a hidrazina mono hidratada (0,57g; 11mmol; 0,55mL) foi adicionada à suspensão, com uma quantidade catalítica de DBU. A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e a reação foi controlada através

de TLC (DCM/EtOH, 9:1). Após 20 minutos de reação, por TLC, verificou-se a ausência de reagente limitante. A suspensão foi filtrada sob vácuo, o sólido lavado com EtOH e éter etílico. O sólido isolado foi analisado e identificado através de técnicas espectroscópicas (IV, ^1H RMN) como sendo a pirimido pirimidina **7c** (1,12g; 4,42mmol; 98%)

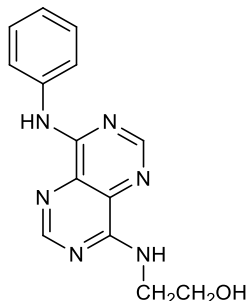
4.5. Síntese das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **8**

4.5.1. 8-Anilino[5,4-*d*]pirimidin-4-amina *O*-Benziloxima – **8a**



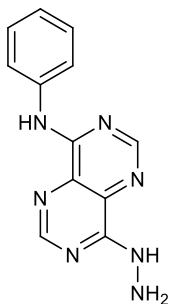
Para um balão contendo a pirimido pirimidina **7a** (0,11g; 0,31mmol), adicionou-se EtOH (3mL) e uma solução de HCl concentrado (12M) (0,18g; 4,9mmol; 0,15mL). Formou-se uma solução que foi colocada sob refluxo. Após 3 horas de reação, a solução foi colocada em banho de gelo, durante aproximadamente 30 minutos. O sólido em suspensão foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada (2mL). O sólido isolado foi transferido para um balão de fundo redondo, adicionando-se água destilada (2mL) e a suspensão foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 30 minutos. O sólido foi filtrado sob vácuo, lavado com água destilada e éter etílico. O sólido isolado foi identificado como sendo o produto **8a** (0,66g; 0,19mmol; 63%).

4.5.2. 2-[(8-anilinopirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino]etanol – 8b



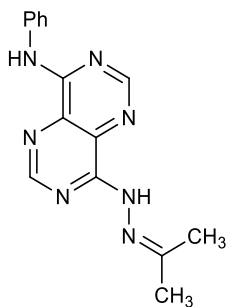
Para um frasco fechado contendo a pirimido pirimidina **7b** (0,21g; 1,0mmol), adicionou-se DMSO (3mL) como solvente, e piperidina (0,53g; 6,2mmol; 0,61mL). A reação foi mantida com agitação magnética a 80°C, durante 13 horas. A suspensão foi transferida para um balão de fundo redondo e foi concentrada. Ao sólido adicionou-se água destilada (10mL) e o balão foi colocado em banho de gelo. A suspensão foi filtrada sob vácuo, e o sólido lavado com água destilada e éter etílico frio. O sólido isolado foi identificado como sendo o produto **8b** (0,19g; 0,71mmol; 95%).

4.5.3. 8-hidrazinil-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 8c



Para um frasco fechado contendo a pirimido pirimidina **7c** (1,80g; 7,1mmol), adicionou-se DMSO (8mL) como solvente, e piperidina (3,6g; 42mmol; 4,2mL). A reação foi mantida com agitação magnética a 80°C, durante 13 horas. A suspensão foi transferida para um balão de fundo redondo e foi concentrada. Ao sólido adicionou-se água destilada (10mL) e o balão foi colocado em banho de gelo. A suspensão foi filtrada sob vácuo, e o sólido lavado com água destilada e éter etílico frio. O sólido isolado foi identificado como sendo o produto **8c** (1,73g; 6,83mmol; 96,8%).

4.5.4. *N*-fenil-8-(2-(propan-2-ilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-amina - 10



Para um frasco fechado pesou-se a pirimido pirimidina **7c** (0,15g; 0,61mmol), adicionou-se DMSO (3mL) como solvente, acetona (0,12g; 2,04mmol; 0,15mL) e piperidina (0,92g; 11mmol; 1,1mL). Para um frasco fechado pesou-se a pirimido pirimidina **7c** (0,15g; 0,61mmol), adicionou-se DMSO (3mL) como solvente, acetona (0,12g; 2,04mmol; 0,15mL) e piperidina (0,92g; 11mmol; 1,1mL). A reação foi mantida com agitação magnética a 80°C, durante 15 horas. A suspensão foi transferida para um balão de fundo redondo e foi concentrada. Ao sólido adicionou-se água destilada (10mL) e o balão foi colocado em banho de gelo. A suspensão foi filtrada sob vácuo, e o sólido lavado com água destilada e éter etílico frio. O sólido isolado foi identificado como sendo o produto **10** (0,51g; 1,73mmol; 96,5%)

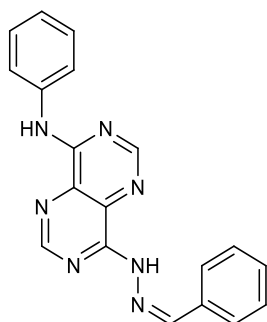
4.6. Síntese das pirimido[5,4-*d*]pirimidinas **11**

4.6.1. Procedimento geral

Para um balão contendo a pirimido[5,4-*d*]pirimidina **8c** adicionou-se 1 equivalente de aldeído, DMSO como solvente e uma quantidade catalítica de H₂SO₄. A reação foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente e controlada por TLC (DCM: EtOH 9:1). Quando o TLC mostrava ausência de reagente, adicionava-se água destilada (10mL) e o balão era colocado em banho de gelo durante 15 minutos. O sólido em suspensão era filtrado sob vácuo, lavado com água destilada e éter etílico frio. O sólido isolado era submetido para ¹H RMN para avaliar a pureza. Caso se verificasse a presença de impurezas, o sólido era tratado com etanol, sob refluxo. Após cerca de 4 h em refluxo o sólido era filtrado a quente e seco sob vácuo. O sólido isolado era identificado como

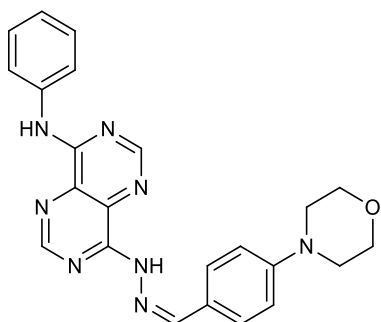
sendo o produto **11**, por técnicas espectroscópicas (IV, ^1H RMN, ^{13}C) e análise elementar.

4.6.2. (Z)-8-(2-benzilidenohidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11a



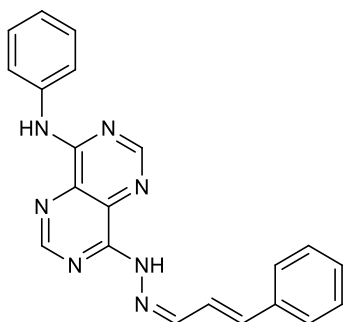
O composto **11a** (0,64g; 1,9mmol; 94,5%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,5g; 1,98mmol), com benzaldeído (0,21g; 1,98mmol; 0,20mL) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 35 minutos de reação.

4.6.3. (Z)-8-(2-(4-morfolinobenzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11b



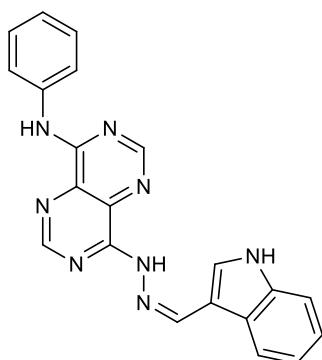
A partir de **8c** (0,15g; 0,60mmol) e 4 - (4 - morfolinil)-benzaldeído (0,11g; 0,60mmol) em DMSO (1mL), sob catálise ácida foi isolado um sólido de massa 0,31g. O sólido foi purificado de etanol (10mL) tendo-se obtido o produto puro **11b** (0,25g; 0,59mmol; 80%).

4.6.4. *N*-fenil-8-((*Z*)-2-((*E*)-3-fenilalilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-amina – 11c



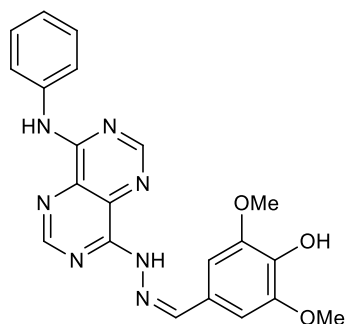
A partir de **8c** (0,21g; 0,81mmol) e cinamaldeído (0,11g; 0,81mmol; 0,10mL) em DMSO (1mL), sob catálise ácida foi isolado um sólido de massa 0,29g. O sólido foi purificado de etanol (10mL) tendo-se obtido o produto puro **11c** (0,25g; 0,68mmol; 88%).

4.6.5. (*Z*)-8-(2-((1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinil)-*N*-fenilpirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-amina – 11d



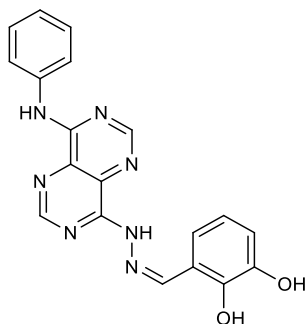
A partir de **8c** (0,15g; 0,60mmol) e indol-3-carboxaldeído (0,09g; 0,6mmol) em DMSO (1mL), sob catálise ácida foi isolado um sólido de massa 0,18g. O sólido foi purificado de etanol (10mL) tendo-se obtido o produto puro **11d** (0,25g; 0,68mmol; 88%).

4.6.6. (*Z*)-2,6-dimetoxi-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-*d*]pyrimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11e



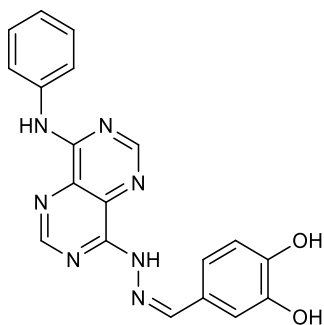
O composto **11e** (0,24g; 0,58mmol; 97,9%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,59mmol), com siringaldeído (0,11g; 0,59mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 10 minutos de reação.

4.6.7. (Z)-3-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol – 11f



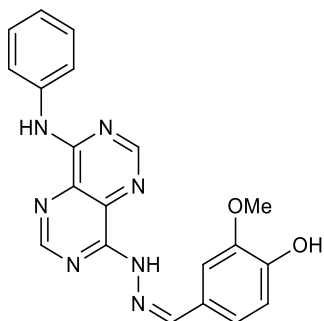
O composto **11f** (0,22g; 0,61mmol; 96%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,61mmol), com 2,3-dihidroxibenzaldeído (0,08g; 0,6mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 10 minutos de reação.

4.6.8. (Z)-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol – 11g



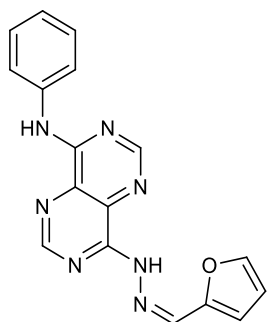
O composto **11g** (0,22g; 0,59mmol; 99%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,59mmol), com 3,4-dihidroxibenzaldeído (0,08g; 0,59mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 25 minutos de reação.

