



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Larissa Sousa Campos

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
DERIVADOS DE DIIDROPIRIMIDINONAS CONTENDO ADENINA**

Florianópolis

2019

Larissa Sousa Campos

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
DERIVADOS DE DIIDROPIRIMIDINONAS CONTENDO ADENINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em Química
Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Braga

Florianópolis
2019

Sousa Campos, Larissa
SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
DERIVADOS DE DIIDROPIRIMIDINONAS CONTENDO ADENINA /
Larissa Sousa Campos ; orientador, Antonio Luiz Braga,
2019.
104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Síntese Orgânica. 3. Reação de Biginelli. 4.
Hibridização Molecular. 5. Diidropirimidinona. I. Luiz
Braga, Antonio . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Larissa Sousa Campos

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
DERIVADOS DE DIHIDROPIRIMIDINONAS CONTENDO ADENINA**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a, Dr.^a Maria da Graça Nascimento
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr.^a Laís Truzzi Silva
Instituto Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Leandro Espíndola
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química.

Prof., Dr. Marcus Mandolesi Sá
Coordenador do Curso

Prof. Dr. Antonio Luiz Braga
Orientador

Florianópolis, 29 de Julho de 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço aos meus pais e meu irmão, que sempre me motivaram e por todo o carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus amigos: Dani, Roberth, Márcio, Héryca, Andrei, Tizzi, agradeço pelo convívio diário, pelas risadas, pelos momentos em que tive a sorte de ter o amparo de vocês, pelas muitas horas de alegrias que tivemos juntos.

Aos colegas e amigos do LabSelen, em especial, Marcelo, Marcos, Alex, Scheide, que alegraram meu cotidiano no laboratório e me ajudaram de alguma forma, deixo meus sinceros agradecimentos.

A minha família e amigos, que mesmo distantes estiveram torcendo e me apoiando.

Agradeço o Prof.º Dr. Antonio Luiz Braga pela sua orientação e conhecimento transferido.

Agradeço ao Dr. Flávio Barbora por toda a paciência e orientação.

Aos funcionários da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, em especial Nico, Glauber, Eliane.

Aos pesquisadores do laboratório LABIOEX da professora Rozangela Pedrosa pela realização dos testes biológicos.

Ao CEBIME pela realização das análises de espectrometria de massas de alta resolução.

Aos órgãos de fomento, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro.

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*
(Albert Einstein)

RESUMO

As diidropirimidinonas (DHPM-Cl) e alguns derivados de bases nitrogenadas são classes de compostos que apresentam atividades biológicas como antitumoral, anti-alzheimer e antiviral. A hidridização dessas moléculas pode levar a compostos que atuem em diferentes aspectos de uma mesma doença. Com a finalidade de combinar possíveis atividades de ambas classes de compostos, foi sintetizada uma biblioteca de híbridos adenina-diidropirimidinonas. As DHPM-Cl foram preparadas por meio da reação de Biginelli e apresentam alta diversidade estrutural com rendimentos que variam de 66 a 88%. Na sequência, com as DHPM-Cl em mãos, otimizou-se uma metodologia para a preparação dos híbridos moleculares. A melhor condição experimental envolveu a mistura das DHPMs com a adenina à 100°C na presença de carbonato de sódio e dimetilformamida. A estratégia sintética utilizada permitiu a obtenção de híbridos DHPM-adenina com rendimentos moderados 12 a 30%, entretanto o consideramos satisfatórios devido à grande complexidade estrutural dos híbridos obtidos. Realizou-se estudos preliminares sobre sua atividade biológica dentre os híbridos avaliados, o composto mais citotóxico apresentou os valores de IC₅₀ de 88,23 µM para as células HepG2 e com valores de 162,0 µM para as células MCF-7. Os híbridos moleculares sintetizados são inéditos e apresentam características interessantes para o desenvolvimento de moléculas multi-alvo no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Reações multicomponente, Biginelli, diidropirimidinonas, hibridização molecular, adenina, anticâncer.

ABSTRACT

Dihydropyrimidinones (DHPMs) and some derivatives of nitrogen-containing bases are classes of compounds that have biological activities such as antitumor, anti-alzheimer and antiviral. Hybridization of these molecules can lead to compounds that act on different aspects of the same disease. In order to combine possible activities of both classes of compounds, a library of adenine-dihydropyrimidinones hybrids was synthesized. The DHPMs were prepared by the Biginelli reaction, with yields varying from 66 to 88% and show high structural diversity. With the obtainment of the DHPMs, a methodology for the preparation of the molecular hybrids was optimized. The best experimental condition involved mixing the DHPMs with the adenine dimethylformamide at 100 ° C in the presence of sodium carbonate. With the synthetic strategy used, it was possible to obtain DHPM-adenine hybrids with moderate yields, ranging from 12 to 30%, however it was considered satisfactory due to the great structural complexity of the obtained. Preliminary studies were performed on its biological activity among hybrids, the most cytotoxic compound showing IC₅₀ values of 88.23 μM for HepG2 cells and 162.0 μM for MCF-7 cells. Synthesized molecular hybrids are characteristics and the interesting features for the development of multi-target molecules in cancer treatment.

Key words: Multicomponent reactions, Biginelli, Dihydropyrimidinones, molecular hybridization, adenine, antitumoral.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura do Monastrol.....	34
Figura 2 Intermediários da reação de Biginelli proposto por Folkers e Johnson em 1933. ³⁷	34
Figura 3- Atividades biológicas das DHPM. ⁵	37
Figura 4 Exemplos de DHPM com atividades biológicas	38
Figura 5 DHPM quirais com atividades biológicas ⁵¹	38
Figura 6 Bases nitrogenadas ⁹	39
Figura 7 Exemplos de antimetabólitos.....	41
Figura 8 Estrutura do Ebselen e Donepezil.....	41
Figura 9 Híbrido molecular DHPM-adenina.....	43
Figura 10 Espectro de RMN de H ¹ da estrutura 7	46
Figura 11 Espectros de RMN de ¹³ C da estrutura 7	47
Figura 12 Variação estrutural dos híbridos DHPM-adenina.....	51
Figura 13 Espectro de RMN de ¹ H da estrutura de 16	52
Figura 14 Espectro de RMN de ¹³ C do híbrido molecular 16	53
Figura 15- Espectro de RMN de DEPT-135 do híbrido molecular 16	54
Figura 16 Estrutura da adenina.....	54
Figura 17 Estrutura com marcação do composto 16	55
Figura 18 . Principais correlações do HMBC do híbrido 16	55
Figura 19 Representação ORTEP do hídrido 16	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Variação estrutural das DHPM-Cl.....	45
Tabela 2- Otimização da quantidade de base	48
Tabela 3- Otimização das bases.....	49
Tabela 4- Otimização do solvente	50
Tabela 5 Otimização de outros parâmetros	51
Tabela 6 Deslocamentos químicos referentes ao composto 16	56
Tabela 7 Dados de coleta DRX-monocristal e parâmetros de refinamento para o composto 16	58
Tabela 8- Efeito citotóxico <i>in vitro</i> dos híbridos 14,16 e 17 contra as HepG2, McCoy e MCF-7.....	59

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Síntese dos híbridos moleculares DHPM-adenina	30
Esquema 2 – Exemplos de reações multicomponentes.....	32
Esquema 3 Reação de Biginelli. ³⁴	33
Esquema 4 Mecanismo para formação do produto de Biginelli via Imínio.....	35
Esquema 5 Mecanismo para formação do produto Biginelli via Knoevenagel.....	35
Esquema 6- Mecanismo para reação de Biginelli via Enamina	35
Esquema 7 Preparação dos híbridos moleculares.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IV	Infravermelho
P.F.	Ponto de fusão
CCD	Cromatografia em camada delgada
APPI	Fotoionização à pressão atmosférica - do inglês -“Atmospheric Pressure Protoionization”.
APCI	Ionização química à pressão atmosférica – do inglês -“Atmospheric Pressure Chemical Ionization”.
HRMS	Espectroscopia de massas de alta resolução – do inglês - “High Resolution Mass Spectrometry”.
RMN	Ressonância Magnética nuclear – do inglês -“ Nuclear Magnetic Ressonance”
HMBC	Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações – do inglês-”Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HSQC	Correlação Heteronuclear de Quantum- Simples – do inglês- “Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation”
NOESY	Nuclear Overhauser Spectroscopy
ROESY	Rotating-frame Overhauser Spectroscopy
DFT	Teoria do funcional da densidade – do inglês -“Density Functional Theory”
HIV	Vírus da imunodeficiência humana – do inglês -“Human Immunodeficiency vírus”
DNA	Ácido desoxirribonucleico - do inglês -“Deoxyribonucleic acid”
DHPM	Diidropirimidinona – do inglês – “Dihydropyrimidinone”
<i>J</i>	Constante de acoplamento
RNA	Ácido ribonucleico – do inglês “ribonucleic acid”
RMC	Reações Multi-componentes
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1	Reações multicomponentes.....	31
2.2	Reação de Biginelli	33
2.3	Mecanismo da reação de Biginelli	34
2.4	DHPM com atividades farmacológicas	37
2.5	Bases nitrogenadas	39
2.6	Atividade antitumoral de derivados de bases nitrogenadas	40
2.7	Hibridização molecular	41
3	OBJETIVOS.....	43
3.1	Objetivo geral.....	43
3.2	Objetivos específicos.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Síntese das DHPMS-Cl	44
4.2	Síntese dos híbridos moleculares	47
4.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS	48
4.3.1	Influência da quantidade de base	48
4.3.2	Influência da Base	49
4.3.3	Influência dos Solventes	49
4.3.4	Avaliação de outros parâmetros	50
4.4	Caracterização dos híbridos	51
4.5	Testes biológicos.....	59
5	EXPERIMENTAL	60
5.1	Materiais	60
5.2	Caracterização das DHPM-Cl.....	60
5.3	Caracterização dos híbridos moleculares	63
5.4	Métodos e instrumentação	65
5.5	Espectroscopia no infravermelho-IV.....	65
5.6	Ponto de fusão	65
5.7	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono – RMN de ^1H e ^{13}C	65
5.8	Espectroscopia de massas de alta resolução	66
5.9	MICRO-ONDAS.....	66
5.10	Difratometria de Raio-X.....	66
5.11	Avaliação biológica.....	66

5.11.1	Cultura de células.....	66
5.11.2	Avaliação da viabilidade celular	67
6	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.	68
7	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO –	75

1 INTRODUÇÃO

Uma das Reações Multi-Componentes mais importantes, a Reação de Biginelli, foi desenvolvida em 1891 por Pietro Biginelli e trata-se de uma reação de condensação entre um arilaldeído, um composto 1,3-dicarbonílico, e ureia, para formação de compostos da classe diidropirimidinona, (DHPM).^{1,2}

As DHPM apresentam grande relevância em termos biológicos, devido às suas diversas propriedades farmacológicas, como atividades antivirais e antibacteriana, moduladores de canais de cálcio, inibidores da cinesina mitótica, antagonista de receptores adrenérgicos,^{3,4} como exemplo de anticâncer dessa classe, tem-se o Monastrol.⁵

Atualmente, as principais limitações associadas a medicamentos são a rejeição pelo organismo e os efeitos colaterais. Com isso, vem-se aumentando os estudos relacionados com a obtenção de novos fármacos, buscando evitar possíveis danos ao organismo.^{4,5}

A hibridização molecular é definida como a junção de fragmentos bioativos em uma estrutura molecular química única. É uma importante ferramenta utilizada com a finalidade de alcançar um dos objetivos a seguir: sinergismo de ação farmacológica, terapia de dupla ação farmacológica ou modulação de efeitos secundários indesejáveis^{6,7}. Nesse contexto, utiliza-se essa ferramenta e espera-se que os produtos resultantes da hibridização possuam atividades biológicas das moléculas originais, além da possibilidade de um sinergismo entre ambas e também de atuar em outros sítios⁸.

O DNA e RNA são responsáveis por atividades como a síntese proteica, multiplicação e regeneração celular, além do mecanismo de transmissão das características hereditárias. Estas estruturas são constituídas por bases nitrogenadas, pentoses e fosfato.⁹

A síntese de análogos DHPM-bases nitrogenadas presentes no DNA e RNA tem a finalidade de biomimetizar as moléculas e explorá-las no metabolismo celular.^{10,11} Esses análogos são incorporados nas células por intermédio de transportadores específicos^{10,12}, as bases nitrogenadas que são metabolizadas em derivados di-trifosforilados dentro das células¹³, e podem ser incorporados no DNA e RNA inibindo a replicação de células, vírus e câncer, entre outras atuações no organismo.

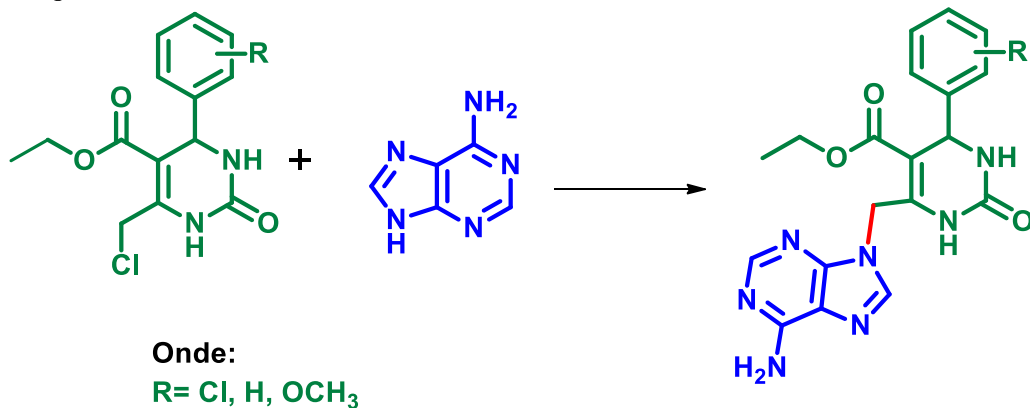
Desde a década de 80, estudos vem sendo realizados nesse sentido e alguns derivados de adenina, como a rabina e cladribina foram clinicamente testadas e se mostraram eficazes, entretanto mostraram certa toxicidade. Outro exemplo importante, foi a forodesina, que se mostrou ativa no combate da leucemia e linfomas.¹³ A forma de atuação desses análogos nucleosídeos deve ocorrer de forma secundária de modo a inibir o crescimento celular, além da

inibição de enzimas chaves na proliferação de vírus e tumores.¹⁰ Um outro exemplo é o caso da cordicepina, que possui atividade antitumoral. Essa molécula é incorporada em uma cadeia de RNAm causando o término na produção deste, que é responsável por transmitir a informação sobre como sintetizar a proteína ou age diretamente na produção dessa. Assim, impossibilita o crescimento descontrolado das células, e que também, as células se unam umas com às outras, levando a ruptura de células de câncer de mama.¹⁴

Tendo em vista os dados promissores em questão, vem crescendo os estudos relacionados a esses análogos, de forma a se tornarem cada vez mais eficazes, seletivos e menos tóxicos.¹³ Para a síntese de novos produtos muito estudos tem sido feito para encontrar condições ótimas reacionais, dentre outras modificações, tem-se como exemplo, a utilização de catalisadores, diferentes formas de aquecimento, e o uso de reagentes mais apropriados.^{15,3,16}

Sendo assim, com base nas informações supracitadas, planejou-se para esse trabalho de mestrado, a síntese de híbridos DHPMs-adenina (**Esquema 1**) visando a obtenção de moléculas híbridas com atividades antitumorais das DHPMs e as propriedades biológicas inerentes das bases nitrogenadas, no caso a adenina. Como será comentado nos objetivos, mais adiante, espera-se a obtenção híbridos moleculares para serem aplicados como antitumorais multi-alvo em sistemas biológicos.

Esquema 1 - Síntese dos híbridos moleculares DHPM-adenina



2 REVISÃO DA LITERATURA

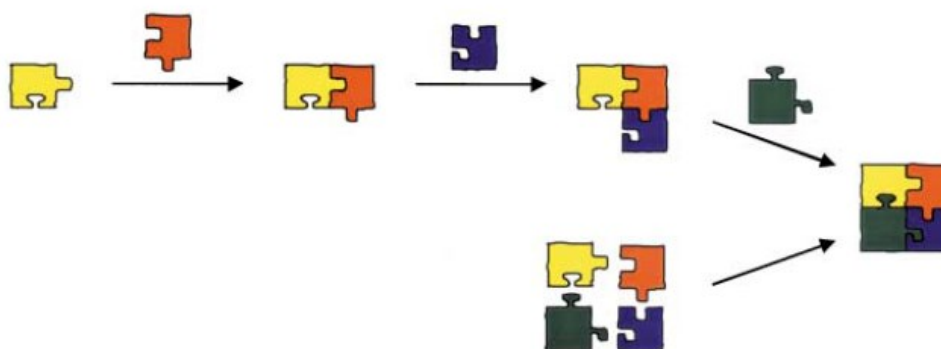
2.1 Reações multicomponentes

A síntese orgânica desempenha um importante papel em áreas como: química, farmácia, agricultura, energia sustentável e eletrônica¹⁷, tendo como objetivo a obtenção de compostos de forma mais simples, eficiente e econômica.¹⁸ Tendo isso em vista, atualmente, um dos principais desafios na síntese de moléculas complexas é o número de etapas necessárias, o que pode ocasionar ineficiência no processo, formação de subprodutos o que leva a problemas nas etapas de purificação, além da geração de resíduos tóxicos, e perda de rendimento.¹⁹

Nesse contexto, surgiu a necessidade do desenvolvimento de metodologias sintéticas, na qual se torne possível a formação de múltiplas ligações químicas em apenas uma única etapa reacional sendo capaz de funcionalizar os substratos, com a agilização do processo.²⁰ Uma importante classe de métodos sintéticos para esse propósito são as reações multicomponentes (RMCs).²⁰

Esses tipos de reações tiveram origem em meados do século XIX, entretanto obtiveram um crescimento exponencial nas últimas décadas alcançando destaque no âmbito metodológico para a química sintética. Esse destaque ocorre devido à eficiência na formação de várias ligações de modo sequencial, eficazmente utilizada para combinação de moléculas e ocorrer de forma sustentável, além de gerar uma economia atômica^{19,21}. Essas reações ocorrem onde três ou mais materiais de partida reagem para formar apenas um produto, em que o produto formado apresenta em sua estrutura grande parte dos átomos de partida envolvidos, como observado na **Esquema 2**²². Tendo em vista esses fatores, as RMC apresentam vantagens em relação à síntese convencional em múltiplas etapas.^{23,24}