4.6.9. (Z)-2-metoxi-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11h



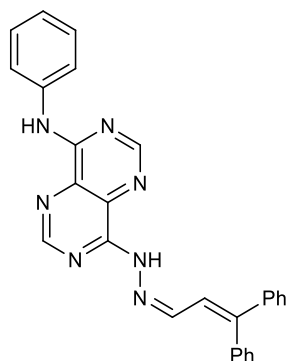
O composto **11h** (0,23g; 0,59mmol; 99%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,61mmol), vanilina (0,09g; 0,59mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 10 minutos de reação.

4.6.10. **(Z)-8-(2-(furan-2-ilmetileno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11i**



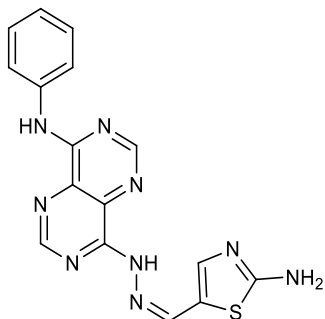
O composto **11i** (0,18g; 0,56mmol; 92%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,60mmol), furaldeído (0,06g; 0,6mmol; 0,05mL) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 20 minutos de reação.

4.6.10. **(Z)-8-(2-(3,3-difenilalilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11k**



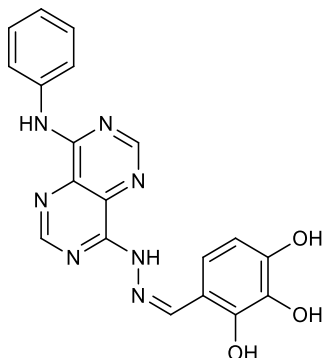
O composto **11k** (0,23g; 0,51mmol; 96,8%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,13g; 0,50mmol), β -fenilcinamaldeído (0,11g; 0,52mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 20 minutos de reação.

4.6.11. **(Z)-5-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)tiazol-2-amina – 11l**



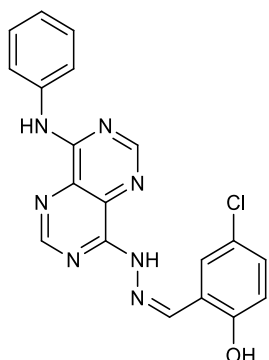
O composto **11l** (0,21g; 0,60mmol; 98,1%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,60mmol), 2-aminotiazole-5-carboxaldeído (0,08g; 0,6mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 30 minutos de reação.

4.6.12. **(Z)-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol – 11m**



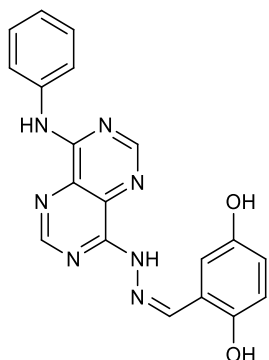
O composto **11m** (0,22g; 0,57mmol; 94,5%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,60mmol), 2,3,4-trihidroxibenzaldeído (0,09g; 0,6mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 15 minutos de reação.

4.6.13. **(Z)-4-cloro-2-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11n**



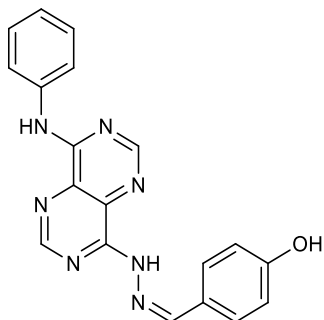
O composto **11n** (0,21g; 0,53mmol; 89,3%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,60mmol), 5-clorosalicilaldeído (0,09g; 0,6mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 15 minutos de reação.

4.6.14. **(Z)-2-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,4-diol – 11o**



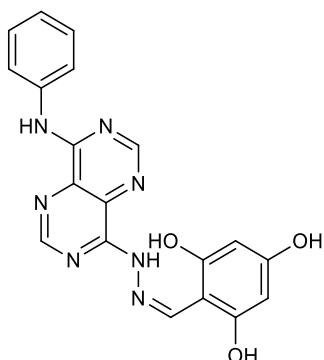
O composto **11o** (0,22g; 0,59mmol; 96,9%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,60mmol), 2,5-dihidroxibenzaldeído (0,08g; 0,6mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 15 minutos de reação.

4.6.15. **(Z)-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11p**



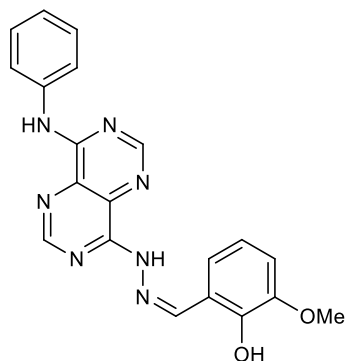
O composto **11p** (0,20g; 0,58mmol; 92,4%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,15g; 0,60mmol), 4-hidroxibenzaldeído (0,08g; 0,63mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 15 minutos de reação.

4.6.16. **(Z)-2-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzene-1,3,5-triol – 11q**



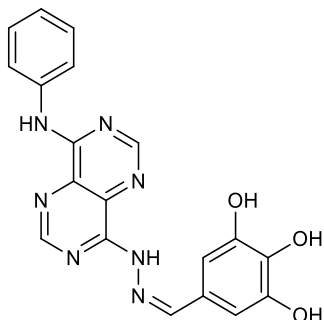
A partir de **8c** (0,16g; 0,64mmol) e 2,4,6-trihidroxibenzaldeído (0,10g; 0,64mmol) em DMSO (1mL), sob catálise ácida foi isolado um sólido de massa 0,24g. O sólido foi purificado de etanol (10mL) tendo-se obtido o produto puro **11q** (0,21g; 0,59mmol; 86%).

4.6.17. **(Z)-2-metoxi-6-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11r**



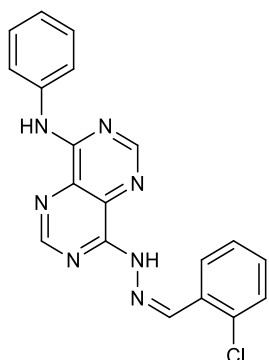
O composto **11r** (0,20g; 0,53mmol; 93%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,14g; 0,56mmol), *o*-vanilina (0,09g; 0,56mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 15 minutos de reação.

4.6.18. **(Z)-5-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzene-1,2,3-triol – 11s**



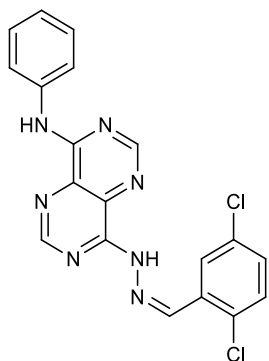
O composto **11s** (0,24g; 0,61mmol; 97,9%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,16g; 0,62mmol), 3,4,5-trihidroxibenzaldeído (0,10g; 0,62mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 10 minutos de reação.

4.6.19. **(Z)-8-(2-(2-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11t**



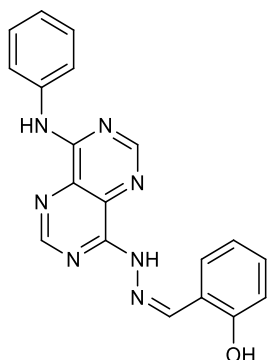
O composto **11t** (0,24g; 0,63mmol; 98,7%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,16g; 0,64mmol), 2-clorobenzaldeído (0,09g; 0,64mmol; 0,07mL) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 20 minutos de reação.

4.6.20. **(Z)-8-(2-(2,5-diclorobenzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11u**



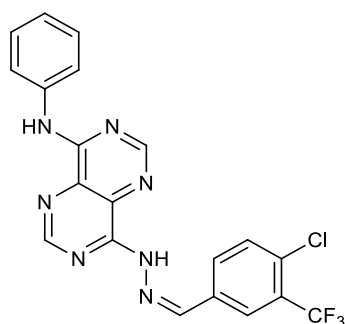
A partir de **8c** (0,16g; 0,64mmol) e 2,5-diclorobenzaldeído (0,11g; 0,64mmol) em DMSO (1mL), sob catálise ácida foi isolado um sólido de massa 0,25g. O sólido foi purificado de etanol (10mL) tendo-se obtido o produto puro **11u** (0,22g; 0,49mmol; 90,6%).

4.6.21. **(Z)-2-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11v**



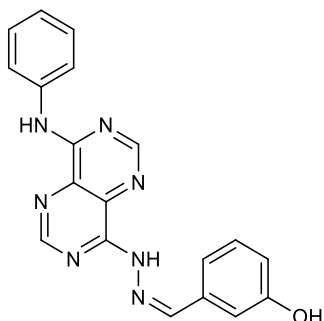
A partir de **8c** (0,20g; 0,56mmol) e 2-hidroxibenzaldeído (0,08g; 0,64mmol; 0,07mL) em DMSO (1mL), sob catálise ácida foi isolado um sólido de massa 0,20g. O sólido foi purificado de etanol (10mL) tendo-se obtido o produto puro **11v** (0,18g; 0,50mmol; 91,6%).

4.6.22. **(Z)-8-(2-(4-cloro-3-(trifluorometil)benzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11w**



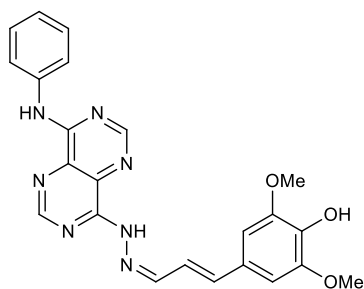
A partir de **8c** (0,17g; 0,51mmol) e 4 – cloro - 3 - (trifluorometil) - benzaldeído (0,21g; 0,94mmol; 0,14mL) em DMSO (1mL), sob catálise ácida foi isolado um sólido de massa 0,22g; O sólido foi purificado de etanol (10mL) tendo-se obtido o produto puro **11w** (0,16g; 0,37mmol; 81%).

4.6.23. **(Z)-3-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol – 11x**



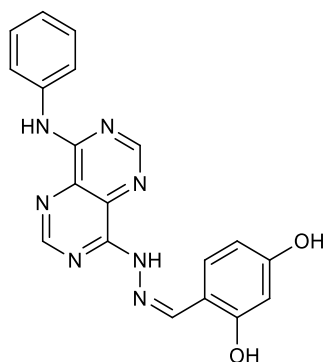
A partir de **8c** (0,16g; 0,62mmol) e 3-hidroxibenzaldeído (0,08g; 0,62mmol) em DMSO (1mL), sob catálise ácida foi isolado um sólido de massa 0,22g; O sólido foi purificado de etanol (10mL) tendo-se obtido o produto puro **11x** (0,12g; 0,34mmol; 96,8%).

4.6.24. **2,6-dimetoxi-4-((1*E*,3*Z*)-3-(2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)hidrazono)prop-1-en-1-il)fenol – 11y**



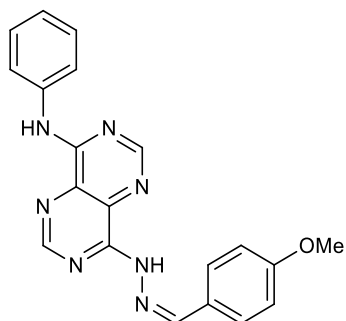
O composto **11y** (0,26g; 0,59mmol; 94,6%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,16g; 0,62mmol), trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído (0,13g; 0,62mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 10 minutos de reação.