Esquema 2 Sistema reacional de várias etapas vs. multicomponente.²⁵

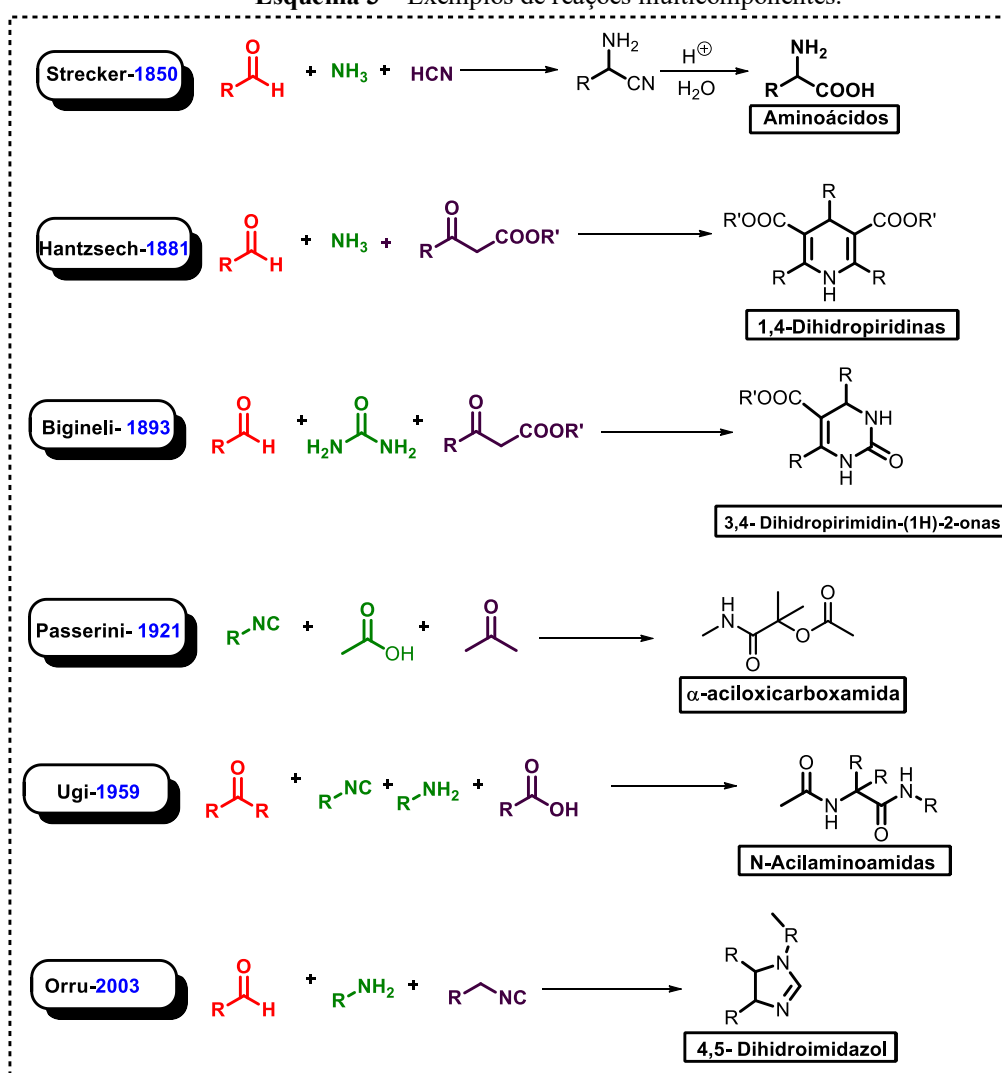


Fonte: BELLER, M.; et al; 2003

Essas RMC possuem fácil execução, são altamente seletivas, eficientes,^{26,27} além de serem consideradas ambientalmente amigáveis e versáteis, já que podem ser utilizadas com vários grupos funcionais, e, o mais importante, são realizadas por um processo *one pot*, o que diminui a probabilidade de perdas em processos de transferência.^{18,25,26} Pode-se considerar, também, que essa metodologia vai ao encontro de um conceito muito importante da Química verde a economia atômica, desenvolvido por Trost, em 1991.^{18,28}

Nesse contexto, vale ressaltar alguns exemplos de reações multicomponentes, tais como: Hantzsch,²⁹ Ugi,²⁹ Passerini,²⁶ Biginelli³⁰, Strecker³¹ e Orru^{27,32,33}, como mostrado no **Esquema 3**.

Esquema 3 – Exemplos de reações multicomponentes.

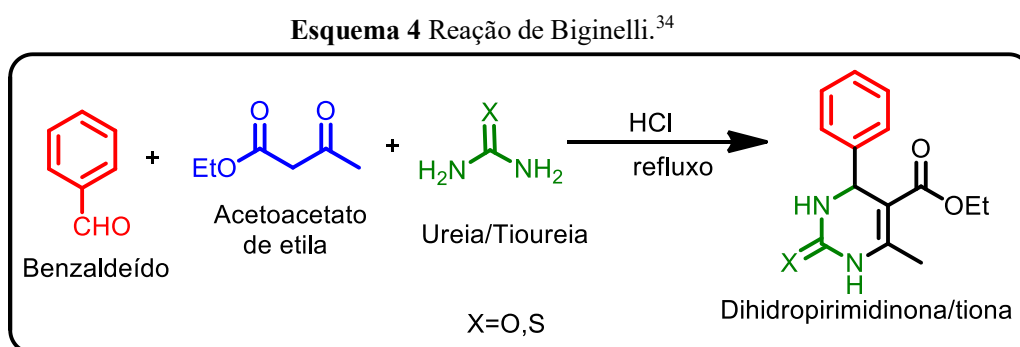


Com grande reconhecimento entre as RMCs, a reação de Biginelli possui uma característica muito interessante, a qual permite o emprego de substratos pré-funcionalizados.⁴ Ou seja, possibilita o emprego de diferentes compostos β -dicarbonílicos, vários tipos de

aldeídos alifáticos e aromáticos, além de derivados alquilados de ureia, ou tioureia, o que torna essa reação muito versátil.^{3,16}

2.2 Reação de Biginelli

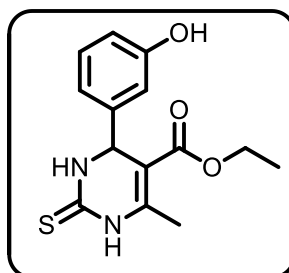
Em meados de 1891, Pietro Biginelli, iniciou seus estudos acerca de reações multicomponentes³⁰ envolvendo a condensação entre um benzaldeído, ureia e acetoacetato de etila, sendo utilizado HCl como catalisador em etanol sob refluxo, **Esquema 4**.^{34,35} Dessa forma, em 1893, deu-se início a síntese de 3,4- dihidropirimidin-(1*H*)-2-onas, (DHPMs).³⁶ Essa metodologia permaneceu inexplorada até os anos 1970, entretanto teve sua retomada com Folkers e Johnson, que realizaram alguns estudos mecanísticos acerca dessa metodologia. O aumento do interesse na reação de Biginelli foi devido às propriedades farmacológicas das DHPM.^{35,37}



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Os primeiros exemplos desta reação de ciclocondensação envolviam tipicamente β -cetoésteres, aldeídos aromáticos e ureia. Ao longo dos anos, o escopo da reação foi explorado ao se variar grande parte dos reagentes. Nos dias de hoje são descritos mecanismos de síntese desses compostos e diferentes metodologias, utilizando diversos catalisadores, uso de micro-ondas como fonte de aquecimento, entre outros parâmetros reacionais.^{2,38,39} Essas modificações têm como objetivo aumentar o rendimento e reduzir formação de subprodutos tóxicos visando contemplar os princípios da química verde.^{2,38}

Os heterociclos em questão possuem várias atividades biológicas comprovadas, tal como anticâncer. Podemos citar com exemplo de DHPM, o monastrol, **Figura 1**, que vem sendo amplamente estudado e, deste modo, mostra a importância da realização de pesquisas envolvendo a síntese e modificação estrutural desses compostos.^{19,40}

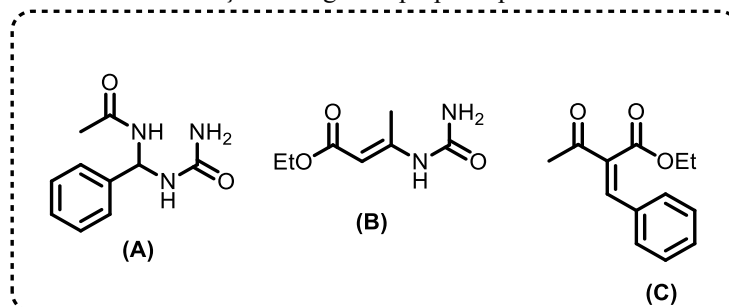
Figura 1 Estrutura do Monastrol

Fonte: Elaborada pela autora (2019)

2.3 Mecanismo da reação de Biginelli

Como mencionando anteriormente, tem havido um aumento significativo em relação ao interesse sobre as reações de Biginelli,^{2,38} devido a descoberta de várias atividades biológicas referentes a essa estrutura. Em consequência, novas metodologias e propostas sintéticas vem sendo testadas sobre as condições reacionais já conhecidas. Com esses novos estudos surgiram algumas propostas mecanísticas afim de se entender as interações que aconteciam entre os diferentes componentes reacionais de partida.^{30,37} Atualmente, as propostas mais aceitas são conhecidas pelas características dos seus intermediários: mecanismo via imínio, **Esquema 5**; mecanismo via Knoevenagel, **Esquema 6**, e mecanismo via enamina, **Esquema 7**.

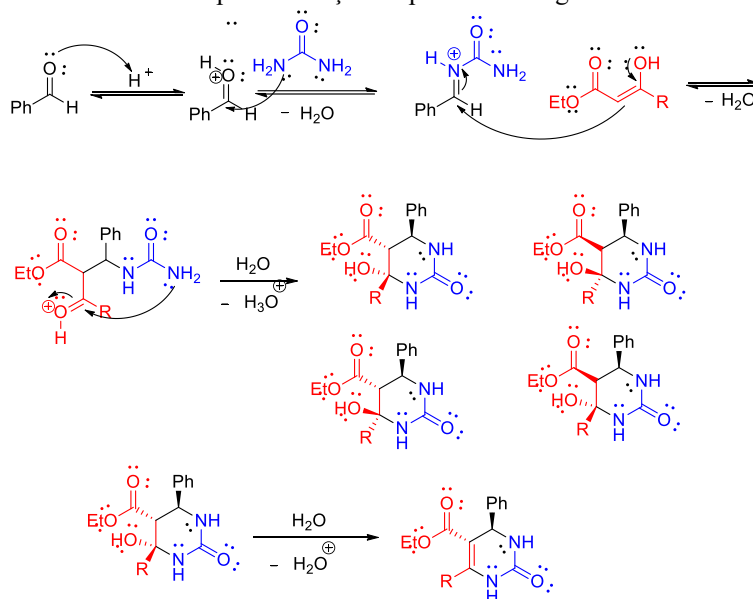
A primeira tentativa a fim de se elucidar o mecanismo da reação de Biginelli foi realizada na década de 90. Folkers e Johnson propuseram a formação de 3 possíveis intermediários, porém acreditavam que um intermediário **(A)** tinha preferência em relação em relação aos demais (**Figura 2**). Nesta Figura está apresentada as estruturas dos intermediários sugeridos, sendo ela resultante da condensação intramolecular entre uma molécula de benzaldeído com duas moléculas de ureia; o intermediário **(B)** seria formado pela condensação do acetoacetato de etila com a ureia, e o intermediário **(C)** obtido pela condensação da benzaldeído com o acetoacetato de etila.^{37,41,42}

Figura 2 Intermediários da reação de Biginelli proposto por Folkers e Johnson em 1933.³⁷

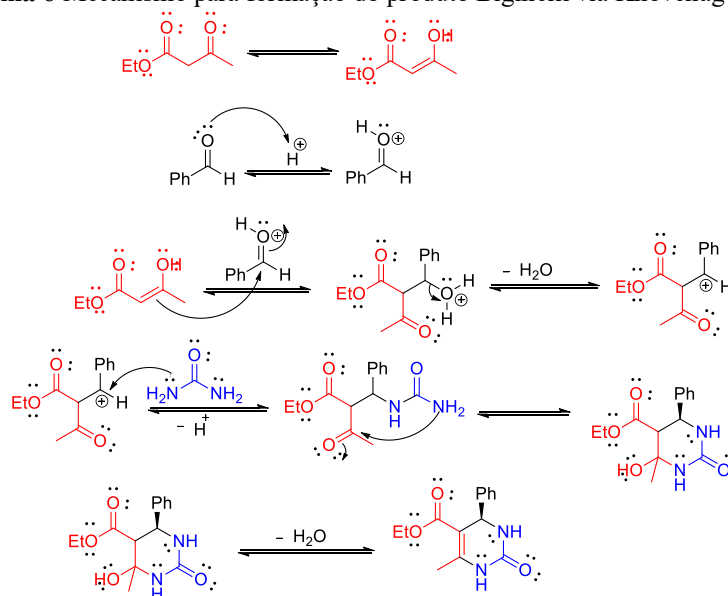
Fonte: Adaptado de (FOLKERS 1933)

Posteriormente, em 1997, Kappe, retomou os estudos sobre os três mecanismos propostos utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , empregando solvente metanol deuterado (CD_3OH) em condições ácidas. Foram realizadas três diferentes combinações de reagentes sendo elas: acetoacetato de etila/ureia, ureia/aldeído e aldeído/acetoacetato de etila, em temperatura ambiente. Ao observar a reação entre benzaldeído e ureia não foi possível detectar reação nem a formação do intermediário (**C**); na reação entre ureia e acetoacetato observou-se a formação do intermediário (**B**), entretanto, o composto foi hidrolisado fazendo com que o equilíbrio se deslocasse para a formação dos reagentes.^{41,42}

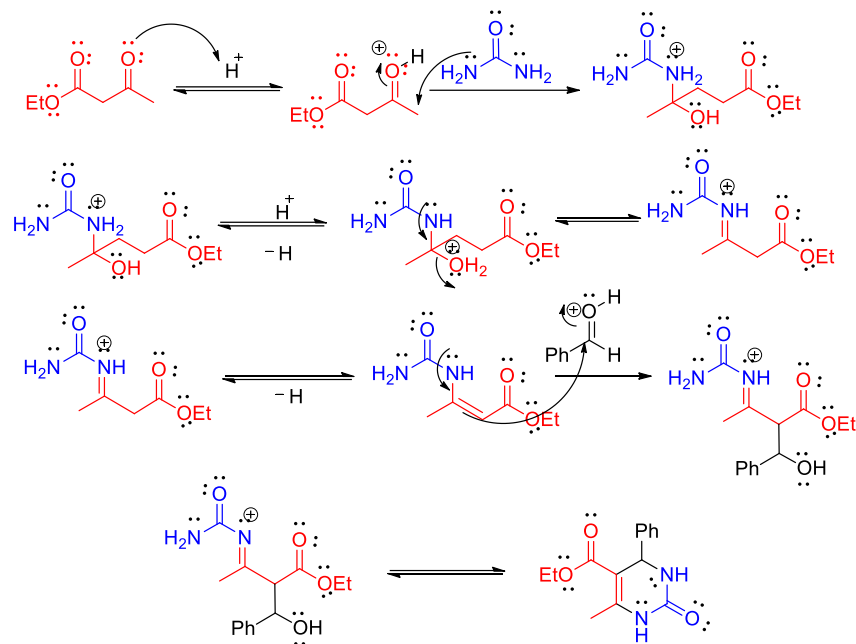
Esquema 5 Mecanismo para formação do produto de Biginelli via imínio



Esquema 6 Mecanismo para formação do produto Biginelli via Knoevenagel



Esquema 7- Mecanismo para reação de Biginelli via Enamina



Ao analisar a reação entre ureia e o benzaldeído constatou-se a precipitação do intermediário (A), após uns 20 min de reação; caso utilizasse acetoacetato de etila ocorria a formação do produto DHPM, após um período entre 1-2 horas de reação. De posse desses resultados o autor concluiu que a primeira etapa consiste na adição da ureia ao aldeído, sendo esta a etapa lenta da reação, além de que tanto a desidratação quanto a adição da ureia são etapas rápidas e não foi possível detectar um intermediário nesse processo.⁴¹

Em 2009, a reação de Biginelli foi estudada novamente com o monitoramento por meio de técnicas espectrométricas- espectrometria de massas com ionização por *electrospray*, ESI-MS- e estudos teóricos por meio da Teoria do Funcional de Densidade – DFT-*density functional theory* – realizando uma análise detalhada dos mecanismos propostos anteriormente.³⁹ Por meio dessas técnicas foi possível averiguar a formação de intermediários iônicos ou ionizados diretamente do meio reacional.