4.6.25. **(*Z*)-4-((2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzene-1,3-diol - 11z**



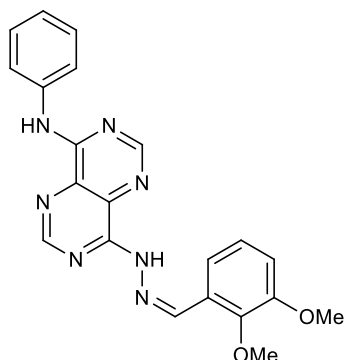
O composto **11z** (0,21g; 0,55mmol; 89,6%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,16g; 0,62mmol), 2,4-dihidroxibenzaldeído (0,09g; 0,62mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 30 minutos de reação.

4.6.26. **(*Z*)-8-(2-(4-metoxibenzilideno)hidrazinil)-*N*-fenilpirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-amina – 11aa**



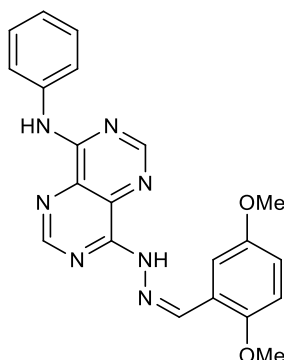
O composto **11aa** (0,19g; 0,53mmol; 93,3%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,14g; 0,57mmol), *p*-anisaldeído (0,08g; 0,57mmol; 0,07mL) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 15 minutos de reação.

4.6.27. **(Z)-8-(2-(2,3-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11ab**



O composto **11ab** (0,19g; 0,48mmol; 90,5%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,13g; 0,53mmol), 2,3-dimetoxibenzaldeído (0,09g; 0,53mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 15 minutos de reação.

4.6.28. **(Z)-8-(2-(2,5-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)-N-fenilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina – 11ac**



O composto **11ac** (0,19g; 0,48mmol; 93%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,13g; 0,52mmol), 2,5-dimetoxibenzaldeído (0,09g; 0,52mmol) em DMSO (1mL) e catálise ácida à temperatura ambiente após 10 minutos de reação.

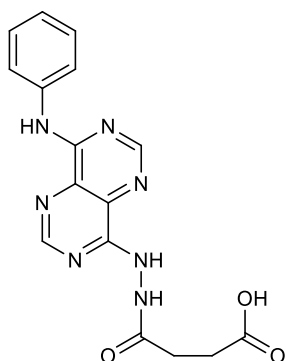
4.7. Síntese das pirimido[5,4-d]pirimidinas 12

4.7.1. Método de síntese geral

Para um balão de fundo redondo contendo a pirimido[5,4-d]pirimidina **8c** adicionou-se 1,5 equivalente de anidrido. Adicionou-se como solvente DMSO. A reação foi mantida sob agitação magnética e à temperatura ambiente, controlada por TLC (DCM: EtOH 9:1). Após aproximadamente 1 hora de reação, por TLC, verificou-se ausência do reagente limitante. À suspensão adicionou-se água destilada (5mL) e o balão foi colocado em banho de gelo durante 15 minutos. O sólido em suspensão foi filtrado sob vácuo, lavado com água destilada e éter

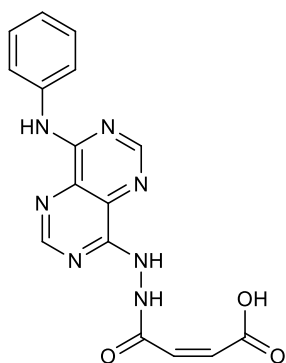
etílico frio. O sólido isolado foi identificado como sendo o produto **12**, por TLC e ^1H RMN.

4.7.2. **Ácido 4-oxo-4-(2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)hidrazinil) butanoico – 12a**



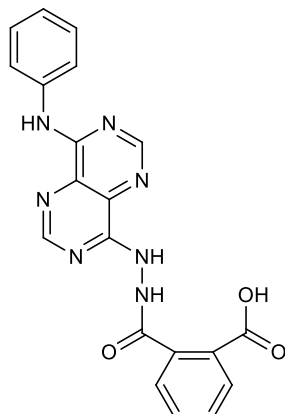
O composto **12a** (0,28g; 0,78mmol; 98,2%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,20g; 0,80mmol), anidrido succínico (0,12g; 1,2mmol) em DMSO (1mL) à temperatura ambiente após 1 hora de reação.

4.7.3. **Ácido (Z)-4-oxo-4-(2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)hidrazinil)but-2-enoico – 12b**



O composto **12b** (0,28g; 0,79mmol; 99%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,20g; 0,86mmol), anidrido maleico (0,13g; 1,3mmol) em DMSO (1mL) à temperatura ambiente após 1 hora de reação.

4.7.4. Ácido **2-(2-(8-(fenilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazinacarbonil)benzoico – 12c**



O composto **12c** (0,19g; 0,47mmol; 95,4%) foi obtido diretamente da mistura reacional a partir do composto **8c** (0,12g; 0,49mmol), anidrido ftálico (0,22g; 1,5mmol) em DMSO (1mL) à temperatura ambiente após 1 hora de reação.

4.8. Procedimento experimental para a avaliação da atividade anti cancerígena

4.9. Compostos testados e reagentes

Todos os compostos utilizados neste projeto foram sintetizados no Departamento de Química, desta universidade. Aqueles para os quais se apresenta procedimento experimental foram sintetizados pelo autor desta tese, sob orientação da Professora Doutora Professor Maria Alice Carvalho. A análise biológica dos seus efeitos anticancerígenos foi realizada no Departamento de Biologia, desta mesma Universidade, sob a orientação da professora Doutora Cristina Pereira Wilson.

4.10. Testes de solubilidade

As soluções *stock* foram preparadas, dissolvendo os compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) e as alíquotas guardadas a -20°C, sendo preparadas

com uma concentração de 6mM. A solubilidade dos compostos foi analisada, começando com a concentração mais elevada a ser testada.

Para cada composto foi preparada uma solução de 1mL de PBS (tampão fosfato-salino) e 5µL da solução *stock*, preparada anteriormente (6mM), que foi armazenada a 37°C por 24h. Posteriormente à incubação, todas as amostras foram observadas, de forma a verificar-se se não se formaram cristais. Se as soluções se provassem límpidas (líquido transparente e sem precipitado), eram consideradas adequadas para testes biológicos. Se as soluções fossem pouco nítidas os compostos eram descartados.

Se ocorresse a formação de cristais na suspensão, uma nova incubação era realizada, nas mesmas condições com uma concentração inferior. Este procedimento era repetido, a concentrações inferiores, até não se verificar a formação de cristais.

4.11. Linha celular e condições de cultura

Neste projeto foi utilizada, como modelo uma linha celular derivada do cancro do cólon humano, a linha celular HCT116 (*p53 wt*), que é mutada ao nível do gene Ras e é *wildtype* para o gene supressor tumoral p53.

A manutenção das células na cultura foi conseguida em frascos de poliestireno de 25cm² (T25) com meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), complementado com 6% de FBS (soro bovino fetal), 1% de solução antibiótico-antimicótico, 10mM HEPES, 0,1mM de piruvato de sódio e 2g/L de bicarbonato de sódio. As células foram incubadas numa incubadora (Sanyo COM-17 AIC) a 37°C, numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂. A manipulação das células foi realizada num ambiente estéril usando para tal uma câmara de fluxo laminar (Holten Lamin Air HBB 2448 e Telstar Bio II A).

Quando as células atingiam uma confluência, de cerca de 80%, o meio de cultura era cuidadosamente removido dos frascos, as células eram lavadas com 3mL de PBS seguida pela adição de 500µL de tripsina-EDTA 1% (Sigma-Aldrich, St,

Louis, MO, USA), para que todas as células fiquem cobertas pela solução. Após a adição de tripsina, as células eram incubadas, durante aproximadamente 5 minutos, a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, ao frasco de cultura, eram adicionados 3mL de meio de cultura para ressuspender as células e neutralizar a tripsina. A suspensão de células foi transferida para um *falcon*, lavando-se o frasco com 3mL de meio, de forma a remover células restantes.

Para a contagem de células viáveis, utilizou-se uma câmara de Neubauer, para a qual se transferiu 10µL da suspensão de células. As células foram contadas num microscópio ótico (Olympus CK2), transferindo-se para um novo frasco T25, 0,5x10⁶ de células, ao qual se adicionou 5mL de meio de cultura.

4.12. Plaqueamento de células

De forma a estudar o efeito dos diferentes compostos nas células, é necessário que o número de células, nas mesmas condições, seja igual.

A densidade celular utilizada em cada suspensão foi de 65000 células/mL e, para avaliar a citotoxicidade (ensaio MTT), as células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços (0,5mL/poço).

As placas eram mantidas a 37°C e 5% de CO₂, durante 48 horas, antes da incubação dos compostos, para permitir a adesão das células à placa e o seu crescimento. De forma a eliminar qualquer interferência do DMSO, cada placa contém, pelo menos um controlo com DMSO, a uma concentração de 0,5% (v/v),

A incubação dos compostos nas células foi, igualmente, realizada a 37°C numa incubadora de CO₂.

4.13. Observação microscópica

Imagens celulares após a incubação com os compostos pretendidos foram obtidas através de um microscópio ótico invertido Olympus IX71 com uma câmara em modo de contraste de fase.

4.14. Ensaio de MTT/Teste de citotoxicidade

Para analisar os efeitos dos compostos teste no crescimento/viabilidade celular, a viabilidade celular foi determinada através de um teste calorimétrico por redução do MTT, sendo este um método rápido, objetivo e viável, 48 horas após a incubação dos compostos nas células, o ensaio de MTT foi realizado de forma a determinar a viabilidade celular.

O 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), é um sal amarelo de tetrazólio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparado com PBS em alíquotas de 5mg/mL, na ausência de luz, sendo armazenado a -20°C.

O teste de MTT é baseado no facto de as células viáveis serem capazes de reduzir o MTT, formando cristais de formazan, ao contrário das células mortas. Esta reação é realizada por enzimas de redutase ativas (enzima mitocondrial succinato-dihidrogenase) que não se encontram ativas nas células mortas. Os cristais formados apresentam uma coloração roxa característica, permitindo assim a quantificação espectralométrica. Assim pode-se estabelecer uma relação diretamente proporcional entre o número de células viáveis e a coloração das soluções, onde uma solução com uma coloração mais proeminente apresenta um maior número de células viáveis.

Após 48 horas de incubação, a cada poço da placa, foram adicionados 50µL de MTT (5mg/mL), que posteriormente foram incubados por mais 30 minutos a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente à incubação com MTT, o meio de cultura foi removido

dos poços e os cristais forma dissolvidos com uma solução de DMSO/etanol (500 μ L), para a análise posterior medida por espectrofotometria.

As soluções coradas foram pipetadas para uma placa de 96 poços (200 μ L por poço) e a sua absorvância foi lida a 570nm no espectrofotómetro SpectraMax Plus³⁸⁴ Microplate Reader – Molecular Devices. Como análise de branco, foi utilizada uma solução de DMSO/etanol (200 μ L). Os resultados são apresentados na forma de percentagem relativa de células viáveis em relação ao controlo.

De forma a seleccionar os melhores compostos de cada família, todos são incubados à mesma concentração (10 μ M), sendo alguns incubados a concentrações inferiores devido a problemas de solubilidade. Os compostos mais promissores, isto é, que apresentem menor viabilidade celular, são seleccionados para continuar o estudo e posteriormente calcular o valor de IC₅₀.

Para o cálculo do valor de IC₅₀, era utilizado o mesmo método MTT, incubando-se cada composto a diferentes concentrações, entre 10 μ M e 0,1 μ M, e os resultados eram determinados, após 3 experiências, caso os valores fossem concordantes. As várias experiências eram expressas através do valor do controlo. Após a recolha dos dados, os valores de IC₅₀ de cada composto, eram determinados utilizando o *software* GraphPad Prism 4.0.

Capítulo 5. Bibliografía

- (1) Levin, B.; Lieberman, D. A.; McFarland, B.; Andrews, K. S.; Brooks, D.; Bond, J.; Dash, C.; Giardiello, F. M.; Glick, S.; Johnson, D.; Johnson, C. D.; Levin, T. R.; Pickhardt, P. J.; Rex, D. K.; Smith, R. A.; Thorson, A.; Winawer, S. J. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 1570–1595.
- (2) Labianca, R.; Beretta, G. D.; Kildani, B.; Milesi, L.; Merlin, F.; Moconi, S.; Pessi, M. A.; Prochilo, T.; Quadri, A.; Gatta, G.; Braud, F. de; Wils, J. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2010**, *74*, 106–133.
- (3) GeoSaúde
<http://www.geosaude.dgs.pt/websig/v5/portal2/public/index.php?par=geosaude&lang=pt>
(accessed Mar 1, 2015).
- (4) Das, D.; Preet, R.; Mohapatra, P.; Satapathy, S. R.; Siddharth, S.; Tamir, T.; Jain, V.; Bharatam, P. V.; Wyatt, M. D.; Kundu, C. N. *DNA Repair (Amst)*. **2014**, *24*, 15–25.
- (5) Zinkin, L. D. *Dis. Colon Rectum* **1983**, *26*, 37–43.
- (6) Wyatt, M. D.; Wilson, D. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 788–799.
- (7) Calvo, E.; Cortés, J.; Rodríguez, J.; Fernández-Hidalgo, Ó.; Rebollo, J.; Martín-Algarra, S.; García-Foncillas, J.; Martínez-Monge, R.; Irala, J. D.; Brugarolas, A. *Clin. Colorectal Cancer* **2002**, *2*, 104–110.
- (8) Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 330–338.
- (9) Miwa, M.; Ura, M.; Nishida, M.; Sawada, N.; Ishikawa, T.; Mori, K.; Shimma, N.; Umeda, I.; Ishitsuka, H. *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1274–1281.
- (10) Cassidy, J.; Díaz-Rubio, E. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 2084–2091.
- (11) Kozovska, Z.; Gabrisova, V.; Kucerova, L. *Biomed. Pharmacother.* **2014**, *68*, 911–916.
- (12) Liu, Y. Y.; Han, T. Y.; Giuliano, A. E.; Cabot, M. C. *FASEB J.* **2001**, *15*, 719–730.
- (13) Callari, M.; Aldrich-Wright, J. R.; Souza, P. L. D.; Stenzel, M. H. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 1614–1643.
- (14) Ghalandari, B.; Divsalar, A.; Saboury, A. A.; Parivar, K. *J. Photochem. Photobiol.* **2014**, *140*, 255–265.
- (15) O'Dwyer, P. J.; Catalano, R. B. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 4534–4538.
- (16) Davies, J. M.; Goldberg, R. M. *Semin. Oncol.* **2011**, *38*, 552–560.

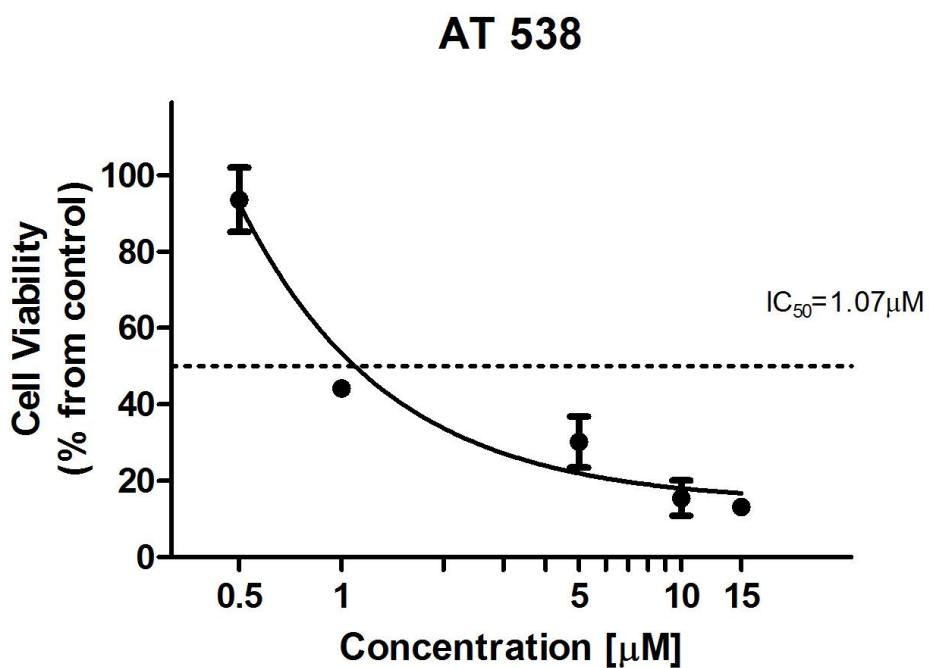
Capítulo 5. Bibliografía

- (17) Hellemond, I. E. G. Van; Creemers, G. J.; Warmerdam, L. J. C. Van; Jong, F. A. De. *Clin. Oncol.* **2014**, *26*, 135–141.
- (18) Constant, S.; Huang, S.; Wiszniewski, L.; Mas, C. *Drug discovery*; InTech.
- (19) Van Emburgh, B. O.; Sartore-Bianchi, A.; Di Nicolantonio, F.; Siena, S.; Bardelli, A. *Mol. Oncol.* **2014**, *8*, 1084–1094.
- (20) De Roock, W.; Claes, B.; Bernasconi, D.; De Schutter, J.; Biesmans, B.; Fountzilas, G.; Kalogeras, K. T.; Kotoula, V.; Papamichael, D.; Laurent-Puig, P.; Penault-Llorca, F.; Rougier, P.; Vincenzi, B.; Santini, D.; Tonini, G.; Cappuzzo, F.; Frattini, M.; Molinari, F.; Saletti, P.; De Dosso, S.; Martini, M.; Bardelli, A.; Siena, S.; Sartore-Bianchi, A.; Tabernero, J.; Macarulla, T.; Di Fiore, F.; Gangloff, A.; Ciardiello, F.; Pfeiffer, P. *Lancet Oncol.* **2010**, *11*, 753–762.
- (21) Golomolzin, B. V.; Anoshina, G. M. *Synthesis of new physiologically active pyrimido[5,4-d]pyrimidine derivatives*; 1976.
- (22) Northen, J. S.; Boyle, F. T.; Clegg, W.; Curtin, N. J.; Edwards, A. J.; Griffin, R. J.; Golding, B. T. *J. Chem. Soc. Trans. 1* **2002**, 108–115.
- (23) Fischer, F. G.; Roch, J. *Ann. DER CHEMIE-JUSTUS LIEBIG* **1951**, *197*, 217–229.
- (24) Wong, F. F.; Huang, Y. Y.; Chang, C. H. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8492–8500.
- (25) Fischer, G. *Recent Progress in Pyrimido [5,4-d] pyrimidine Chemistry*; 2015; Vol. 114.
- (26) Rewcastle, G. . W.; Bridges, A. J.; Fry, D. W.; Rubin, J. R.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1820–1826.
- (27) Al-Azmi, A. *J. Chem. Res.* **2005**, 530–534.
- (28) Sanghvi, Y. S.; Larson, S. B.; Matsumoto, S. S.; Nord, L. D.; Smee, D. F.; Willis, R. C.; Avery, T. L.; Robins, R. K.; Revankar, G. R. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 629–637.
- (29) Curtin, N. J.; Barlow, H. C.; Bowman, K. J.; Calvert, A. H.; Davison, R.; Golding, B. T.; Huang, B.; Loughlin, P. J.; Newell, D. R.; Smith, P. G.; Griffin, R. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4905–4922.
- (30) El-Araby, M.; Pottorf, R.; Player, M. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, *7*, 413–421.
- (31) Carvalho, M. A.; Esperança, S.; Esteves, T.; Proença, M. F. *European J. Org. Chem.* **2007**, 1324–1331.
- (32) Carvalho, M. A.; Esteves, T. M.; Fernanda, M.; Booth, B. L. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1019–1024.