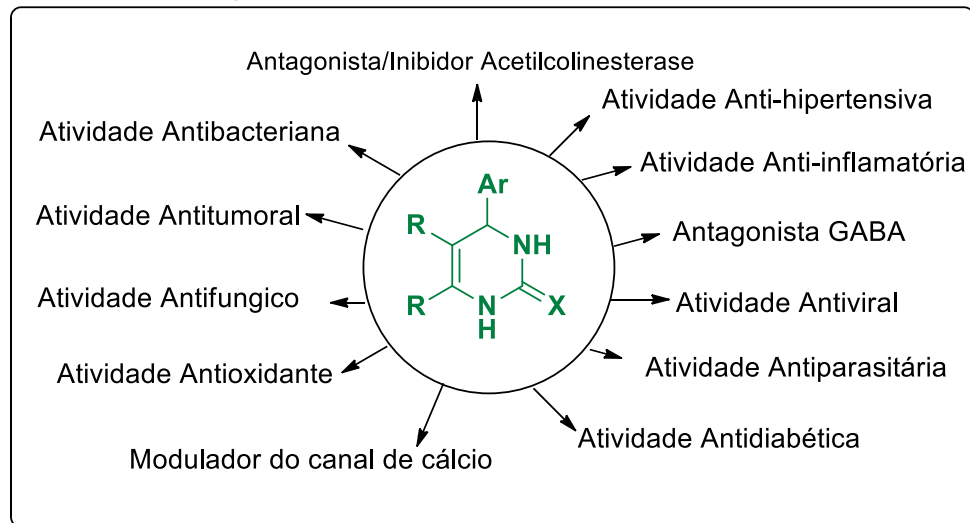
Inicialmente, ao se analisar o mecanismo de Knoevenagel (**Esquema 6**) a formação do intermediário referente a reação entre benzaldeído e acetato de etila só foi observado após 24 horas de reação, o que se torna incoerente com o tempo reacional médio da reação de Biginelli de 2 horas. Por outro lado, ao se colocar em teste o mecanismo via enamina (**Esquema 7**), não foi detectado a sua forma protonada. Essa ausência foi justificada pelo seu pequeno tempo de existência desse íon no meio reacional. Ao realizar a reação entre apenas ureia e o benzaldeído notou-se a formação de intermediários semelhantes aos formado quando é adicionado os três reagentes, dessa maneira, pode-se constatar a predominância do mecanismo via imínio.^{39,41}

Foi possível concluir a partir dos estudos teóricos de DFT que os resultados experimentais estavam coerentes com os teóricos e demonstraram que o mecanismo de Knoevenaegel apresentou uma elevada barreira de ativação. Ao se considerar via íon imínio (**Esquema 5**), este é cineticamente favorável, e com isso, o produto cinético é o formado. Assim, tanto quanto Kappe, que realizou seus estudos envolvendo RMN, quanto pelas novas pesquisas por De Souza em 2009 por ESI-MS, ambos concluíram que o mecanismo via imínio é o mais plausível de ocorrer dentre os sugeridos.^{39,41}

2.4 DHPM com atividades farmacológicas

Como comentado anteriormente, a descoberta das propriedades farmacológicas das DHPM levou a um grande interesse por esses compostos. Essa classe de moléculas apresenta diversas atividades biológicas, como mostrado na **Figura 3**.^{4-6,43,44}

Figura 3- Atividades biológicas das DHPM.⁵

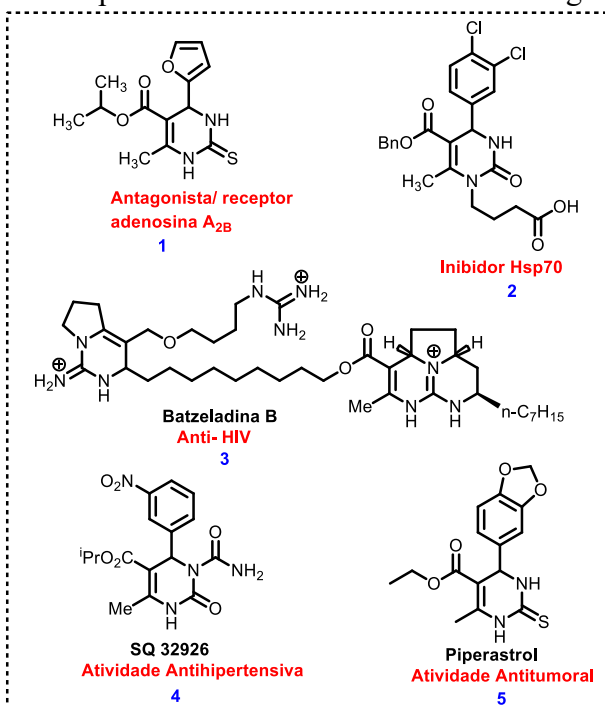


Fonte: (MATOS 2018)

Uma das propriedades de grande importância é a inibição da proteína quinase Eg5, que está associada ao tratamento do câncer. Uma vantagem na utilização de inibidores específicos para essa proteína vem do fato que este não resultará em efeitos neurotóxicos.^{45,46}

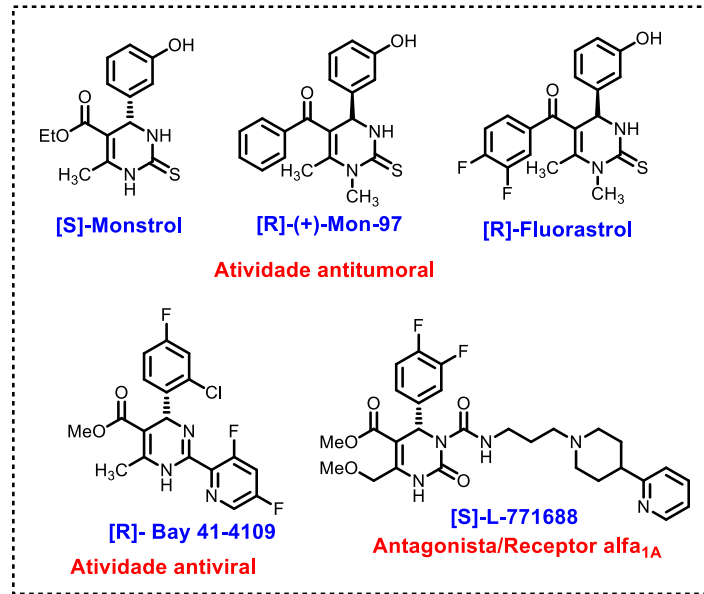
Como exemplo, alguns compostos já conhecidos por suas atividades biológicas são mostrados na **Figura 4**. Pode-se citar a atividade anti-hipertensiva do composto SQ 32928, representado pela estrutura **3**.⁴⁷ Outros compostos como os representados pelas estrutura **5** e **1** apresentam atividade a inibição da Hsp 70⁴⁸, e podem agir como antagonista/receptor adenosina A_{2B}.⁴⁹

Figura 4 Exemplos de DHPM com atividades biológicas



Pode-se citar compostos isolados de espécies de esponjas marinhas, como a Batzeladina B (estrutura **3**), que foi relatada como um dos primeiros produtos naturais de baixa massa molecular capaz de inibir a ligação do vírus do HIV gp-120 a células CD4⁵⁰. Em meados de 2006, Russowsky e colaboradores realizaram a síntese de análogos do monastrol, que mostraram ser agente antitumorais potentes contra diversas linhagens de células tumorais, sendo elas as de mama, rim, cólon, melanoma e ovário, uma das estruturas o piperastrol representado pela estrutura **5**.

Figura 5 DHPM quirais com atividades biológicas ⁵¹



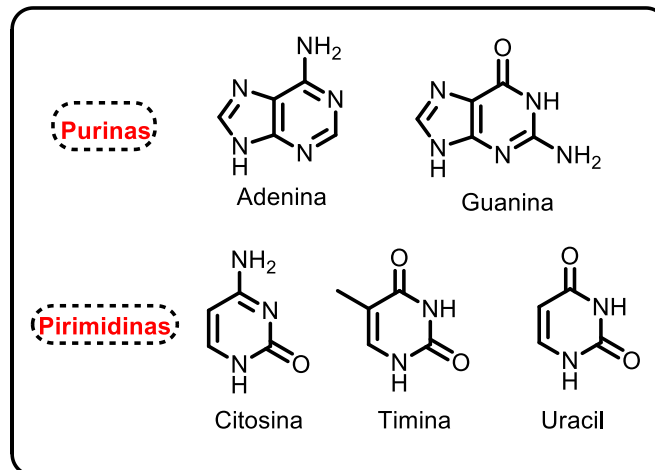
Fonte: (NAGARAJAIAH, 2016)

É interessante ressaltar que as DHPM são geralmente obtidas em misturas racêmicas, entretanto, as atividades biológicas desses enantiômeros, como visto na **Figura 5** podem se diferenciar, de modo que, em alguns casos podem ser opostas. Dessa maneira, alguns pesquisadores têm utilizado diferentes maneiras de separação desses enantiômeros, como exemplo, com utilização de uma coluna quiral, ou técnica de cristalização fracionada.⁵¹

2.5 Bases nitrogenadas

Nucleotídeos são unidades básicas dos ácidos nucleicos, que são constituídos por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato. Estas bases nitrogenadas podem ser classificadas como púricas (adenina e guanina) ou pirimídicas (timina, citosina e uracila), conforme **Figura 6**.^{52,53}

Figura 6 Bases nitrogenadas⁹



Fonte: Adaptado de NELSON, 2008.

Devido ao fato de ocorrerem na natureza como componentes de ácidos nucleicos (DNA e RNA), as pirimidinas e purinas têm ganhado bastante destaque na área científica ^{54,55}.

O termo nucleosídeo é utilizado quando existe apenas uma base nitrogenada ligada a uma pentose de forma covalente, além de um fosfato. Semelhante a ele temos os chamados nucleosídeo análogo, onde as modificações podem ser realizadas nos sítios ativos. Estes compostos merecem uma atenção especial, tendo em vista que constituem um dos mais potentes antivirais já sintetizados. ⁵⁴

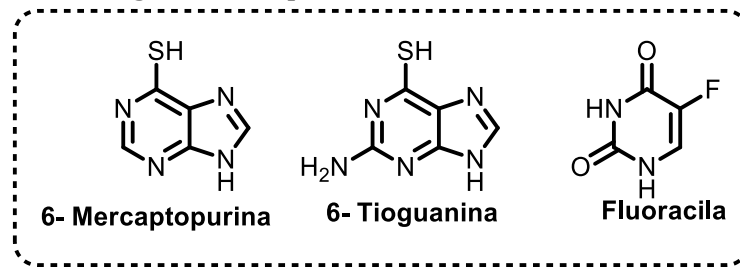
Em muitos processos biológicos básicos estão envolvidos os nucleosídeos. Logo, análogos sintéticos apresentam com frequência atividade biológica com grande valor farmacêutico por serem potenciais agentes antivirais, antitumorais, anti-leishmaniose, bactericida e anti-protozoários. ⁵⁶

2.6 Atividade antitumoral de derivados de bases nitrogenadas

Considerada a terceira principal causa de morte no mundo, o câncer, pode ser causado por diferentes fatores sendo que estes provêm de fatores internos, externos ou podem agir de forma inter-relacionadas ⁵⁴. Os fatores internos são inerentes ao organismo e podem se manifestar das seguintes maneiras: mutações genéticas hereditárias, alterações hormonais, e em diferentes formas imunológicas ⁵⁴.

O desenvolvimento do câncer, geralmente, ocorre de forma lenta e gradual, podendo levar anos para que a célula cancerosa origine um tumor detectável. ⁵⁴ O câncer pode ser tratado através de cirurgias, radioterapia e quimioterapia. ⁵⁷ O tratamento mais utilizado para a doença é, na maioria das vezes, a interferência em etapas-chaves para a sobrevivência celular, como exemplo, a síntese ou replicação do DNA, RNA ou proteínas. ⁵⁸ Desta maneira, várias são as classes de fármacos para o tratamento, como agentes alquilantes, antibióticos, antimetabólitos, hormônios, e inibidores de mitose. ⁵⁹

Ainda não foi descoberto alguma propriedade bioquímica comum aos diferentes tipos de células cancerosas, entretanto elas possuem inúmeras diferenças metabólicas comparadas com as células normais, tornando-as mais vulneráveis aos antimetabólitos ou análogos estruturais das bases nitrogenadas. ⁶⁰ Esses agentes antimetabólitos (**Figura 7**) agem de forma a bloquear bioquimicamente a síntese do DNA, o que leva a serem utilizados no tratamento clínico do câncer. ¹⁶

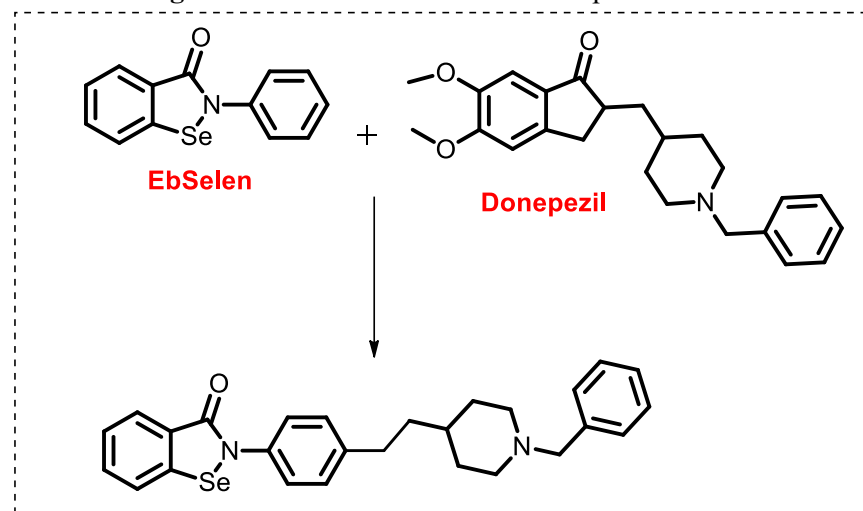
Figura 7 Exemplos de antimetabólitos

Fonte: Adaptado de KURZAWSKI, 2014.

2.7 Hibridização molecular

Hibridização molecular pode ser definida como uma estratégia sintética de aglomeração de dois ou mais derivados bioativos para gerar um híbrido molecular. Na maioria das vezes, esses híbridos podem ser caracterizados por atuarem de forma multifuncionais no organismo.^{61,62} Há híbridos moleculares que foram concebidos pela utilização esta estratégia sintética, como exemplo, o Ebselen⁶³ e o Donepezil, como mostrado na **Figura 8**. Esse híbrido molecular Ebselen-Donepezil vem sendo utilizado para o tratamento de doença de Alzheimer

.40

Figura 8 Estrutura do Ebselen e Donepezil

Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Essa estratégia sintética é utilizada com o intuito de interagir em diferentes alvos e expandir seus efeitos através da ação em outro alvo. Podem agir, também, de forma que o híbrido resultante venha inibir algum efeito colateral, ou de maneira a minimizá-los, além de diminuir a possibilidade de resistência ao medicamento.^{61,62}

A eficácia dessas drogas multi-alvo são de extrema importância quando se trata de doenças que possuem vários fatores patogênicos, como doenças neurodegenerativas,

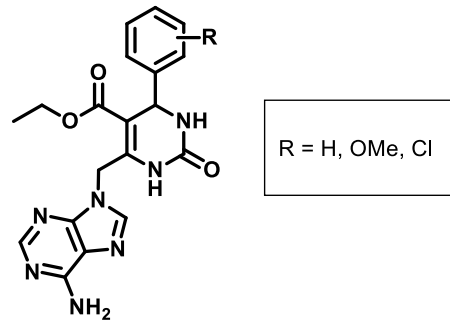
cardiovasculares, câncer, onde são necessários coquetéis de medicamentos para que a doença seja curada. Devido aos fatores supracitados a otimização do processo de tratamento dessas doenças e a possibilidade de maior eficiência na cura seria de grande valia. ⁶²

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho é o planejamento, síntese e caracterização de uma série de híbridos DHPM- adenina, **Figura 9**, para serem submetidos à testes biológicos visando a avaliação de sua atividade antitumoral.

Figura 9 Híbrido molecular DHPM-adenina



Fonte: Elaborada pela autora (2019)

3.2 Objetivos específicos

- (i) Sintetizar uma série de DHPM-Cl.
- (ii) Planejar e desenvolver uma metodologia sintética para a obtenção de DHPMs funcionalizadas com adenina.
- (iii) Investigar os parâmetros reacionais adequados.
- (iv) Caracterizar os compostos sintetizados por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , HRMS, IV, entre outras técnicas.
- (v) Submeter os compostos híbridos à testes antitumorais.
- (vi) Apresentar o trabalho em congressos e reuniões da área.
- (vii) Publicar o trabalho em periódicos reconhecidos na comunidades científicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia utilizada envolveu inicialmente a síntese das DHPM-Cl para posterior obtenção dos híbridos DHPM-adenina. Os procedimentos experimentais, assim como os detalhes do desenvolvimento dessa abordagem sintética estão descritos a seguir.

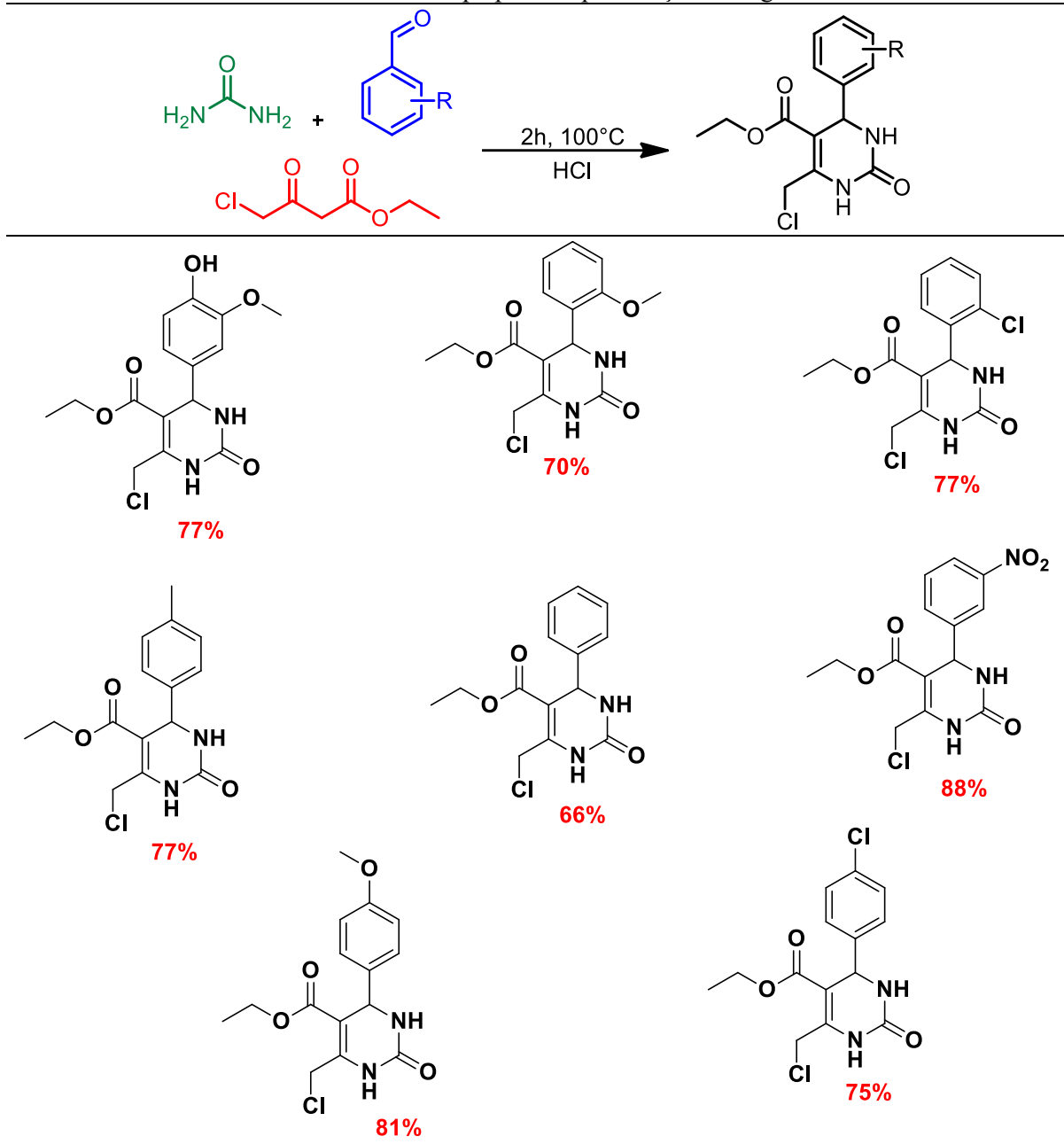
4.1 Síntese das DHPM-Cl

As 6- cloro-diidropirimidinas foram sintetizadas conforme procedimento descrito na literatura ⁶⁴, por meio da reação de Biginelli., conforme mostrado no (**Esquema 7**)

A síntese das DHPM-Cl foi realizada utilizando um balão de duas bocas, o aldeído aromático (15 mmol), 4-cloro-acetoacetato de etila (1,35 mL), ureia (720 mg) e 3 gotas de ácido clorídrico concentrado. A reação foi mantida sob agitação, em um banho de óleo a 100°C por um período de 2 horas. O término da reação foi monitorado por CCD utilizando como eluente acetato de etila. A mistura reacional foi adicionada em um béquer contendo gelo triturado e água destilada. Observou-se a formação de um sólido. O precipitado formado foi então filtrado à vácuo e lavado com porções de água gelada. Na sequência, o sólido obtido foi seco ao ar.