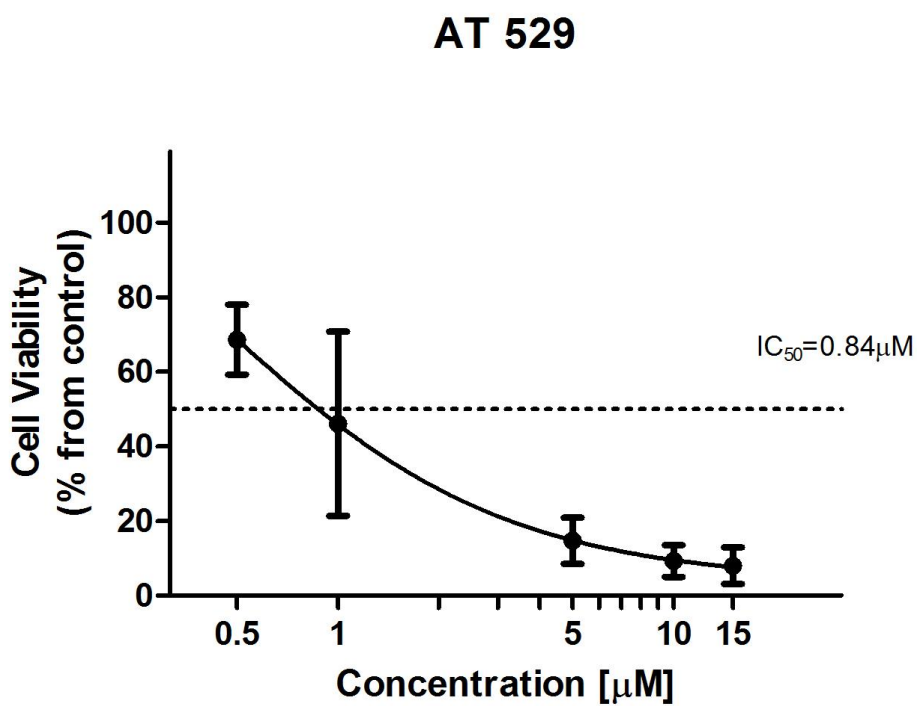
- (33) Al-Azmi, A.; Booth, B. L.; Carpenter, R. A.; Carvalho, A.; Marrelec, E.; Pritchard, R. G.; Proença, M. F. P. J. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 2532–2537.
- (34) Ribeiro, A.; Carvalho, M. A.; Proença, M. F. *European J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 4867–4872.
- (35) Rocha, A.; Bacelar, A. H.; Fernandes, J.; Proença, M. F.; Carvalho, M. A. *Synlett* **2014**, 25, 343–348.
- (36) Grem, J. L.; Daychild, P.; Drake, J.; Geoffroy, F.; Trepel, J. B.; Pirnia, F.; Allegra, C. J. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 2117–2126.
- (37) Nord, L. D.; Willis, R. C.; Breen, T. S.; Avery, T. L.; Rick, A.; Sanghvi, Y. S.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, 38, 3543–3549.
- (38) Xavier, C. P. R.; Lima, C. F.; Rohde, M.; Pereira-Wilson, C. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, 68, 1449–1457.
- (39) Hashemi, S. M.; Yahyazadeh, A.; Nami, N. *E-Journal Chem.* **2012**, 9, 219–223.
- (40) Al-Azmi, A.; Kumari, K. A. *Heterocycles* **2013**, 87, 1301–1309.
- (41) Booth, B. L.; Dias, A. M.; Proença, M. F.; Zaki, M. E. A. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8436–8441.
- (42) Bacelar, A. H.; Carvalho, M. A.; Proença, M. F. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 3234–3239.
- (43) Cooks, R.; Lambert, J.; Lightner, D.; Shurvell, H. *Organic structural spectroscopy*, 1998.
- (44) Issa, D. A. E.; Habib, N. S.; Wahab, A. E. A. *Med. Chem. Commun* **2015**, 6, 202–211.
- (45) VenPure. *NaBH₄ for Reductive Aminations Enhancing*; 2003.
- (46) Seyden-Penne, J. *Reductions by the Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis*; 1997.
- (47) Belskaya, N. P.; Dehaen, W.; Bakuleva, V. a. *Arkivoc* **2010**, 2010, 275–332.
- (48) Perdicchia, D.; Licandro, E.; Maiorana, S.; Baldoli, C.; Giannini, C. *Tetrahedron* **2003**, 59, 7733–7742.
- (49) Fernandes, J. Escola de Engenharia da Universidade do Minho; Evaluation of the anticancer potential of new nitrogen heterocycles in human colon cancer cells, 2013.
- (50) Al-Azmi, A.; Elassar, A. A.; Booth, B. L. *Tetrahedron* **2003**, 59, 2749–2763.

Anexos

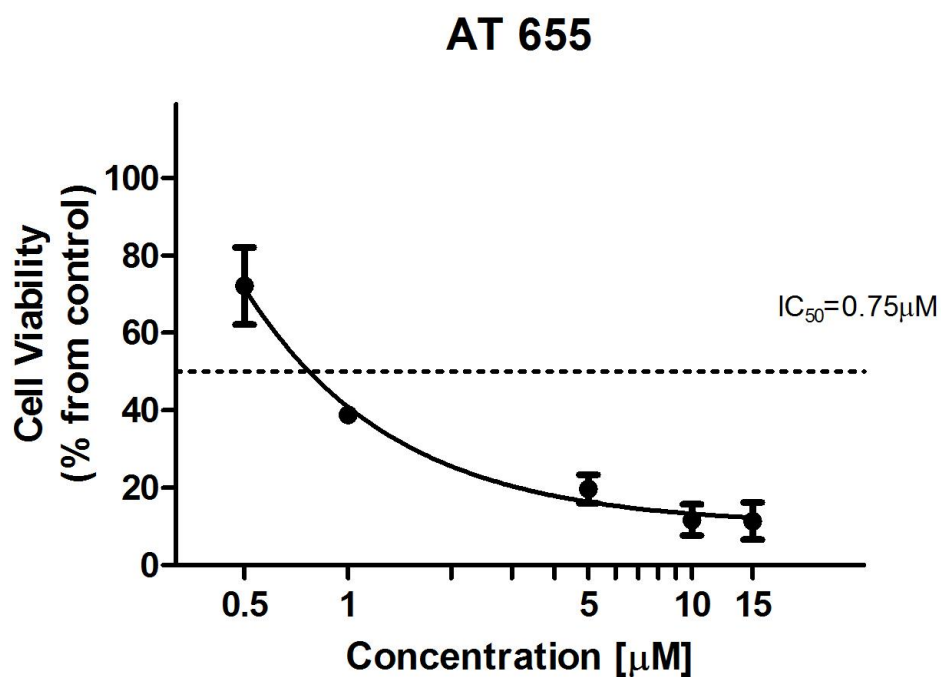
Anexo 1: Gráfico de IC₅₀ do composto AT 538



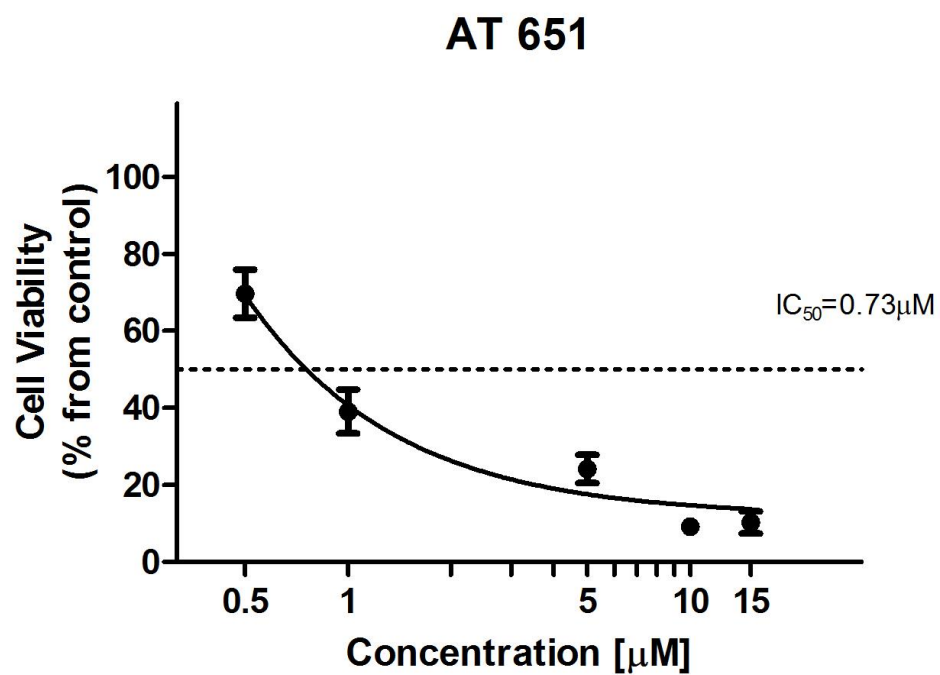
Anexo 2: Gráfico de IC₅₀ do composto AT 529



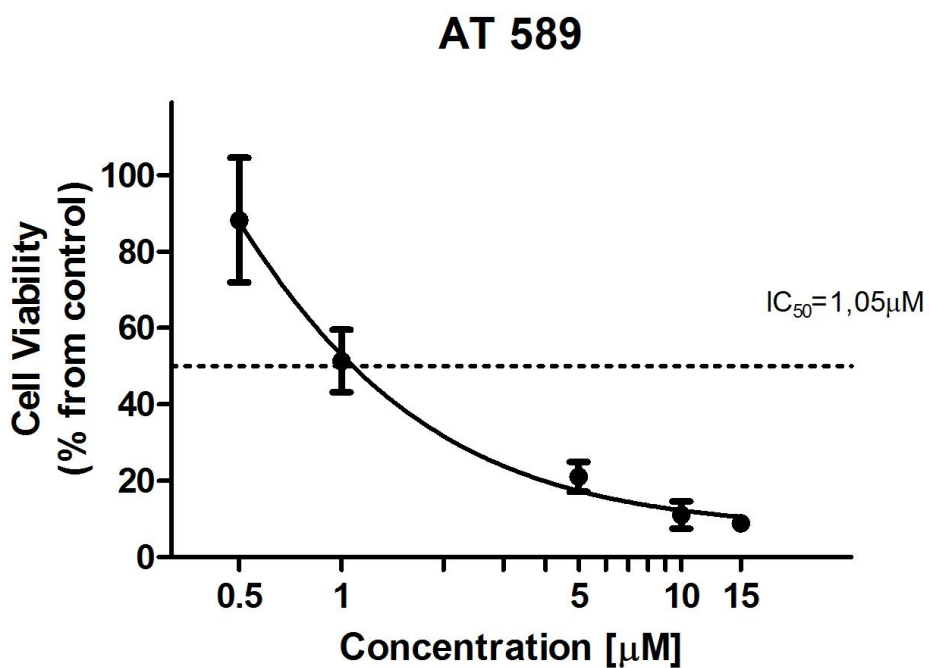
Anexo 3: Gráfico de IC₅₀ do composto AT 655



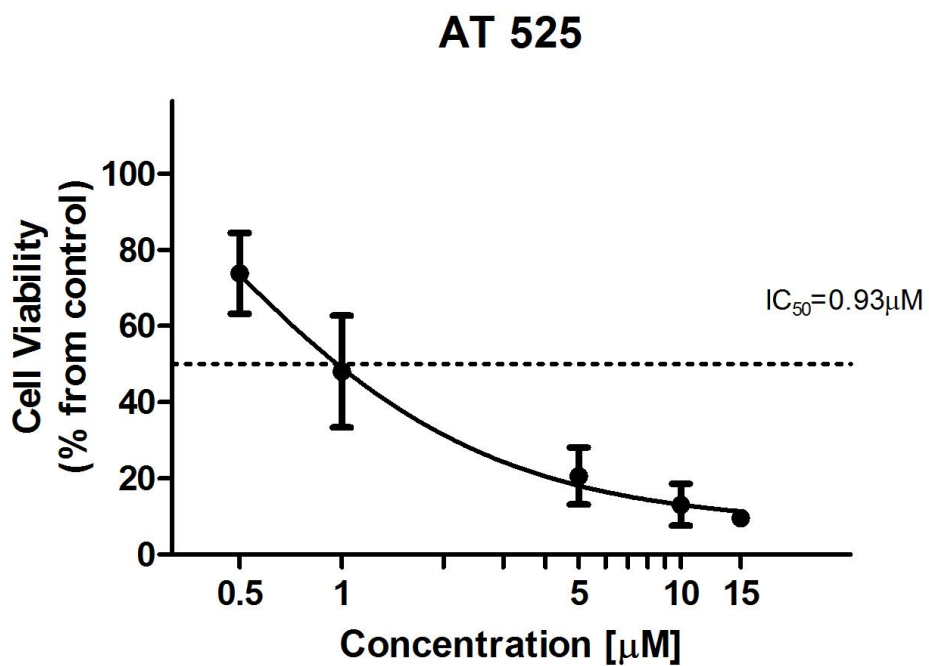
Anexo 4: Gráfico de IC₅₀ do composto AT 651