As moléculas de DHPM-Cl puderam ser obtidas através da reação de Biginelli, tanto com aldeídos possuindo grupos retiradores ou doadores de elétrons. Obtiveram-se 8 derivados de DHPM-Cl com boa diversidade estrutural, com rendimentos bons, que variaram de 66 a 88% (**Tabela 1**). Todas essas DHPM-Cl foram analisadas em relação à sua pureza por CCD, tendo em vista ao alto grau de pureza em que se apresentaram e foram utilizadas dessa forma em reações subsequentes. No entanto, todas elas foram caracterizadas através de espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C, sendo que as substâncias inéditas foram caracterizadas também com espectroscopia de massas de alta resolução e infravermelho.

Tabela 1 DHPM-Cl preparadas pela reação de Biginelli



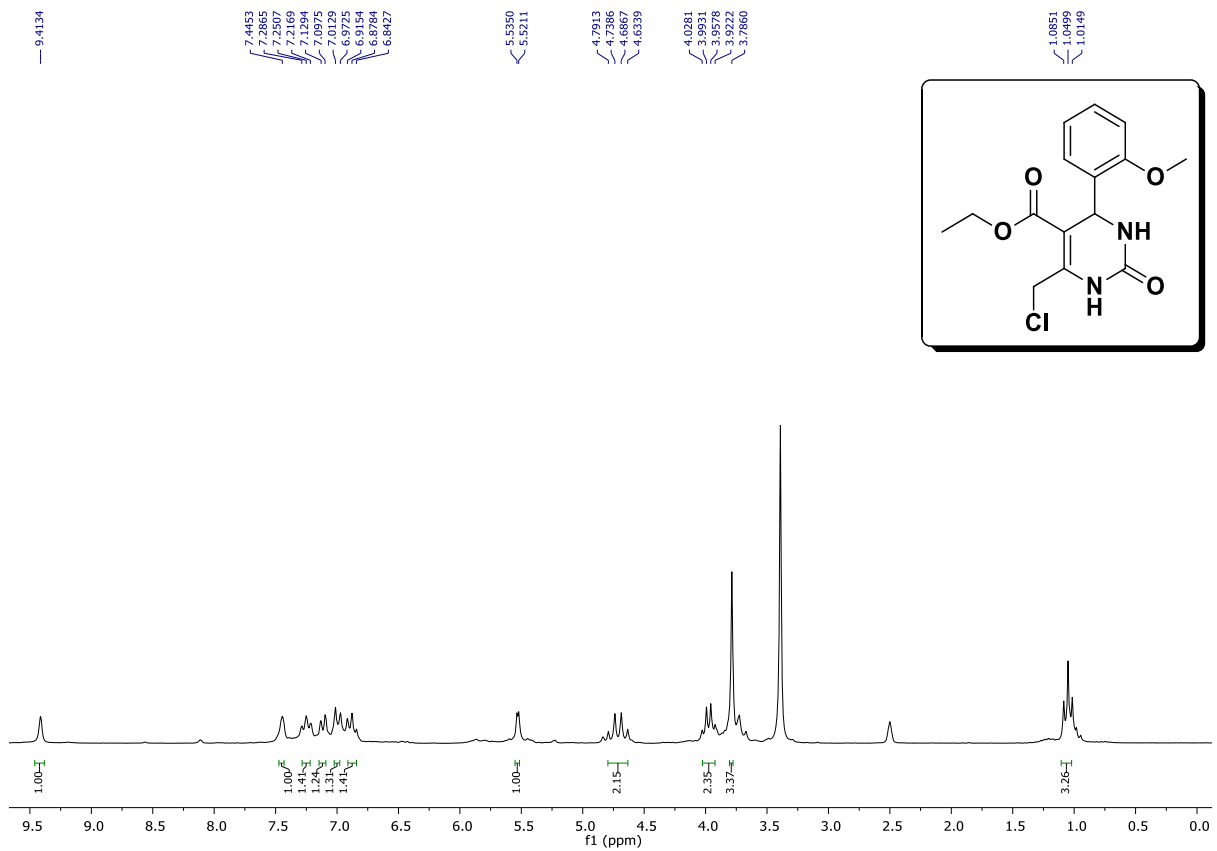
Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Na caracterização espectroscópica, através das análises de RMN unidimensional, o composto DHPM-Cl 7 foi escolhido como representante desta classe. A **Figura 10** apresenta o espectro de RMN de ^1H , obtido na frequência de 200 MHz, utilizando-se $\text{DMSO}-d_6$ como solvente e TMS como padrão interno, sendo os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais δ (ppm).

No espectro é possível observar os sinais referentes à porção éster com um tripleto centrado em δ 0,75 ppm (3H, t, $J = 7,0$ Hz,) e um quarteto em 5,39 ppm (2H, q, $J = 11,5$ Hz). Também é possível verificar um sinal característico de grupo metóxi, com um simpleto em δ

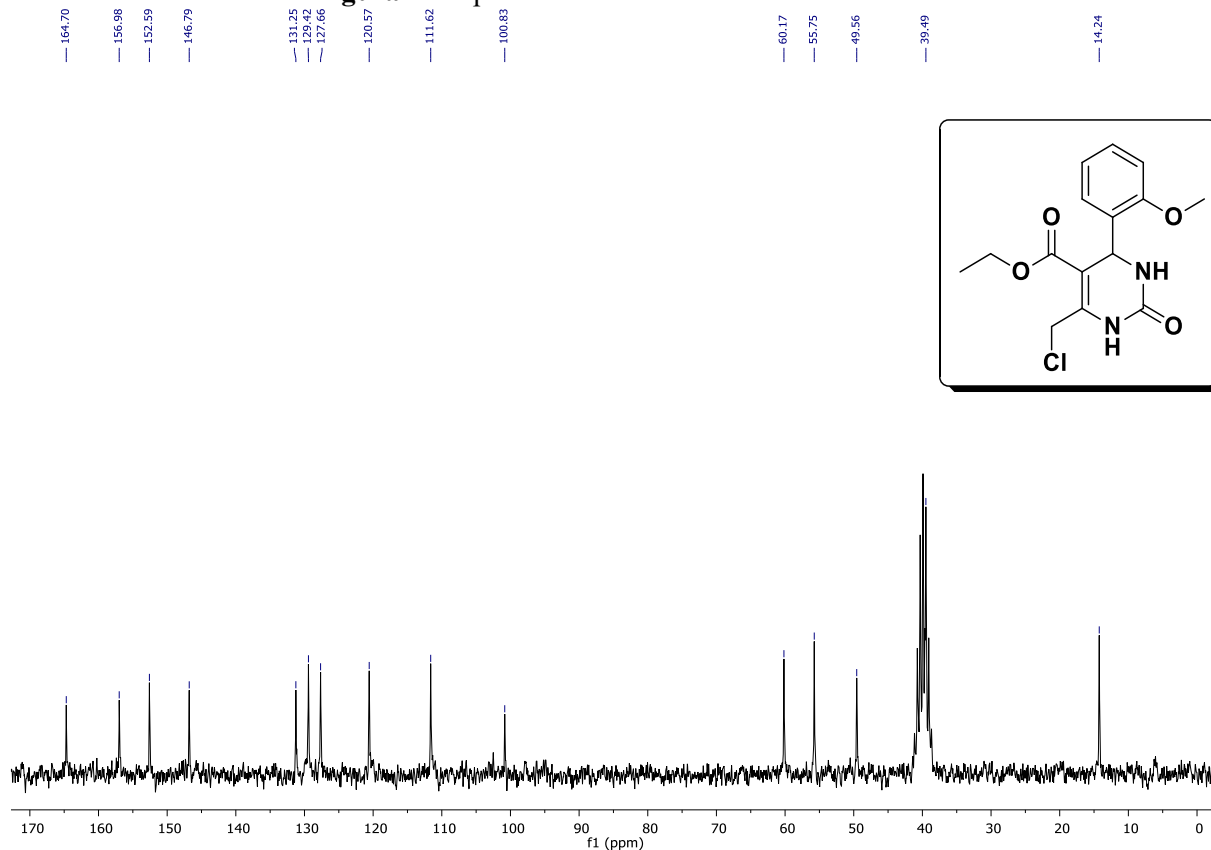
3,71 ppm (3H, s); já em δ 5,53 ppm (1H, d, $J = 3,02$ Hz, H-16) um sinal com multiplicidade para duplete referente ao CH do centro estereogênico. Na região entre δ 6,58-7,16 ppm observam-se quatro sinais com integrais para 4H referentes aos hidrogênios aromáticos, com acoplamentos *orto-orto* e *orto-meta* relacionados, definidos através de duplo dupletos, a exemplo de δ 7,18 ppm (dd, $J = 7,5$ e 1,5 Hz, 1H). Em δ 7,16 e δ 9,13 ppm observam-se a presença de dois simpletos, ambos com integral para 1H, referentes aos hidrogênios N-H do núcleo DHPM.

Figura 10 Espectro de RMN de H^1 da estrutura 7



Através dos espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 11**) foi possível observar sinais para 15 átomos de carbono sendo: um sp^3 metílico (δ_C 14,2 ppm), que pode ser atribuído à metila do éster etílico; um sp^3 metilênico (δ_C 42,7 ppm) referente ao CH_2 ligado ao Cloro; um sp^3 metínico (δ_C 49,56 ppm), referente ao C-H do centro estereogênico; um sp^3 metílico oxigenado (δ_C 55,7 ppm), referente ao grupo metóxi; um sp^3 metilênico oxigenado (δ_C 60,17 ppm) correspondente ao CH_2 do éster etílico; cinco sp^2 metínicos (δ_C 129,4; 127,6; 120,6; 111,6; 100,8; ppm); três quaternários (δ_C 131,3, 146,8 e 152,6 ppm) e dois carbonílicos (δ_C 156,9 e 164,7 ppm).

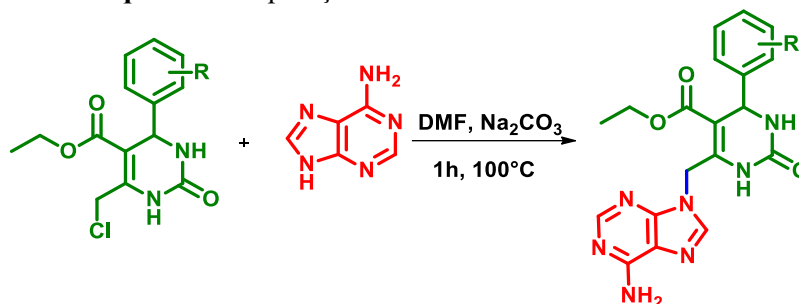
Figura 11 Espectros de RMN de ^{13}C da estrutura 7



4.2 Síntese dos híbridos moleculares

A síntese dos híbridos DHPM-adenina foi realizada segundo metodologia descrita por Petrov e colaboradores, com adaptações⁶⁵, conforme o **Esquema 8**.

Esquema 8 Preparação dos híbridos moleculares



Fonte: Elaborada pela autora (2019)

A síntese dos híbridos DHPM-adenina foi realizada utilizando um balão de uma boca, onde adicionou-se a DHPM-Cl (2 mmol), adenina (270 mg), carbonato de sódio (420 mg), e DMF (5mL). A reação foi mantida sob agitação durante uma hora, em um banho de óleo pré-aquecido a 100 °C. O término da reação foi monitorado via CCD, em seguida a mistura reacional foi dissolvida em aproximadamente 10 mL de acetato de etila e transferida para um

funil de separação. Extraiu-se o produto com aproximadamente 30 mL de água por 5 vezes, e posterior uma lavagem com aproximadamente 30 mL solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio anidro, e concentrada em um rotaevaporador rotativo a pressão reduzida. Os produtos foram isolados por diferença de solubilidade, onde foi adicionado diclorometano e hexano, ocorrendo a precipitação do produto, e posterior filtração à vácuo do mesmo, obtendo o produto.

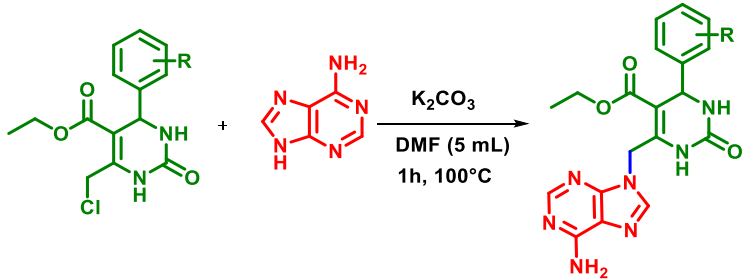
Para investigar as melhores condições reacionais utilizou-se como substrato modelo o híbrido DHPM-(2-OMe) e adenina. Modificaram-se algumas variáveis, tais como: base, quantidade de base, o tempo reacional, o catalisador, solvente; além de formas alternativas de aquecimento tais como o micro-ondas e sonda de ultrassom.

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS

4.3.1 Influência da quantidade de base

Iniciou-se o processo de otimização em busca da quantidade adequada de base para o sistema reacional. Tendo em vista algumas reações similares descritas na literatura^{65,66}, optou-se inicialmente pela escolha de K_2CO_3 como base e temperatura de 100 °C. Na **Tabela 2**, encontram-se os resultados desta otimização preliminar, e observa-se que a melhor condição reacional obtida são as usadas na **Entrada 1**, caracterizada pela utilização de 2 equivalentes da base. Na condição reacional da **Entrada 2**, não foi realizado a adição da base, onde não foi observado a formação de produto. Na terceira entrada a base foi usada em quantidade equimolar, e observou se a formação do produto, porém com rendimento de apenas 5%.

Tabela 2- Otimização da quantidade de base



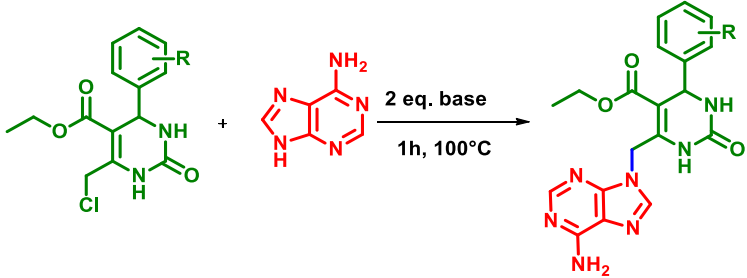
Entrada	Base	Tempo (h)	Rendimento ^b (%)
1	K_2CO_3	1	30
2	K_2CO_3	2	-
3	$K_2CO_3^c$	1	5

Condições reacionais: ^b Rendimento isolado. ^c 1 equivalente de base

4.3.2 Influência da Base

Tendo em vista os resultados supracitados, seguiu-se com a utilização de diferentes tipos de bases: sendo orgânicas e inorgânicas. Os resultados podem ser vistos na **Tabela 3**. Considerando-se a similaridade nos rendimentos obtidos para o produto empregando-se Na_2CO_3 , K_2CO_3 e KOH , optou-se pela base Na_2CO_3 para dar continuidade ao processo de otimização da metodologia, tendo em vista menor custo e a facilidade de manuseio. Ao utilizar bases orgânicas fracas como Et_3N , não foi possível observar a formação do produto. Com a finalidade de observar se a reação só ocorre aquecimento, foi realizado um teste em temperatura ambiente, entretanto o rendimento não foi satisfatório, com isso optou-se em manter o aquecimento por uma hora.

Tabela 3- Otimização das bases

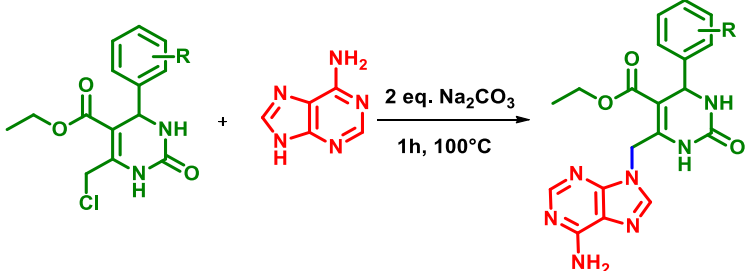


Entrada	Base	Rendimento ^b (%)
1	Na_2CO_3	30
2	KOH	21
3	Et_3N	-
4	Cs_2CO_3	15
5	Na_2CO_3^c	20 ^c
6	NaH	12
7	K_2CO_3	30

Condições reacionais: solvente DMF 5 mL^b Rendimento isolado. ^c Temperatura ambiente (25°C).

4.3.3 Influência dos Solventes

Em seguida, avaliou-se a influência do solvente na reação e os resultados podem ser vistos na **Tabela 4**. Haja vista que todos os reagentes são sólidos optou-se por usar 5 mL do solvente para que fosse possível a solubilização de todos eles. Analisando todos os solventes testados, foi possível observar que ao utilizar DMF, o produto foi obtido com maior rendimento. É interessante ressaltar que a adenina não é solúvel em água, o que pode ter implicado na não obtenção do produto. Foram testados solventes considerados mais verdes tais como etilenoglicol e glicerol, mas estes não foram eficientes em promover a formação do produto desejado, sendo que os rendimentos obtidos foram 20% e 3%, respectivamente.

Tabela 4- Otimização do solvente


Entrada	Solvente	Rendimento ^b (%)
1	DMSO	18
2	Etanol	11
3	Glicerol	3
4	Etilenoglicol	20
5	H ₂ O	-
6	PEG 400	6
7	Lactato de Etila	5
8	DMF	30

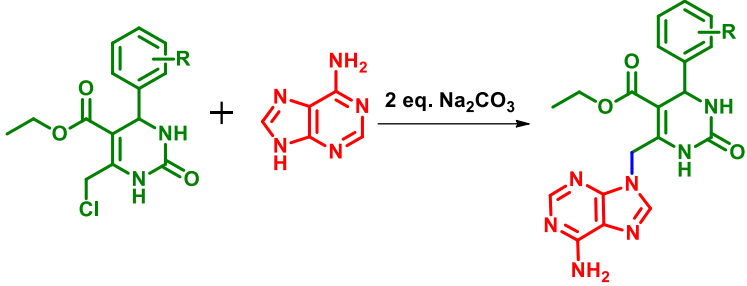
Condições reacionais: solvente 5 mL ^b Rendimento isolado.

4.3.4 Avaliação de outros parâmetros

De modo a avaliar outras variáveis, testaram-se metodologias de síntese alternativas como micro-ondas conforme **Entradas 1 e 2**, no entanto, os rendimentos obtidos foram de 11% e 12%, respectivamente, reportados na **Tabela 5**, sendo assim descartou-se o uso de micro-ondas.

Além disso, testou-se a utilização de catalisadores como iodeto de potássio e iodeto de cobre observando uma redução significativa no rendimento reacional, reportados nas **Entradas 4 e 5** com os rendimentos de 6% e 12%, respectivamente.