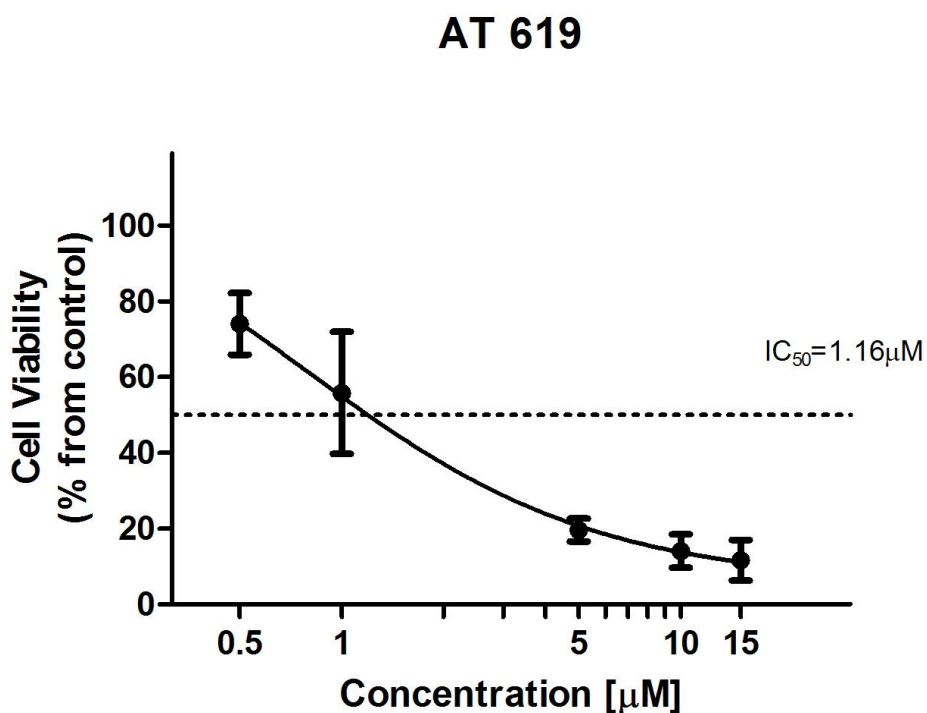
Anexo 5: Gráfico de IC₅₀ do composto AT 589



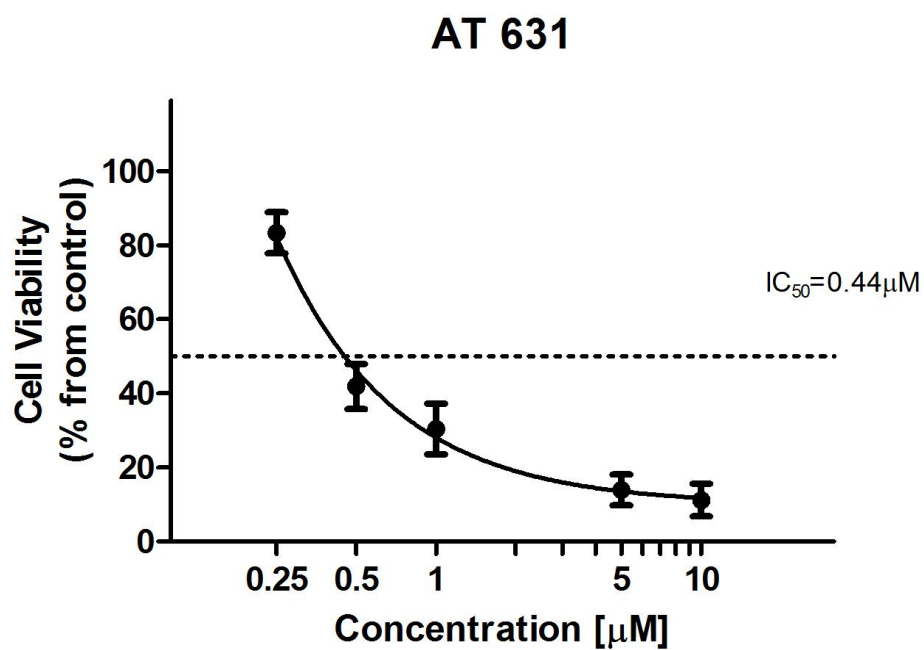
Anexo 6: Gráfico de IC₅₀ do composto AT 525



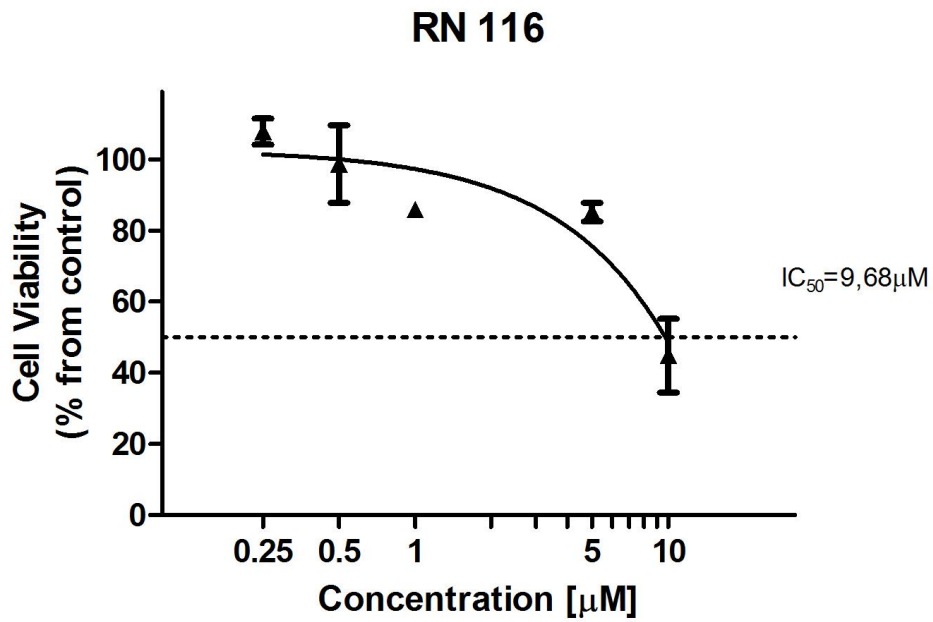
Anexo 7: Gráfico de IC₅₀ do composto AT 619



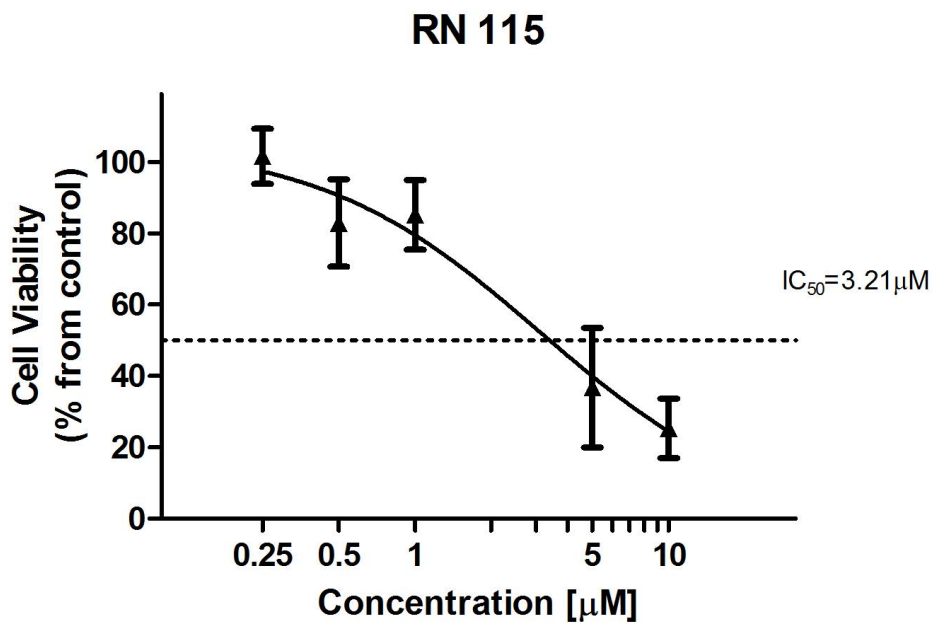
Anexo 8: Gráfico de IC₅₀ do composto AT 631



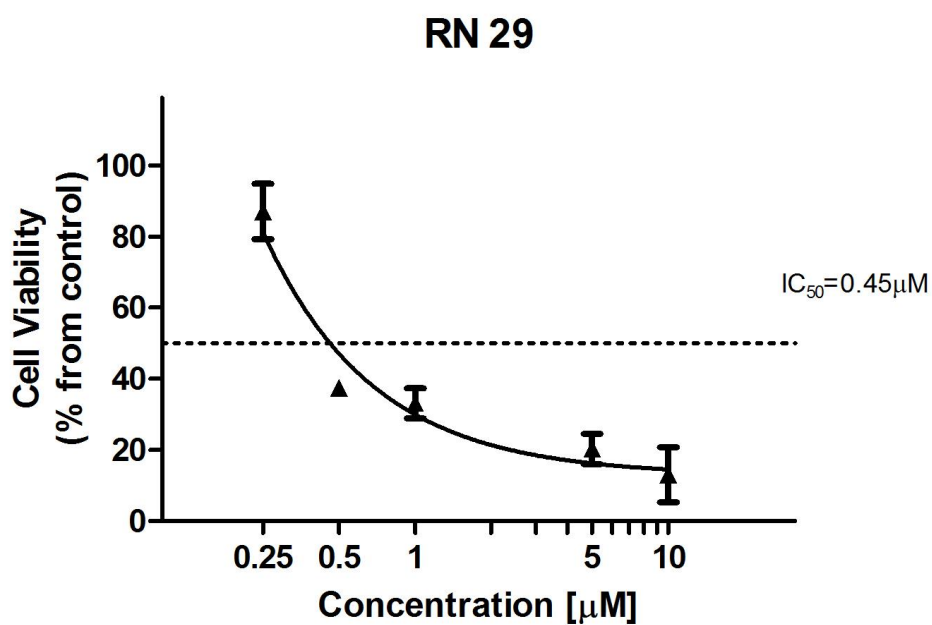
Anexo 9: Gráfico de IC₅₀ do composto 12c