Finalmente, fez se uso de uma sonda de ultrassom, também não resultou em uma influência positiva no acréscimo de rendimento. Com isso, as condições reacionais já pré-definidas foram mantidas, que estão descritas na **Entrada 1** da **Tabela 2**, com 30% de rendimento.

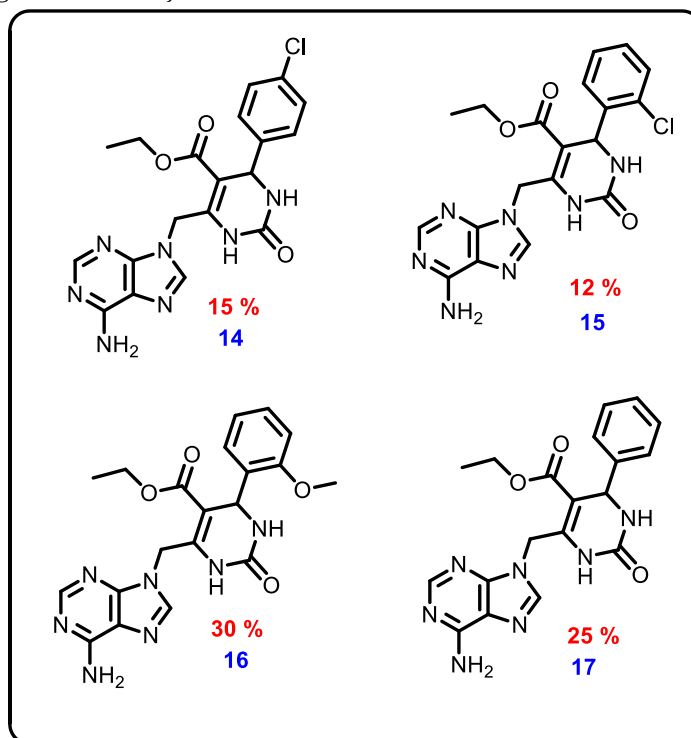
Tabela 5 Otimização de outros parâmetros


Entrada	Base	Temperatura °C	Rendimento nto	
1	5 min/100W	Na ₂ CO ₃	-	11
2	10 min/100W	Na ₂ CO ₃	-	12
3	ultrassom	Na ₂ CO ₃	-	10
4	CuI (20 %)	Na ₂ CO ₃	100	6
5	KI 20%	Na ₂ CO ₃	100	12

Condições reacionais: solvente DMF 5 mL ^b Rendimento isolado.

4.4 Caracterização dos híbridos

Em busca de uma variação estrutural dos híbridos foram sintetizadas as moléculas mostrados na **Figura 12**.

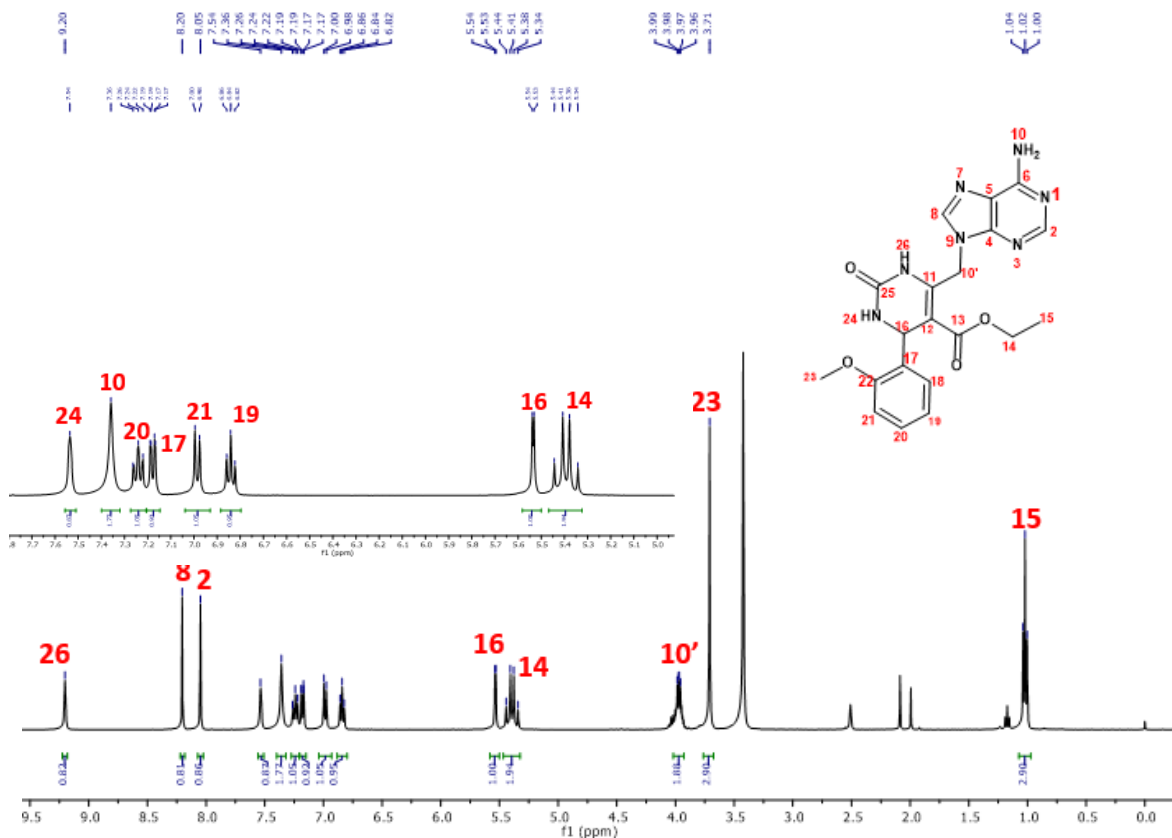
Figura 12 Variação estrutural dos híbridos DHPM-adenina

Na caracterização espectroscópica, através das análises de RMN uni e bidimensionais, o composto **16** foi o híbrido molecular escolhido como representante entre os análogos desta classe. A **Figura 13** apresenta o espectro de RMN de ¹H, obtido na frequência de 400 MHz,

utilizando-se DMSO- d_6 como solvente e TMS como padrão interno, sendo os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais δ (ppm).

No espectro é possível observar os sinais referentes à porção éster com um tripleto centrado em δ 1,02 ppm (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H-15) e um quarteto em 5,39 ppm (2H, q, $J = 11,5$ Hz, H-14). Também é possível verificar um sinal característico de grupo metóxi, com um simpleto em δ 3,71 ppm (3H, s); já em δ 5,53 ppm (1H, d, $J = 3,02$ Hz, H-16) um sinal com multiplicidade para duplete referente ao CH do centro estereogênico. Na região entre δ 6,84-7,24 ppm observam-se quatro sinais com integrais para 4H referentes aos hidrogênios aromáticos, com acoplamentos *orto-orto* e *orto-meta* relacionados, definidos através de duplo dupletos, a exemplo de δ 7,18 ppm (dd, $J = 7,5$ e 1,5 Hz, 1H). Em δ 7,36 ppm é possível observar um simpleto com integral 2H atribuído aos hidrogênios do grupo NH_2 do núcleo adenina; além de outros dois simpletos em δ 8,05 e δ 8,20 e ppm, referentes aos hidrogênios do núcleo da base purínica. Em δ 7,54 e δ 9,20 ppm observam-se a presença de dois simpletos, ambos com integral para 1H, referentes aos hidrogênios N-H do núcleo DHPM, completando desta forma a atribuição dos sinais referentes ao RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), que corroboram com a estrutura proposta.

Figura 13 Espectro de RMN de ^1H da estrutura de **16**



Através dos espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 14**) e DEPT-135 (**Figura 15**) foi possível observar sinais para 20 átomos de carbono sendo: um sp^3 metílico (δC 14,2 ppm), que pode ser atribuído à metila do éster etílico; um sp^3 metilênico (δC 42,7 ppm) referente ao CH_2 ligado a adenina; um sp^3 metínico (δC 50,6 ppm), referente ao C-H do centro estereogênico; um sp^3 metílico oxigenado (δC 55,6 ppm), referente ao grupo metóxi; um sp^3 metilênico oxigenado (δC 60,2 ppm) correspondente ao CH_2 do éster etílico; seis sp^2 metínicos (δC 111,6; 120,5; 128,5; 129,4; 141,0 e 153,0 ppm); sete quaternários (δC 101,3; 119,0; 130,8; 144,4; 150,2; 151,85 e 156,4 ppm) e dois carbonílicos (δC 157,3 e 165,2 ppm).

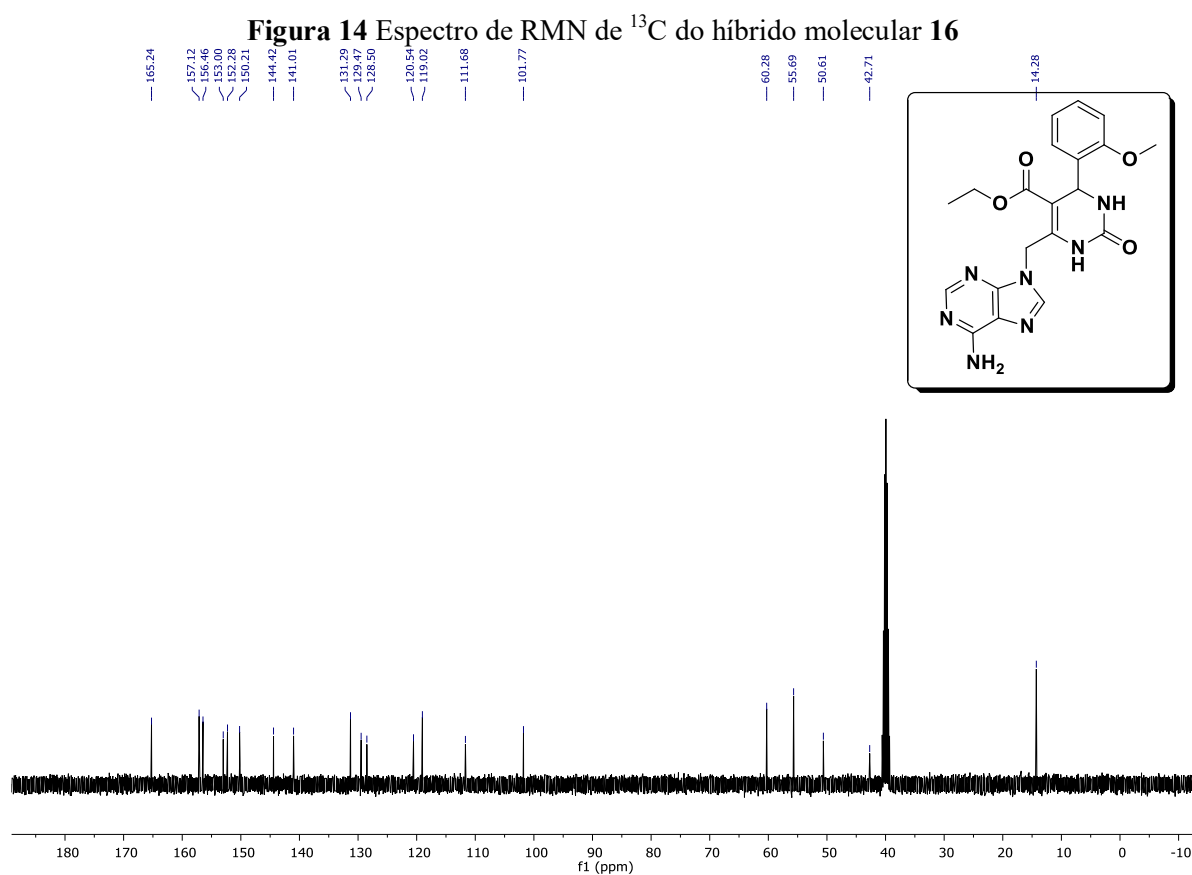
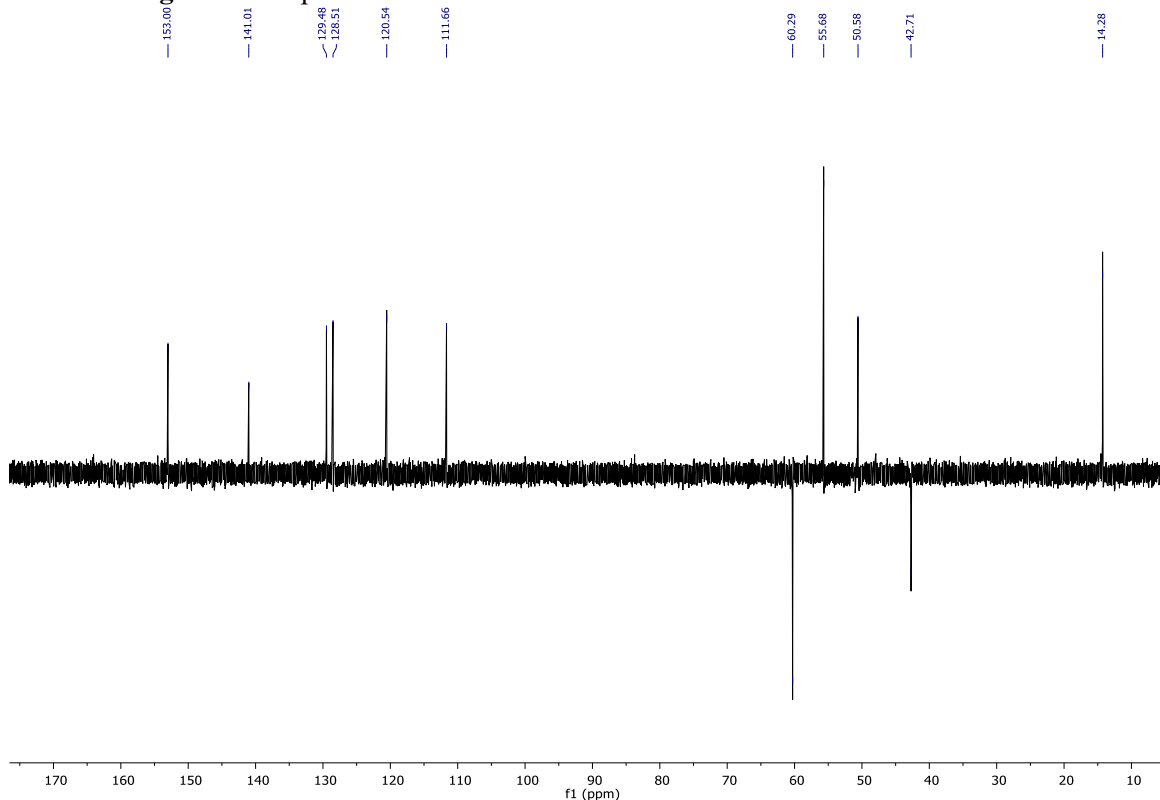
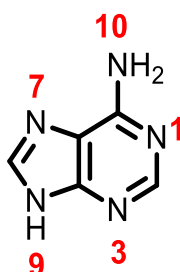


Figura 15- Espectro de RMN de DEPT-135 do híbrido molecular **16**

Baseado nos dados espectrais de RMN, tanto de carbono como de hidrogênio, não foi possível realizar a caracterização de forma definitiva da estrutura, já que no núcleo da adenina (**Figura 16**) há mais que um nitrogênio potencialmente reativo e, desta forma não foi possível atribuir de maneira inequívoca, em qual deles o núcleo DHPM estava ligado.

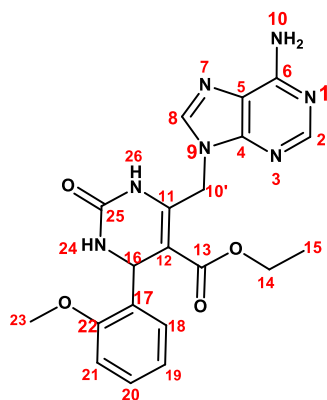
Figura 16 Estrutura da adenina

Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Quando a adenina é colocada em um sistema reacional básico, o próton mais ácido ligado é retirado e com isso é possível que ocorra ressonância no amideto formado, podendo resultar em mais que uma possibilidade de ligação em diferentes nitrogênios⁶⁷

Há possibilidade de ligação nos cinco nitrogênios, devido a ressonância existente no anel, entretanto existem dois sítios ativos mais comuns para que ocorra a ligação, sendo estes o N7 e o N9, que estão de acordo com a literatura,⁶⁶ conforme apresentado na **Figura 17**

Figura 17 Estrutura com marcação do composto **16**



Estudou-se a possibilidade de a ligação ocorrer no N7 e, com isso haveria chance de no espectro ROESY aparecer a interação entre os hidrogênios do N10 com os Hidrogênios do Carbono 10'. Portanto, se fez necessária a realização das análises de RMN de 2D e RMN ¹⁵N do híbrido **16**, os dados retirados dos espectros estão descritos na **Tabela 6**, e as principais correlações referentes ao HMBC mostrado na **Figura 18**.

Figura 18 . Principais correlações do HMBC do híbrido **16**

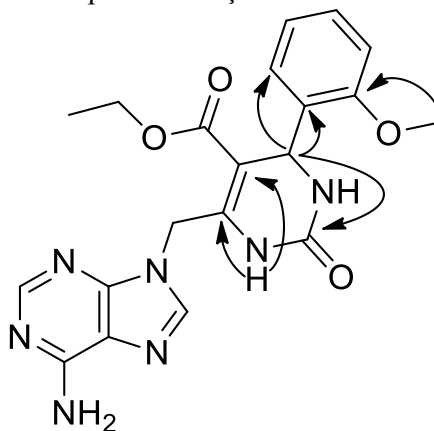


Tabela 6 Deslocamentos químicos referentes ao composto **16**

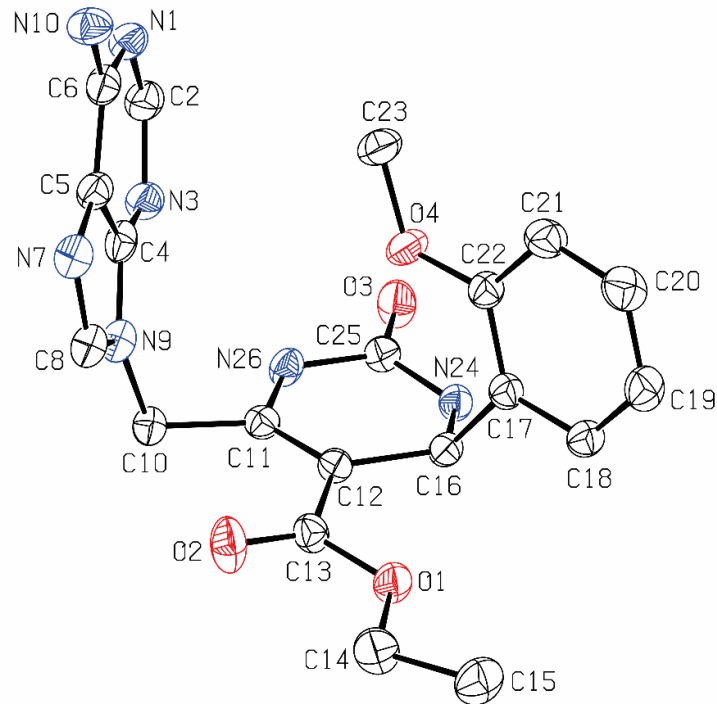
	$\delta\text{H ppm}$ (m, J/Hz)/ HMQC	δC	HMBC*		ROESY*
			${}^2J_{\text{CH}}$	${}^3J_{\text{CH}}$	
1	-	-	-	-	-
2	8,05 (s, 1H)	141,01	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	150,2	-	-	-
5	-	119,0	-	-	-
6	-	131,2	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	8,20 (s, 1H)	153,0	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	7,35 (s, 1H)	-	-	-	-
10'	3,97 (m, 2H)	60,2	-	H-8	-
11	-	144,4	H-26	H-16	-
12	-	101,3	H-16	H-26	-
13	-	157,3	-	-	-
14	5,39 (q, J = 11,5 Hz, 2H)	42,7	-	-	-
15	1,02 (t, J = 7,3 Hz, 3H)	14,2	-	-	H-10'
16	5,53 (d, J = 3,02 Hz, 1H)	50,6	-	-	-
17	-	152,2	H-16	-	-
18	7,17 (dd, J = 7,5 e 1,5 Hz, 1H)	128,5	-	H-16	-
19	6,83	120,5	-	-	-
20	7,23	129,4	-	-	-
21	6,98	111,6	-	-	-
22	-	156,4	H-23	-	-
23	3,71 (s, 3H)	55,6	-	-	-
24	7,53 (s, 1H)	-	-	-	-
25	-	165,2	H-26	H-16	-
26	9,2 (s, 1H)	-	-	-	-

*Principais correlações para HMBC e ROESY

Entretanto essa interação não pode ser observada nesse espectro conforme mostrado na **Tabela 6**, o que sugere que a ligação deve ocorrer no N9. Assim, através das análises realizadas não foi possível determinar a estrutura dos híbridos moleculares de maneira inequívocas. Desse modo, para confirmação estrutural foi necessário o auxílio da difratometria de Raios-X.

Foi possível a obtenção de monocristais do híbrido **16**. Ele foi obtido através da recristalização do composto em metanol, o qual originou monocristais brancos pertencentes ao sistema cristalino triclinico com grupo espacial C2. Uma representação visual da estrutura molecular do híbrido **16** se encontra na **Figura 19** e os principais parâmetros cristalográficos e de refinamento estão listados na **Tabela 7**.

Figura 19 Representação ORTEP do híbrido **16**



Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Resumidamente, pela análise do ortep, a formação da ligação entre os átomos C10'-N9 do híbrido, mostrando que a reação é regioespecífica em favor da ligação com esse nitrogênio. Assim, consideramos que a estrutura dos híbridos formados entre as DHPM-Cl e adenina puderam ser identificados de maneira inequívocas.

Outros dados que puderam ser observados nesse híbrido **16**, foi o comprimento da ligação C10-N9, que foi de 1,462 Å, e o ângulo formado entre os átomos N9-C10-C11 foi de 109,9°, consistente com a geometria tetraédrica do átomo de carbono C10.

Tabela 7 Dados de coleta DRX-monocristal e parâmetros de refinamento para o **composto 16**

Fórmula empírica	C ₂₀ H ₂₂ N ₇ O _{4,50}
Massa Molar (g/mol)	432,44
Comprimento de onda (Å) h	1,54178
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	C2
Parâmetros de cela	
	a=22,7512(10) Å
	b=7,5544(3) Å
	c=11,8118(5) Å
α	α=γ=90°.
β	100,0800(10)°.
Volume (Å³)	1998,78(15)
Z	4
Densidade (Mg/m³)	1,437
Coefficiente linear de absorção (mm⁻¹)	0,879
F(000)	908
Dimensão do cristal (mm³)	0,400 x 0,200 x 0,120
Número de reflexões coletadas	10179
Reflexões Independentes	3386
Completeness theta 65.243°	99,7 %

Método de refinamento	Mínimo quadrados/matriz completa em F ²
GOOF	1,041
Final R índices [I>2sigma(I)]	R1 = 0,354 wR2 = 0,094
R índices (all data)	R índices (all data)

Com este importante avanço sintético foi possível disponibilizar amostras dos 3 diferentes híbridos moleculares para a nossa parceira bioquímica, Professora Rozangela Pedrosa realizar as avaliações de suas atividades antitumorais

4.5 Testes biológicos

Os híbridos moleculares **14,16** e **17** tiveram seu efeito antitumoral avaliado frente à duas linhagens tumorais MCF-7 (câncer de mama) e HepG2 (hepatocarcinoma), a fim de verificar a efetividade da hibridização. O efeito citotóxico dos híbridos moleculares foi avaliado segundo Mosmann⁶⁹ após tratamento das células com os compostos por 72 horas, os valores de IC₅₀ para os híbridos podem ser observados na **Tabela 8**. Dentre os híbridos avaliados, o composto mais citotóxico, ou seja, apresenta os menores valores de IC₅₀ foi o composto **14** com valores de 88,23 µM para as células HepG2 e com valores de 162,0 µM para as células MCF-7, entretanto não apresentou uma boa seletividade.

Entretanto, os compostos não apresentaram atividade citotóxica promissora frente à essas linhagens comparados ao padrão Doxorubicin, sendo necessário, portanto, novos testes com outras linhagens celulares e/ou modificações estruturais a fim de se obter menores valores de IC₅₀

Tabela 8- Efeito citotóxico *in vitro* dos híbridos 14,16 e 17 contra as HepG2, McCoy e MCF-7.

Híbridos de adenina	IC50(µM)		
	HepG2	McCoy	MCF-7
DOXORUBICIN	0,1167	0,19	3,9
AD_Ph (17)	88,38	144,4	155,5
AD_2-OMe (16)	221,84	162,0	128,0
AD_4-Cl (14)	88,23	56,99	106,7

Tempo de tratamento: 72 h

Experimentos realizados em triplicata e dados apresentados como média±DP

^aIC₅₀ = Concentração que expressa a metade da viabilidade.

5 EXPERIMENTAL

5.1 Materiais

Os solventes orgânicos utilizados para isolamento e purificação foram obtidos de fontes comerciais (Vetec, Synth e Quimidrol) e, quando necessário, foram purificados utilizando métodos descritos em literatura.

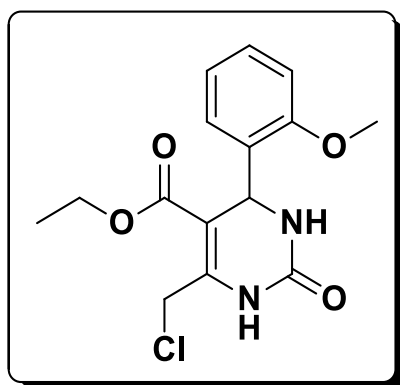
Os reagentes empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais (Sigma Aldrich, Acros e Vetec) e utilizados sem purificação prévia, sendo eles: 4-Cloroacetoacetato, ácido clorídrico, ureia, etanol, benzaldedo, 2-metobenzaldeido, 4-metobenzaldeido, 2-clorobenzaldeido, 4-clorobenzaldeio, adenina, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, carbonato de céσιο, hidróxido de potássio, trietilamina, *tert*-butóxido de potássio, glicerol, dimetilformamida, lactato de etila, PEG 400, etilenoglicol, etanol, iodeto de cobre, hidreto de sódio, hidróxido de sódio, dimetilsulfóxido, .

As placas de cromatografia em camada delgada (CCD) provêm de fontes comerciais, gel de Sílica da marca Machrrey-Nagel com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 μm de diâmetro. Utilizou-se, como método de revelação, luz ultravioleta, cuba de iodo e solução ácida de vanilina, seguido de aquecimento a 110 °C.

Para os produtos que foram purificados com o uso de cromatografia em coluna (CC), o material utilizado foi uma coluna de vidro e, como fase estacionária, gel de sílica 0,063-0,2 mesh (Machrrey-Nagel).

5.2 Caracterização das DHPM-Cl

A síntese das DHPM-Cl foi realizada segundo metodologia descrita no item 4., seguem abaixo os dados espectroscópicos e espectrométricos dos produtos obtidos:



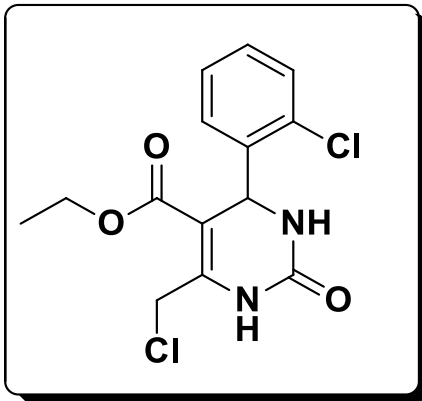
DHPM-Cl 7

Etil 6-(clorometil)-4-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-

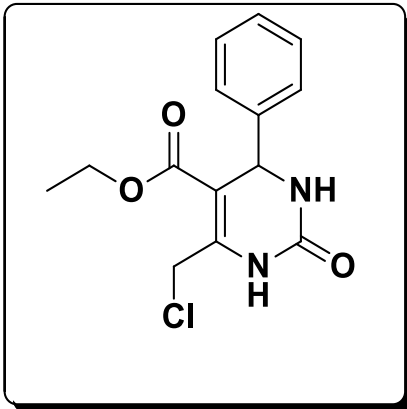
tetrahidropirimidina-5-carboxilato;Rendimento=70%

p.f.:172-175 °C; ($\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_4$); RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) = 9,13 (s, 1H); 7,16 (s, 1H); 6,95 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H); 6,82 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H); 6,69 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,58 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H); 5,22 (s, 1H); 4,42 (dd, $J = 10,4$ Hz, 2H); 3,67 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); 3,49 (s, 3H);

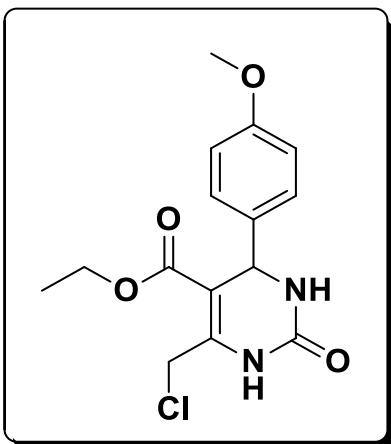
0,75 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) = 164,7; 156,9; 152,6; 146,8; 131,3; 129,4; 127,6; 120,6; 111,6; 100,8; 60,17; 55,7; 49,56; 39,49; 14,2.

**DHPM-CI 8**

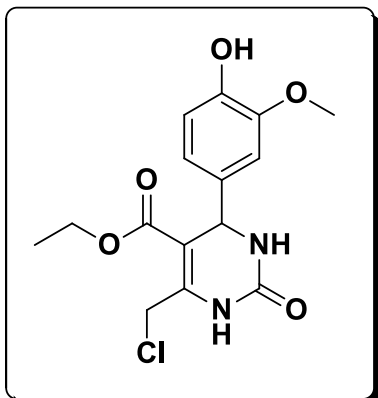
Etil 6-(clorometil)-4-(2-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato; Rendimento= 77%
 p.f.= 163-165°C; (C₁₄H₁₄Cl₂N₂O₃); RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,60 (s, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,34 (d, *J* = 12,3 Hz, 4H), 5,71 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 4,75 (dd, *J* = 10,6 Hz, 2H), 3,96 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,02 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO *d*₆) δ (ppm) = 163,8; 151,3; 146,9; 140,9; 131,7; 129,5; 129,4; 128,6; 127,8; 100,4; 59,8; 51,3; 39,1; 13,7.

**DHPM-CI 10**

Etil 6-(clorometil)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato; Rendimento= 66% ;
 p.f= 171-173 °C; (C₁₄H₁₅ClN₂O₃); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,52 (s, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,29 (d, *J* = 8,3 Hz, 5H), 5,20 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 4,69 (dd, *J* = 10,6 Hz, 2H), 4,03 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,11 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).
 RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 164,2; 152,0; 146,0; 143,9; 128,5; 127,6; 126,3; 101,8; 59,9; 53,9; 39,2; 13,90.

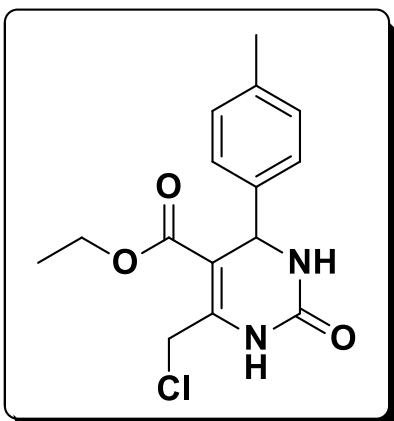
**DHPM-CI 12**

Etil 6-(clorometil)-4-(4-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato; Rendimento =81 %
 ;p.f= 185-187 °C; (C₁₅H₁₇ClN₂O₄) RMN de ; ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 9,48 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,18 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,89 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 5,15 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 4,69 (dd, *J* = 11,0 Hz, 2H), 4,03 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,72 (s, 3H); 1,12 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 164,3; 158,7; 152,1; 145,7; 136,1; 127,5; 113,8; 102,1; 59,9; 55,1; 53,3; 39,1; 13,94.

**DHPM-CI 6**

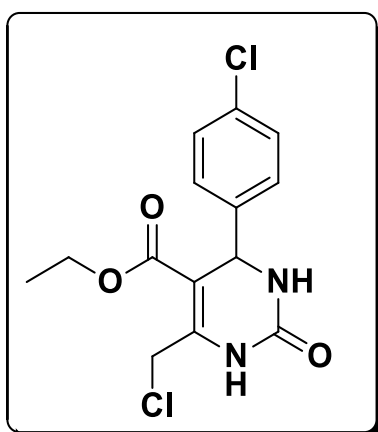
Etil 6-(clorometil)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato;

Rendimento=77%; p.f.=165-168°C ; (C₁₅H₁₇ClN₂O₅) ;RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,43 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 6,80 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 6,71 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,63 (dd, *J* = 8,1, 1,9 Hz, 1H), 5,09 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 4,68 (dd, *J* = 10,6 Hz, 2H), 4,04 (q, *J* = 7,1 Hz, 3H), 3,71 (s, 3H), 1,12 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN de ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 164,3; 152,1; 147,4; 146,0; 145,6; 134,9; 118,5; 115,3; 102,0; 59,9; 55,5; 53,5; 39,3; 13,9.

**DHPM-CI 9**

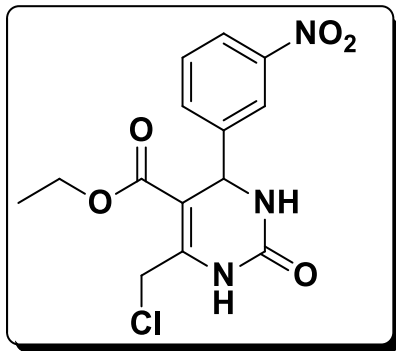
Etil 6-(clorometil)-2-oxo-4-(p-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato; Rendimento=77%

p.f= 164-168°C;-(C₁₅H₁₇ClN₂O₃); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,48 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,14 (s, 4H), 5,15 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 4,68 (dd, *J* = 10,6 Hz, 2H), 4,03 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,26 (s, 3H), 1,12 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 164,2; 152,1; 145,8; 141,0; 136,8; 129,0; 126,2; 101,9; 59,9; 53,6; 39,2; 20,6; 13,9.

**DHPM-CI 13**

Etil 6-(clorometil)-4-(4-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato; Rendimento=75%,

p.f= 179-182 °C; C₁₄H₁₄Cl₂N₂O₃; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,60 (s, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,43 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 3,0 Hz, 2H), 5,67 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 4,72 (d, *J* = 10,6 Hz, 2H), 3,95 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,01 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 164,3; 151,7; 147,4; 141,4; 132,1; 129,9; 129,8; 129,1; 128,2; 100,8; 60,3; 51,8; 14,2.



DHPM-Cl 11

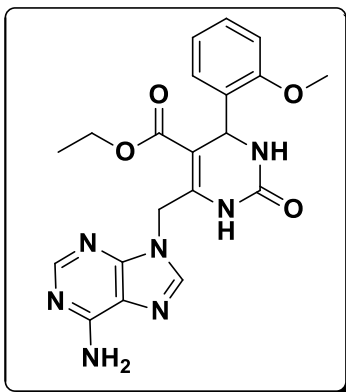
Etil 6-(Clorometil)-4-(3-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato. Rendimento= 82 %

p.f= °C : C₁₄H₁₄ClN₃O₅. RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,68 (s, 1H), 8,13 (s, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,68 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 5,38 (d, *J* = 2,7 Hz, 2H), 4,70 (dd, 2H), 4,05 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,11 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 163,9; 151,7; 147,8; 147,1;

146,0; 133,0; 130,3; 122,6; 121,1; 100,7; 60,1; 53,4; 13,8.

5.3 Caracterização dos híbridos moleculares

A síntese dos híbridos DHPM-adenina foi realizada segundo metodologia descrita no item 4.2 e confirmadas a seguir pelos dados espectroscópicos:

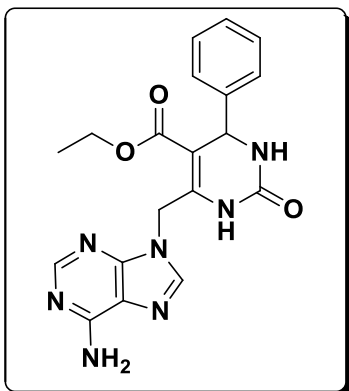


Híbrido 16

Etil 6-((6-amino-9H-purin-9-il)metil)-4-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato;

Rendimento= 30%; C₂₀H₂₁N₇O₄; P.f.: 234-236°C ; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,20 (s, 1H); 8,20 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 7,54 (s, 1H); 7,36 (s, 2H); 7,24 (t, *J* = 8,6 Hz, 1H); 7,18 (dd, *J* = 7,6, 1,5 Hz, 1H); 6,99 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 6,84 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H); 5,54 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H); 5,39 (dd, *J* = 11,3 Hz,

2H); 3,97 (q, *J* = 7,1, 3,8 Hz, 2H); 3,71 (s, 3H); 1,02 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO) δ (ppm) = 165,2; 157,1; 156,4; 153,0; 152,2; 150,2; 144,4; 141,0; 131,2; 129,4; 128,5; 120,5; 119,0; 111,6; 101,7; 60,2; 55,6; 50,6; 42,71; 14,2. RMN de ¹⁵N (41 MHz, DMSO) δ 239,5; 236,1; 224,5; 122,3; 94,0; 81,6; 51,0. HRMS: [M+H] calc.(*m/z*): 424,1725. encontrado (*m/z*): 424,1728.