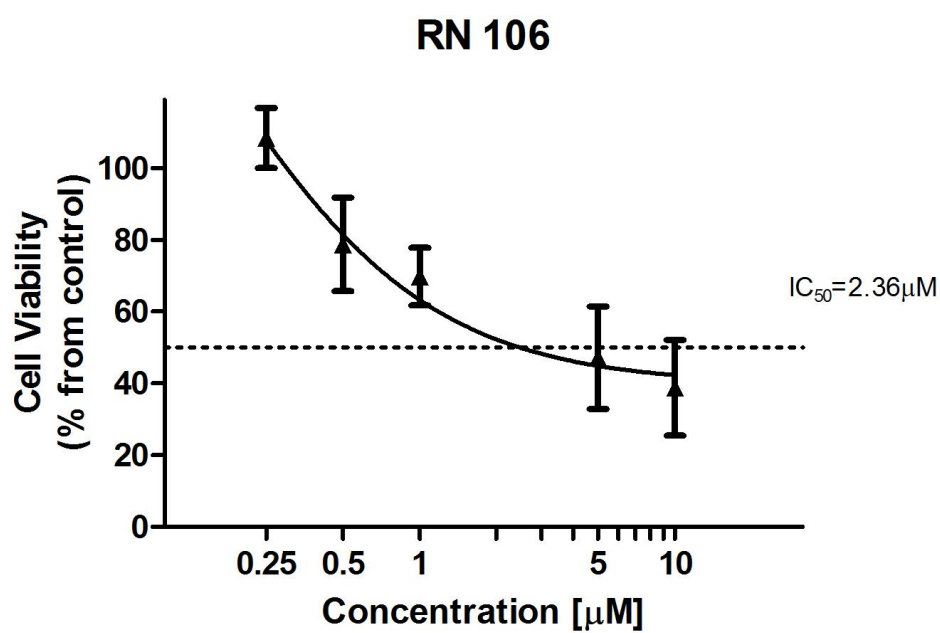
Anexo 10: Gráfico de IC₅₀ do composto 8a



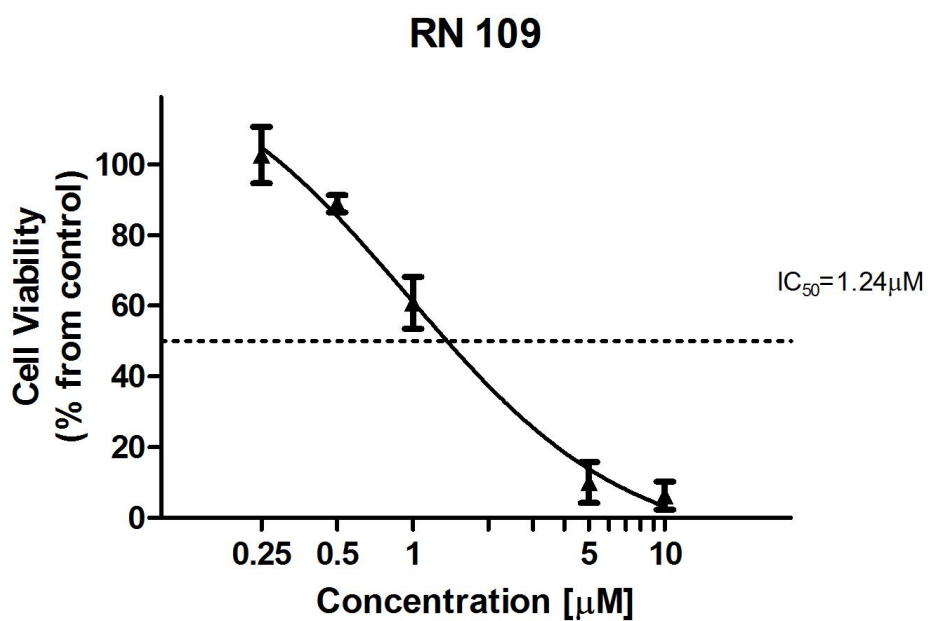
Anexo 11: Gráfico de IC₅₀ do composto 10a



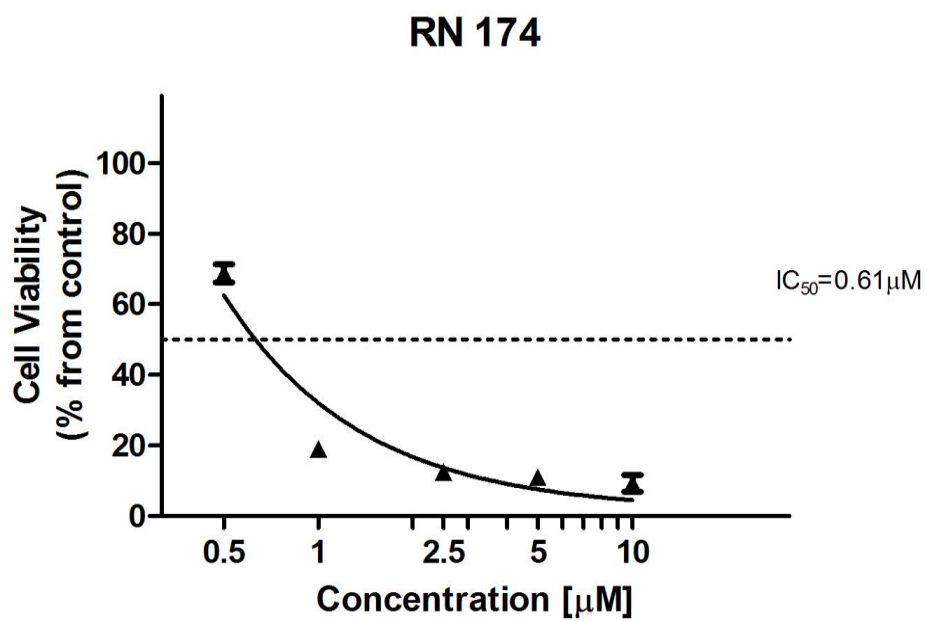
Anexo 12: Gráfico de IC₅₀ do composto 10b



Anexo 13: Gráfico de IC₅₀ do composto 10c

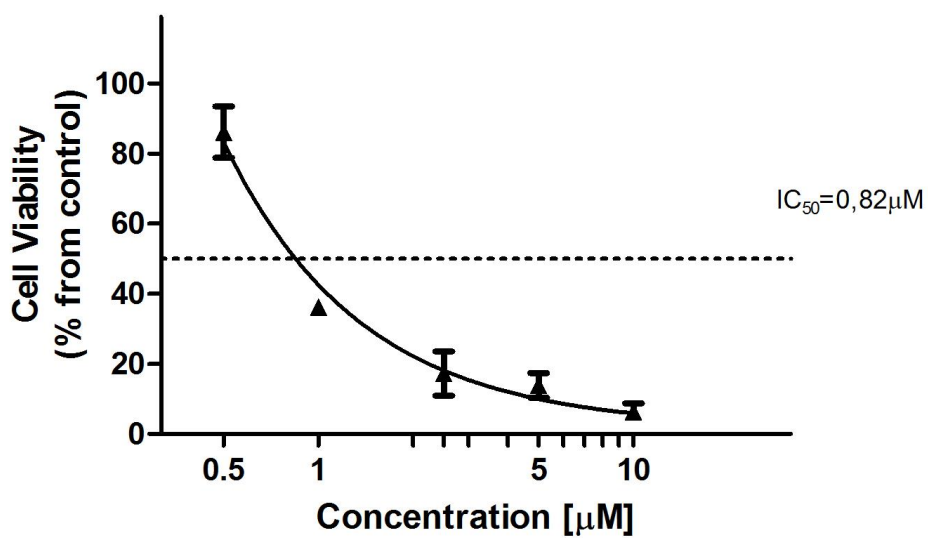


Anexo 14: Gráfico de IC₅₀ do composto 10j



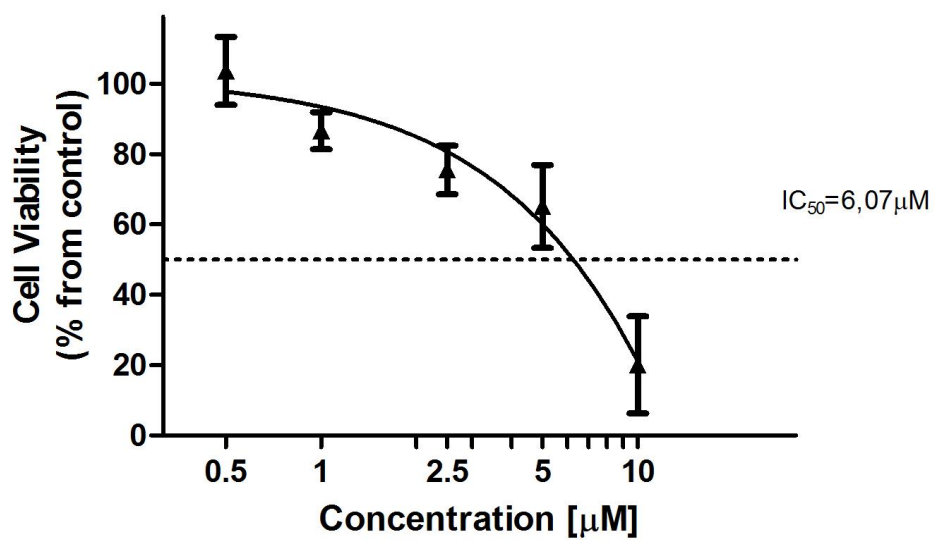
Anexo 15: Gráfico de IC₅₀ do composto 10v