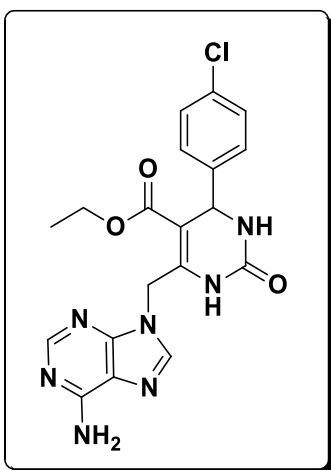


Híbrido 17

Etil 6-((6-amino-9H-purin-9-il)metil)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato; Rendimento= 25%; p.f.=

204-209 °C (C₁₉H₁₉N₇O₃); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,33 (s, 1H); 8,19 (s, 1H); 8,02 (s, 1H); 7,93 (s, 1H); 7,33 (s, 2H); 7,31 (d, *J* = 7,3 Hz, 5H); 5,39 (dd, *J* = 16,1 Hz, 2H); 5,22 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 4,01 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,05 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) =

164,7; 156,0; 152,5; 151,7; 149,7; 144,0; 143,9; 140,6; 128,5; 127,6; 126,6; 126,5; 118,5; 102,7; 60,0; 54,3; 13,9. HRMS: [M+H] calc.(*m/z*): 394,1624. encontrado (*m/z*): 394,1622.

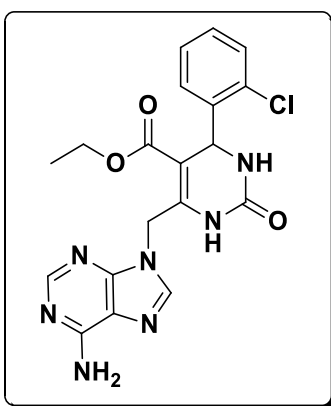


Híbrido 14

Etil 6-((6-amino-9H-purin-9-il)metil)-4-(4-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato;Rendimento=15 %

p.f.= 248-252 °C; (C₁₉H₁₈ClN₇O₃); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,36 (s, 1H); 8,18 (s, 1H); 8,01 (s, 1H); 7,91 (s, 1H); 7,38 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,32 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,29 (s, 2H); 5,38 (dd, *J* = 4,9 Hz, 2H); 5,20 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H); 4,01 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 1,05 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 164,5; 155,9; 152,5; 151,5; 149,7; 144,4;

143,0; 140,7; 132,1; 128,5; 128,4; 118,5; 102,0; 60,0; 53,7; 39,7; 13,8. HRMS: [M+H] calc.(*m/z*): 428,1230. encontrado (*m/z*): 428,1232.



Híbrido 15

Etil 6-((6-amino-9H-purin-9-il)metil)-4-(2-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato;Rendimento=12%

p.f.= 264-267°C; (C₁₉H₁₈ClN₇O₃); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm)= 9,38 (s, 1H); 8,20 (s, 1H); 8,09 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 7,52 – 7,45 (m, 1H); 7,42 – 7,36 (m, 1H); 7,31 (s, 2H); 7,29 – 7,22 (m, 2H); 5,70 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H); 5,42 (dd, *J* = 5,7 Hz, 2H); 3,93 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H); 0,98 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN

de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 164,8; 156,4; 152,9; 151,4; 150,2, 145,6; 141,5; 141,4; 132,1; 129,8; 128,1; 119,0; 101,6; 60,3; 52,2; 42,8; 39,9, 14,2. HRMS: [M+H] calc.(*m/z*): 428,1237 encontrado (*m/z*): 428,1232

5.4 Métodos e instrumentação

Para a caracterização dos compostos obtidos para elaboração desse trabalho, foi utilizado equipamentos e técnicas descritas nessa seção.

5.5 Espectroscopia no infravermelho-IV

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por Refletância Total Atenuada (ATR) em um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100, na região de 4000 a 600 cm^{-1} no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, no Departamento de Química da UFSC. Os espectros das amostras foram adquiridos na região do IV em um espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier e com acessório de Refletância Total Atenuada Horizontal (FTIR – ATR) da Perkin-Elmer Spectrophotometer Spectrum 100, com cristal de ZnSe (45°) e um detector TGS (“triglycine sulfate”). As medidas das amostras foram corrigidas pelo espectro do branco que foi registrado somente com background feito com ar ambiente, ou seja, sem nada sobre o cristal e posteriormente subtraído do espectro da amostra. A temperatura da sala encontrava-se em torno de 25 °C.

5.6 Ponto de fusão

Os valores de ponto de fusão (P.F.) foram determinados em aparelho MQ APF-301, não aferido, localizado no LabSelen, Departamento de Química-UFSC.

5.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono – RMN de ^1H e ^{13}C

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance 200 ou AS-400, operando em 200 e 400 MHz respectivamente, que se encontram na Central de Análises, Departamento de Química - UFSC. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido deuterado, empregando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s = simpleto, d = duplete, t = tripleto e, m = multiplete), o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa e a constante acoplamento (J) expressa em Hertz (Hz).

5.8 Espectroscopia de massas de alta resolução

As análises de HRMS foram realizadas em um espectrômetro de massas micrOTOF QII Bruker, disponível no Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME – UFSC), operado em modo de íon positivo empregando-se os métodos de ionização química à pressão atmosférica APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) ou APPI (Atmospheric Pressure Photoionization) com injeção manual das amostras. Os dados foram processados em um software Bruker Data Analysis versão 4.0 e, expressos como m/z.

5.9 MICRO-ONDAS

As reações sob irradiação de micro-ondas foram realizadas no MesoLab-Departamento de Química-UFSC, em tubos específicos selados com 10 mL de volume, em um aparelho Monomode Reactor CEM Discover, equipado com Explore, de 24 posições, contendo um controlador de pressão e o monitoramento da temperatura é realizado por infravermelho.

5.10 Difractometria de Raio-X

As análises de difração de Raios X de monocristal dos híbridos moleculares foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química- UFSC, pelo Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi. Utilizou-se um difratômetro Kappa APEX II DUO equipado com um tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha$ $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite à 150 K. Para a resolução da estrutura cristalina foi utilizado o programa SHIELXS97, para refinar o método dos mínimos quadrados com matriz completa com a utilização do programa SHELXL97. A obtenção das representações gráficas das estruturas moleculares, foram geradas utilizando o programa ORTEP.

5.11 Avaliação biológica

5.11.1 Cultura de células

Células de linhagens tumorais MCF-7 (carcinoma de mama humano) e Hepg2 (carcinoma hepatocelular) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro. A linhagem normal McCoy (fibroblasto de camundongo) foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz. Todas as linhagens foram mantidas e cultivadas a 37 °C sob atmosfera contendo CO₂ a 5 % com 95 % de umidade do ar, o que permite chegar a confluência. O meio DMEM utilizado na cultura foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 U / mL) e estreptomicina (100 µg / mL).

5.11.2 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil), que é um sal tetrazólio que é reduzido a partir do metabolismo mitocondrial, formando cristais de formazan de coloração púrpura⁷⁰.

O efeito citotóxico dos híbridos moleculares **14**, **16** e **17** foi avaliado frente às células MCF-7, Hepg2 e McCoy, plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de (10^4 células / poço) e incubadas com temperatura de 37 °C. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com híbridos moleculares **14**, **16** e **17** em concentrações crescentes (0,1, 1, 10, 100 e 1000 μ M) no tempo de 72 h. Nos poços do controle negativo, as células foram incubadas em meio contendo somente o veículo de diluição, DMSO 1%. Após o tempo de exposição dos compostos as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas durante 2 h com MTT (0,5 mg / mL). Os cristais de formazan foram então solubilizados pela adição de DMSO (100 μ L / poço), e a leitura foi realizada a 550 nm⁶⁹. Três experimentos independentes foram realizados, e os resultados da viabilidade celular foram apresentados como valores IC₅₀, obtido a partir da seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{abs\ teste - abs\ branco \times 100}{abs\ controle}$$

A concentração inibitória de 50 % (IC₅₀) foi calculada por regressão linear e expressa por média \pm desvio padrão. O controle negativo, que apresentava somente o meio com veículo foi considerado como 100% de viabilidade celular.

6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Considerando-se os objetivos propostos para este trabalho e analisando-se os resultados obtidos, é possível fazer algumas considerações frente os estudos realizados.

Foram preparados uma série de diidropirimidinonas, via reação multicomponente de Biginelli, com bons rendimentos, as quais foram utilizadas como materiais de partida para a síntese dos híbridos moleculares.

Partindo das DHPM-Cl, foi sintetizado uma série de híbridos moleculares DHPM-adenina inéditos. Apesar dos rendimentos não serem elevados, acreditamos que sejam satisfatórios, considerando a complexidade das estruturas. Esses híbridos moleculares apresentam características interessantes do ponto de vista biológico, considerando-se as moléculas utilizadas como materiais de partida.

A condição otimizada para a preparação dos híbridos foi conduzida utilizando-se DMF como solvente, a 100°C na presença de carbonato de sódio, com o tempo reacional de uma hora.

Estudos preliminares sobre a atividade antitumoral desses compostos frente a linhagens de células HepG2 e MCF-7 foram realizados, entretanto não se mostraram muito seletivos e apresentaram pouca citotoxicidade em relação à Doxorubicin, sendo necessária algumas modificações estruturais para realização de novos testes.

Como perspectivas do trabalho fica a possibilidade de avaliação de atividade antiviral desses compostos, e a publicação desses resultados na forma de um artigo científico em um periódico conhecido na área.

7 REFERÊNCIAS

- (1) Rani, J.; Saini, M.; Kumar, S.; Verma, P. K. Design, Synthesis and Biological Potentials of Novel Tetrahydroimidazo[1,2-a]Pyrimidine Derivatives. *Chem. Cent. J.* **2017**, *11* (1), 1–11.
- (2) Silva, G. C. O.; Correa, J. R.; Rodrigues, M. O.; Alvim, H. G. O.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; Wanderley, K. A.; Fioramonte, M.; Gozzo, F. C.; de Souza, R. O. M. A.; et al. The Biginelli Reaction under Batch and Continuous Flow Conditions: Catalysis, Mechanism and Antitumoral Activity. *RSC Adv.* **2015**, *5* (60), 48506–48515.
- (3) Rogerio, K. R.; Vitória, F.; Kummerle, A. E.; Graebin, C. S. Reações Multicomponentes : Um Breve Histórico e a Versatilidade Destas Reações Na Síntese de Moléculas Bioativas Multicomponent Reactions : A Brief History and Their Versatility for the Synthesis of Biologically Active Molecules Resumo Reações Multicompon. *Rev. Virtual Química* **2016**, *8* (6), 1934–1962.
- (4) de Fátima, Â.; Braga, T. C.; Neto, L. da S.; Terra, B. S.; Oliveira, B. G. F.; da Silva, D. L.; Modolo, L. V. A Mini-Review on Biginelli Adducts with Notable Pharmacological Properties. *J. Adv. Res.* **2015**, *6* (3), 363–373.
- (5) Matos, L. H. S.; Masson, F. T.; Simeoni, L. A.; Homem-de-Mello, M. Biological Activity of Dihydropyrimidinone (DHPM) Derivatives: A Systematic Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1779–1789.
- (6) Luo, Z.; Liang, L.; Sheng, J.; Pang, Y.; Li, J.; Huang, L.; Li, X. Synthesis and Biological Evaluation of a New Series of Ebselen Derivatives as Glutathione Peroxidase (GPx) Mimics and Cholinesterase Inhibitors against Alzheimer's Disease. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22* (4), 1355–1361.
- (7) Aulakh, J. S.; Malik, A. K.; Kaur, V.; Schmitt-Kopplin, P. A Review on Solid Phase Micro Extraction - High Performance Liquid Chromatography (SPME-HPLC) Analysis of Pesticides. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2005**, *35* (1), 71–85.
- (8) Shusheng, S. Hybridization Chain Reaction: A Versatile Molecular Tool for Biosensing , Bioimaging , and Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4281–4298.
- (9) Nelson, D. L.; Lehninger, A. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*; Macmillan, 2008.
- (10) Savić, D.; Stanković, T.; Lavrnja, I.; Podolski-Renić, A.; Banković, J.; Peković, S.; Stojiljković, M.; Rakić, L.; Ruždijić, S.; Pešić, M. Purine Nucleoside Analogs in the

- Therapy of Cancer and Neuroinflammation. *Mol. Inhib. Target. Ther.* **2015**, *1* (1), 3–14.
- (11) Rygielska-Tokarska, D.; Andrei, G.; Schols, D.; Snoeck, R.; Głowacka, I. E. Synthesis, Antiviral, Cytotoxic and Cytostatic Evaluation of N1-(Phosphonoalkyl)Uracil Derivatives. *Monatshefte fur Chemie* **2016**, *147* (6), 1081–1090.
- (12) Shelton, J.; Lu, X.; Hollenbaugh, J. A.; Cho, J. H.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14379–14455.
- (13) Galmarini, C.; Popowycz, F.; Joseph, B. Cytotoxic Nucleoside Analogues: Different Strategies to Improve Their Clinical Efficacy. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15* (11), 1072–1082.
- (14) Wong, Y. Y.; Moon, A.; Duffin, R.; Barthet-Barateig, A.; Meijer, H. A.; Clemens, M. J.; De Moor, C. H. Cordycepin Inhibits Protein Synthesis and Cell Adhesion through Effects on Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (4), 2610–2621.
- (15) Goto, H.; Kawabata, K. A New Insight of Biginelli Reaction: The Dawn of Multicomponent Click Chemistry? *Polym. Chem.* **2011**, *2* (5).
- (16) Kurzawski, M.; Maciejewska, G. Biomolecular Chemistry Regioselective Synthesis of Novel 4, 5-Diaryl. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 3427–3440.
- (17) Chen, D. Y. A Personal Perspective on Organic Synthesis : Past , Present , and Future. *Isr. J. Chem.* **2018**, *58*, 85–93.
- (18) Gaich, T.; Baran, P. S. Aiming for the Ideal Synthesis. *J. Org. Chem.* **2010**, 4657–4673.
- (19) Alvim, H. G. O.; da Silva Júnior, E. N.; Neto, B. A. D. What Do We Know about Multicomponent Reactions? Mechanisms and Trends for the Biginelli, Hantzsch, Mannich, Passerini and Ugi MCRs. *RSC Adv.* **2014**, *4* (97), 54282–54299.
- (20) Ghashghaei, O.; Seghetti, F.; Lavilla, R. Selectivity in Multiple Multicomponent Reactions : Types and Synthetic Applications. *Journal Org. Chem.* **2019**.
- (21) Terracciano, S.; Foglia, A.; Chini, M. G.; Vaccaro, M. C.; Russo, A.; Dal Piaz, F.; Saturnino, C.; Riccio, R.; Bifulco, G.; Bruno, I. New Dihydropyrimidin-2(1H)-One Based Hsp90 C-Terminal Inhibitors. *RSC Adv.* **2016**, *6* (85), 82330–82340.
- (22) Jacobs, A.; Heidelberger, M. Methods for the Acylation of Aromatic Aminocompounds and Ureas, with Especial Reference to Chloroacylation. **1916**, *2* (1875).
- (23) Vaxelaire, C.; Winter, P.; Christmann, M. One-Pot Reactions Accelerate the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients. *Angew. Chemie* **2011**, *50* (Scheme 2), 3605–3607.
- (24) Domling, A.; Wang, W.; Wang, K. Chemistry and Biology of Multicomponent Reactions. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (6), 3083–3135.

- (25) Beller, M.; Wangelin, A. J. Von; Neumann, H.; G^ˆrdes, D.; Klaus, S.; Str, D.; Beller, M. Multicomponent Coupling Reactions for Organic Synthesis : Chemoselective Reactions with Amide - Aldehyde Mixtures. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4286–4294.
- (26) Edited by Jieping Zhu, H. B. *Multicomponent Reactions*.
- (27) Cioc, R. C.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A. Multicomponent Reactions : Advanced Tools for Sustainable Organic Synthesis. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2958–2975.
- (28) Trost, B. M. Atom Economy A Search for Synthetic Efficiency. *Am. Assoc. Adv. Sci.* **1991**, *254* (5037), 1471–1477.
- (29) Ugi, I. Versuche Mit Isonitrilen. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1959**, No. 11, 373–388.
- (30) Kappe, C. O. A Reexamination of the Mechanism of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis . Support for an N -Acyliminium Ion. *J. Org. Chem.* **1997**, *1* (6), 7819–7822.
- (31) Strecker, A. Ueber Die K \ddot{u} nstliche Bildung Der Milchs \ddot{a} ure Und Einen Neuen, Dem Glycocoll Homologen K \ddot{o} rper. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1850**, *75* (1), 27–45.
- (32) Bon, R. S.; Hong, C.; Bouma, M. J.; Schmitz, R. F.; Kanter, F. J. J. De; Lutz, M.; Spek, A. L.; Orru, R. V. A. Novel Multicomponent Reaction for the Combinatorial Synthesis of 2-Imidazolines. *Org. Lett.* **2003**, *5* (20), 2001–2004.
- (33) Ruijter, E.; Orru, R. V. A. Discovery of MCRs. **2015**.
- (34) Oliver Kappe, C. 100 Years of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. *Tetrahedron* **1993**, *49* (32), 6937–6963.
- (35) Tron, G. C.; Minassi, A.; Appendino, G. Pietro Biginelli : The Man Behind the Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5541–5550.
- (36) Biginelli, P. Aldehyde-Urea Derivatives of Aceto-and Oxaloacetic Acids. *Gazz. chim. ital* **1893**, *23* (1), 360–413.
- (37) Folkers, K.; Johnson, T. B. Researches on Pyrimidines. CXXXVI. The Mechanism of Formation of Tetrahydropyrimidines by the Biginelli Reaction¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55* (9), 3784–3791.
- (38) Kappe, C. O. The Generation of Dihydropyrimidine Libraries Utilizing Biginelli Multicomponent Chemistry. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22* (6), 630–645.
- (39) De Souza, R. O. M. A.; da Penha, E. T.; Milagre, H. M. S.; Garden, S. J.; Esteves, P. M.; Eberlin, M. N.; Antunes, O. A. C. The Three-component Biginelli Reaction: A Combined Experimental and Theoretical Mechanistic Investigation. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (38), 9799–9804.
- (40) Kaur, R.; Manjal, S. K.; Rawal, R. K.; Kumar, K. Recent Synthetic and Medicinal Perspectives of Tryptanthrin. *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25* (17), 4533–4552.