RN 211

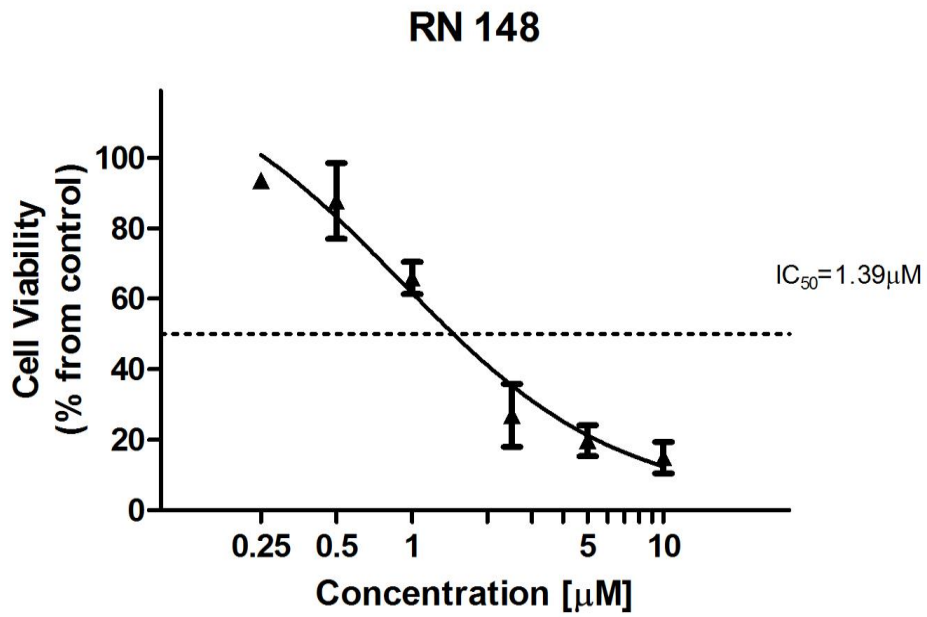


Anexo 16: Gráfico de IC₅₀ do composto 10t

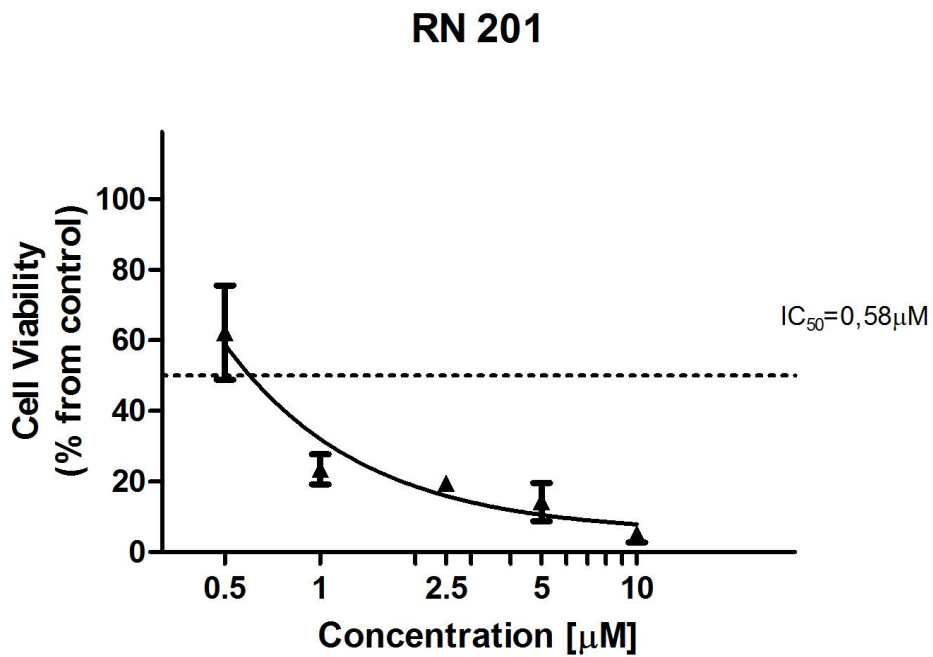
RN 194



Anexo 17: Gráfico de IC₅₀ do composto 10f

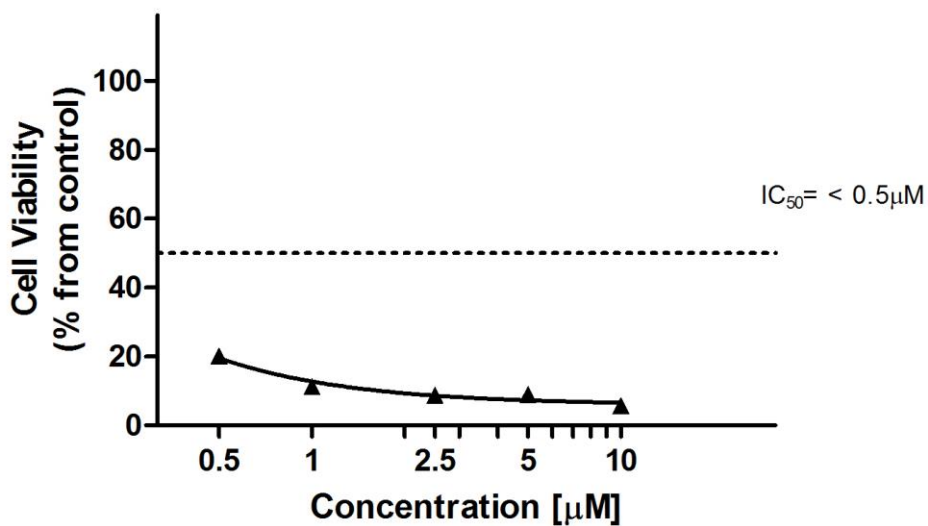


Anexo 18: Gráfico de IC₅₀ do composto 10z



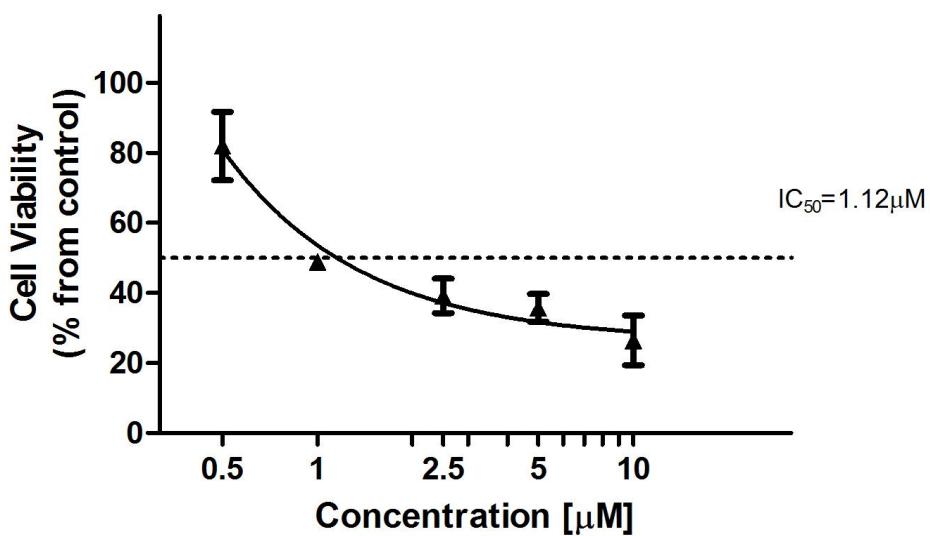
Anexo 19: Gráfico de IC₅₀ do composto 10r

RN 187

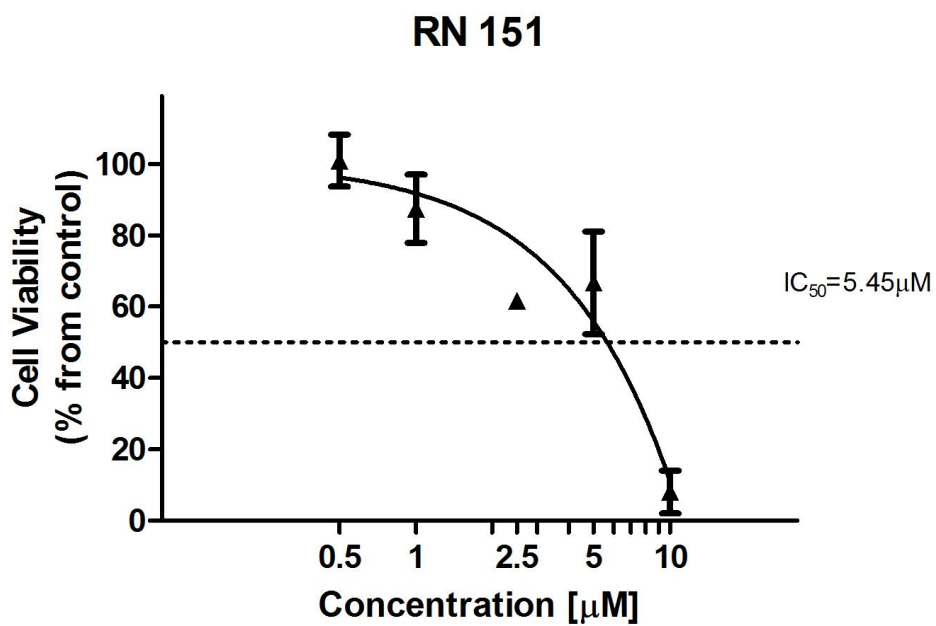


Anexo 20: Gráfico de IC₅₀ do composto 10n

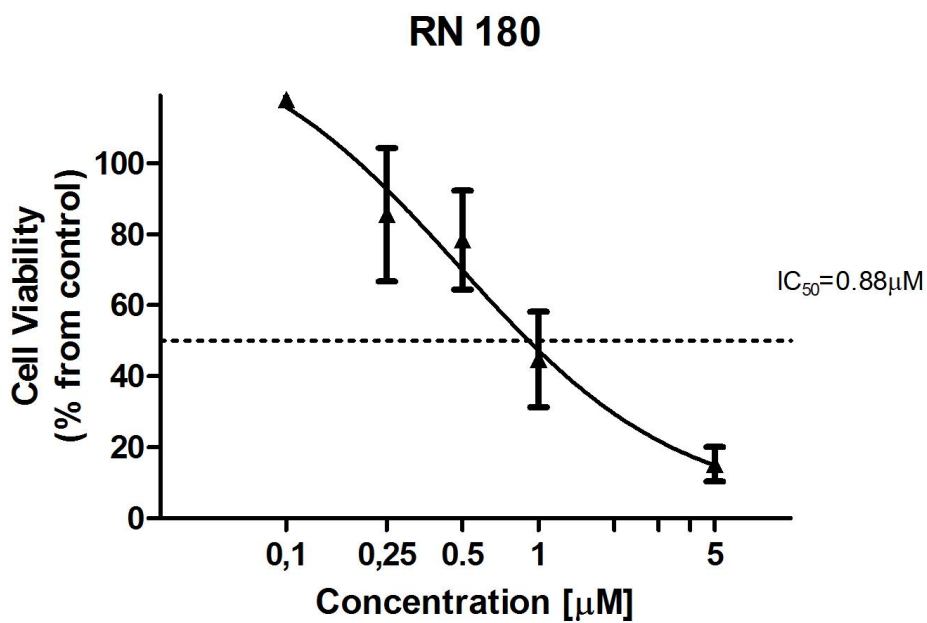
RN 182



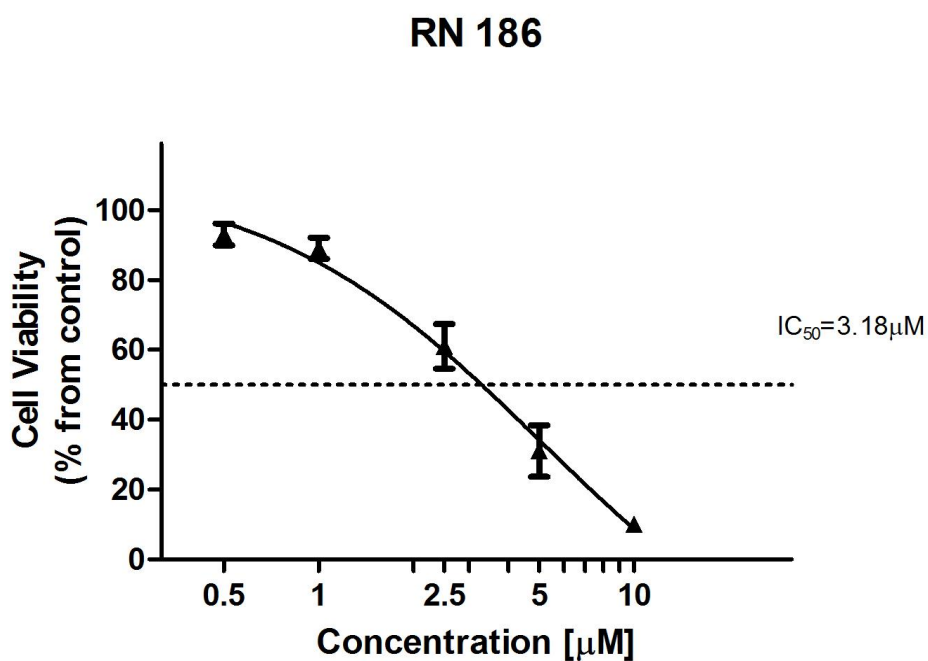
Anexo 21: Gráfico de IC₅₀ do composto 10h



Anexo 22: Gráfico de IC₅₀ do composto 10m



Anexo 23: Gráfico de IC₅₀ do composto 10q



Anexo 24: Gráfico de IC₅₀ do composto 10i