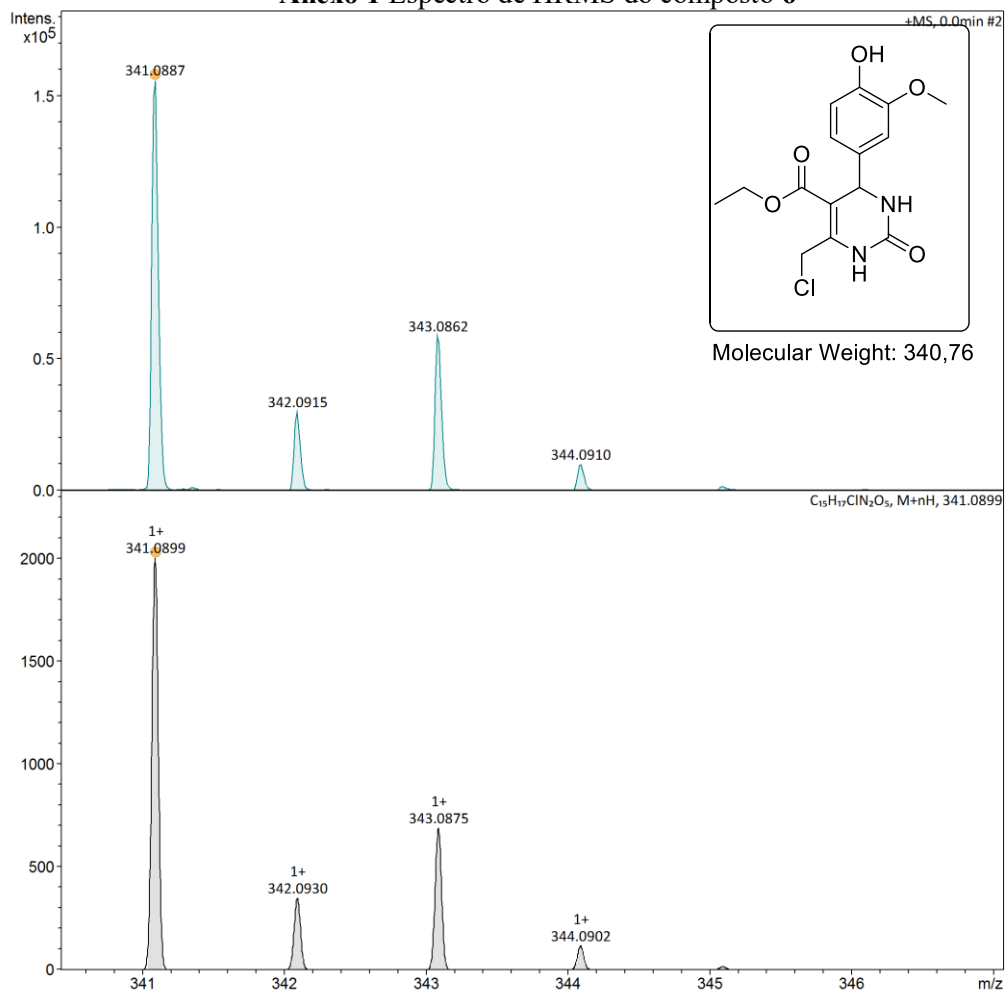
- (41) Kappe, C. O. A Reexamination of the Mechanism of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. Support for an N-Acyliminium Ion Intermediate¹. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7201–7204.
- (42) Marsaioli, A. J.; Porto, A. L. M. *Biocatálise e Biotransformação–Fundamentos e Aplicações*; 2010.
- (43) Gu, W.; Wang, T.; Maltais, F.; Ledford, B.; Kennedy, J.; Wei, Y.; Gross, C. H.; Parsons, J.; Duncan, L.; Arends, S. J. R. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Potent NAD⁺-Dependent DNA Ligase Inhibitors as Potential Antibacterial Agents. Part I: Aminoalkoxy pyrimidine Carboxamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (11), 3693–3698.
- (44) Fischer, C.; Koenig, B. Palladium- and Copper-Mediated N -Aryl Bond Formation Reactions for the Synthesis of Biological Active Compounds. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, No. 11, 59–74.
- (45) Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J.; King, R. W.; Schreiber, S. L.; Mitchison, T. J. Smart Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science* (80-.). **1999**, *286* (5441), 971–974.
- (46) Muller, B. A. Imatinib and Its Successors-How Modern Chemistry Has Changed Drug Development. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15* (2), 120–133.
- (47) Schnell, B.; Strauss, U. T.; Verdino, P.; Faber, K.; Kappe, C. O. Synthesis of Enantiomerically Pure 4-Aryl-3, 4-Dihydropyrimidin-2 (1H)-Ones via Enzymatic Resolution: Preparation of the Antihypertensive Agent (R)-SQ 32926. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11* (7), 1449–1453.
- (48) Wisén, S.; Bertelsen, E. B.; Thompson, A. D.; Patury, S.; Ung, P.; Chang, L.; Evans, C. G.; Walter, G. M.; Wipf, P.; Carlson, H. A. Binding of a Small Molecule at a Protein–protein Interface Regulates the Chaperone Activity of Hsp70–hsp40. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (6), 611–622.
- (49) Crespo, A.; El Maatougui, A.; Biagini, P.; Azuaje, J.; Coelho, A.; Brea, J.; Loza, M. I.; Cadavid, M. I.; García-Mera, X.; Gutiérrez-de-Terán, H. Discovery of 3, 4-Dihydropyrimidin-2 (1 H)-Ones as a Novel Class of Potent and Selective A2B Adenosine Receptor Antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (11), 1031–1036.
- (50) Patil, A. D.; Kumar, N. V.; Kokke, W. C.; Bean, M. F.; Freyer, A. J.; Brosse, C. De; Mai, S.; Truneh, A.; Carte, B. Novel Alkaloids from the Sponge *Batzella* Sp.: Inhibitors of HIV Gp120-Human CD4 Binding. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (5), 1182–1188.
- (51) Nagarajaiah, H.; Mukhopadhyay, A.; Moorthy, J. N. Biginelli Reaction : An Overview.

- Tetrahedron Lett.* **2016**, *57* (47), 5135–5149.
- (52) Lins, G. O. W. Síntese de Heterociclos Benzazolil-Quinolínicos Como Precursores de Análogos de Nucleosídeos e Sondas Biológicas Fluorescentes via ESIPT. **2006**.
- (53) Comin, M. J. *Síntesis de Nucleósidos Carbocíclicos*; 2002.
- (54) De Almeida, V. L.; Leitão, A.; Barrett Reina, L. D. C.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. CâNcer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução. *Quim. Nova* **2005**, *28* (1), 118–129.
- (55) Gu, J. Structure-Antiviral Activity Relationship in the Series of Pyrimidine And. **1999**, 2064–2086.
- (56) Vinícius, M.; Souza, N. De; Cruz, F. O.; Tecnologia, I. De; Manguinhos, F.; Nabuco, R. S. DROGAS ANTI-VIH: PASSADO, PRESENTE E PERSPECTIVAS FUTURAS. *Quim. Nova* **2003**, *26* (3), 366–372.
- (57) Nussbaumer, S.; Bonnabry, P.; Veuthey, J. L.; Fleury-Souverain, S. Analysis of Anticancer Drugs: A Review. *Talanta* **2011**, *85* (5), 2265–2289.
- (58) Erdem, A.; Kerman, K.; Meric, B. Novel Hybridization Indicator Methylene Blue for the Electrochemical Detection of Short DNA Sequences Related to the Hepatitis B Virus. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *422*, 139–149.
- (59) Araújo, C. R. M.; Filho, C. A. L.; Dos Anjos Santos, V. L.; De Azevedo Maia, G. L.; De Assis Gonsalves, A. Desenvolvimento de Fármacos Por Hibridação Molecular: Uma Aula Prática de Química Medicinal Usando Comprimidos de Paracetamol e Sulfadiazina e a Ferramenta Virtual SciFinder. *Quim. Nova* **2015**, *38* (6), 868–873.
- (60) Dinesh, S.; Shikha, G.; Bhavana, G.; Nidhi, S.; Dileep, S. Biological Activities of Purine Analogues: A Review. *J. Pharm. Sci. Innov.* **2012**, *1* (2), 29–34.
- (61) Nepali, K.; Sharma, S.; Sharma, M.; Bedi, P. M. S.; Dhar, K. L. Rational Approaches, Design Strategies, Structure Activity Relationship and Mechanistic Insights for Anticancer Hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 422–487.
- (62) Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-Target-Directed Ligands to Combat Neurodegenerative Diseases (Journal of Medicinal Chemistry (2006) 51, (361)). *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (7), 2326.
- (63) Kumar, G.; Raghuvir, A. Ebselen , a Promising Antioxidant Drug : Mechanisms of Action and Targets of Biological Pathways. *Mol Biol Rep* **2014**.
- (64) Canto, R. F. S.; Barbosa, F. A. R.; Nascimento, V.; de Oliveira, A. S.; Brighente, I. M. C.; Braga, A. L. Design, Synthesis and Evaluation of Seleno-Dihydropyrimidinones as

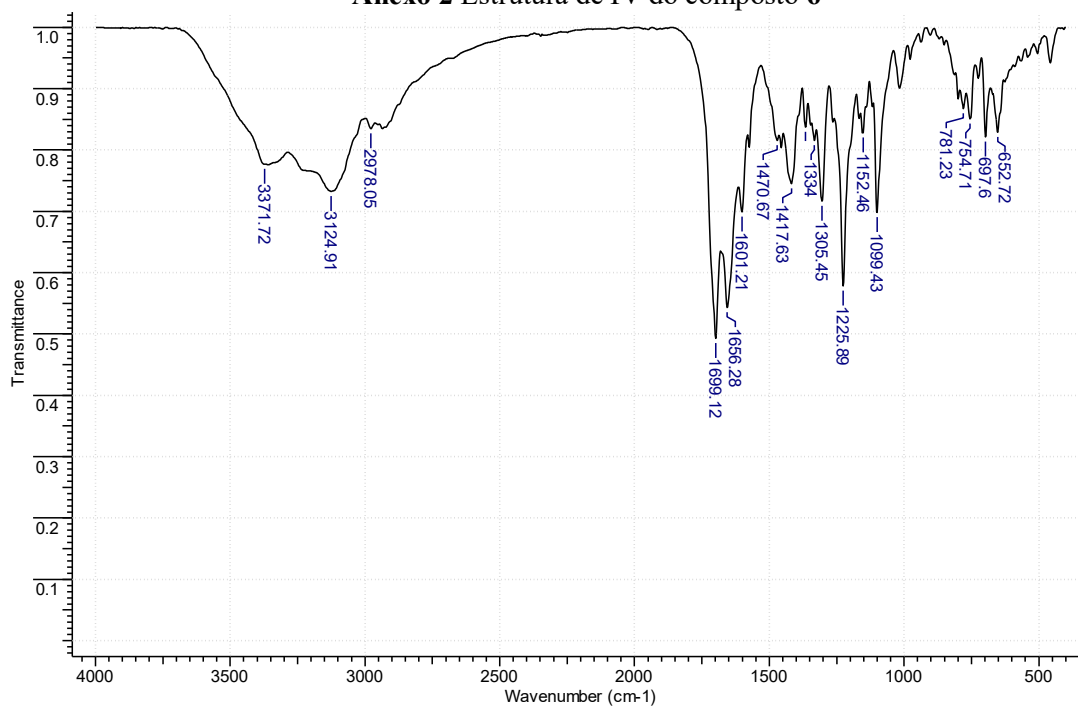
- Potential Multi-Targeted Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (21), 3470–3477.
- (65) Petrov, V. I.; Ozerov, A. A.; Novikov, M. S.; Pannecouque, C.; Balzarini, J. 9- (2-ARYLOXYETHYL) DERIVATIVES OF ADENINE – A NEW CLASS OF NON-NUCLEOSIDIC ANTIVIRAL AGENTS. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2003**, *39* (9), 1389–1397.
- (66) Buyens, D. M. S.; Mangondo, P.; Cukrowski, I.; Pilcher, L. A. Solvent-Directed Regioselective Benzylolation of Adenine : Characterization of N9-Benzyladenine and N3-Benzyladenine. *J. Heterocycl. Chem.* **2017**, *54*, 2946–2950.
- (67) Online, V. A.; Makowski, M. Geometric and Energetic Consequences of Prototropy for Adenine and Its Structural Models-a Review. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 36587–36604.
- (68) Hockov, D.; Marek, R. N 7 - and N 9 -Substituted Purine Derivatives : A 15 N NMR Study. *Magn. Ressonance Chem.* **2002**, *40*, 353–360.
- (69) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63.
- (70) Freshney, R. I. *Freshney's Culture of Animal Cells: A Multimedia Guide*; Wiley-Liss New York, 1999.

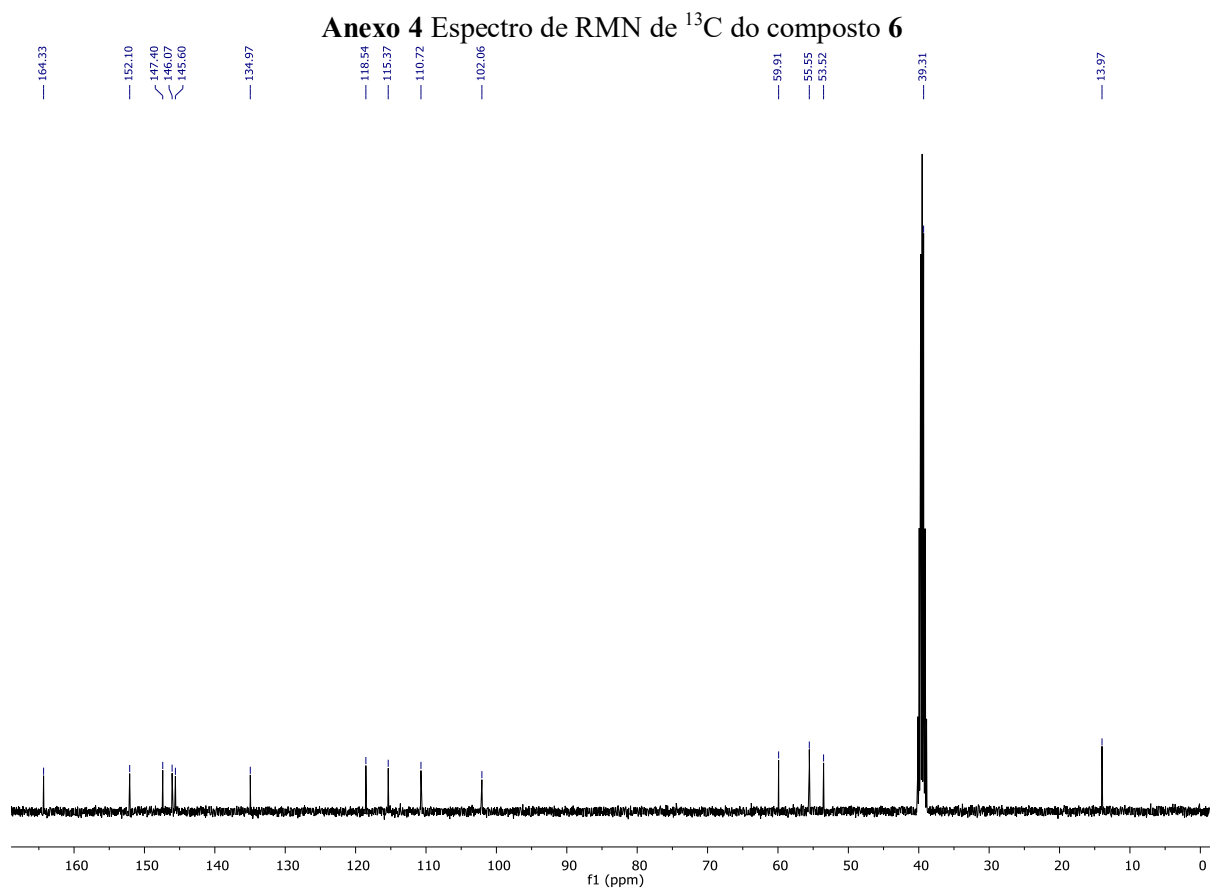
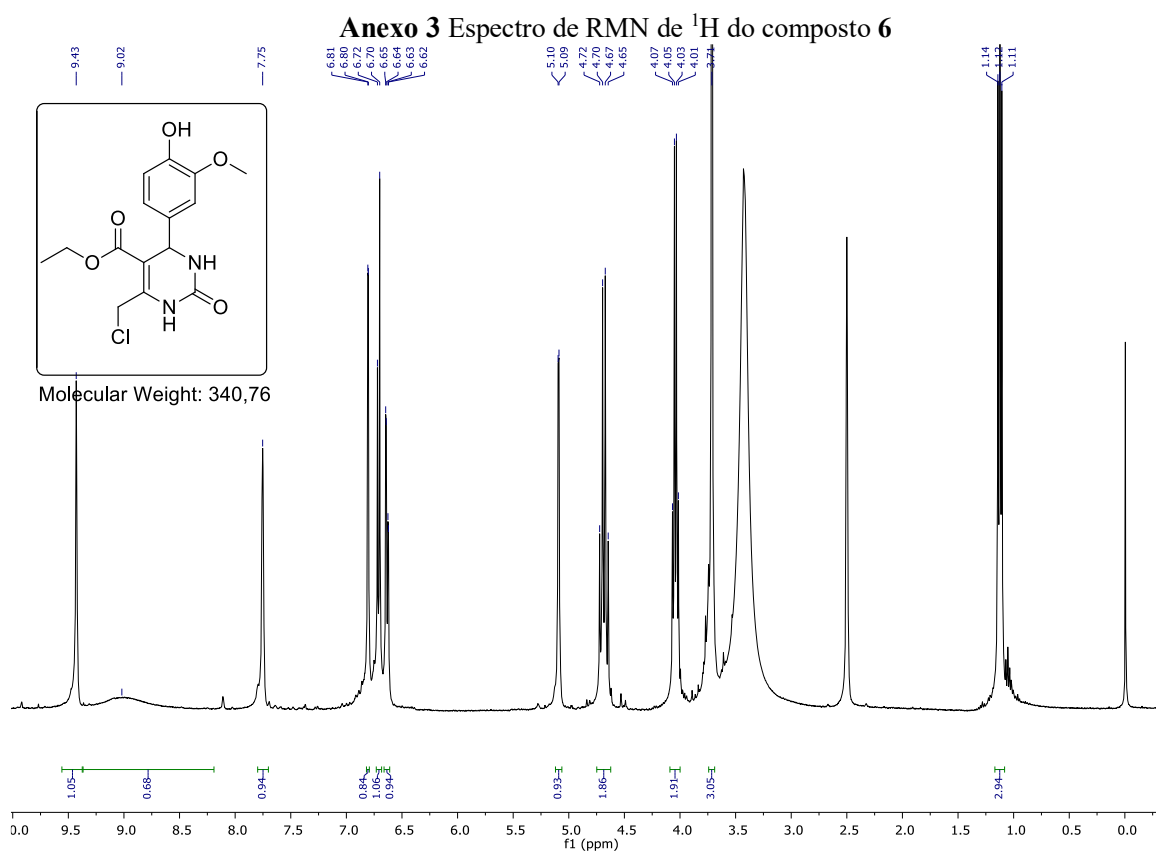
ANEXO –

Anexo 1 Espectro de HRMS do composto 6

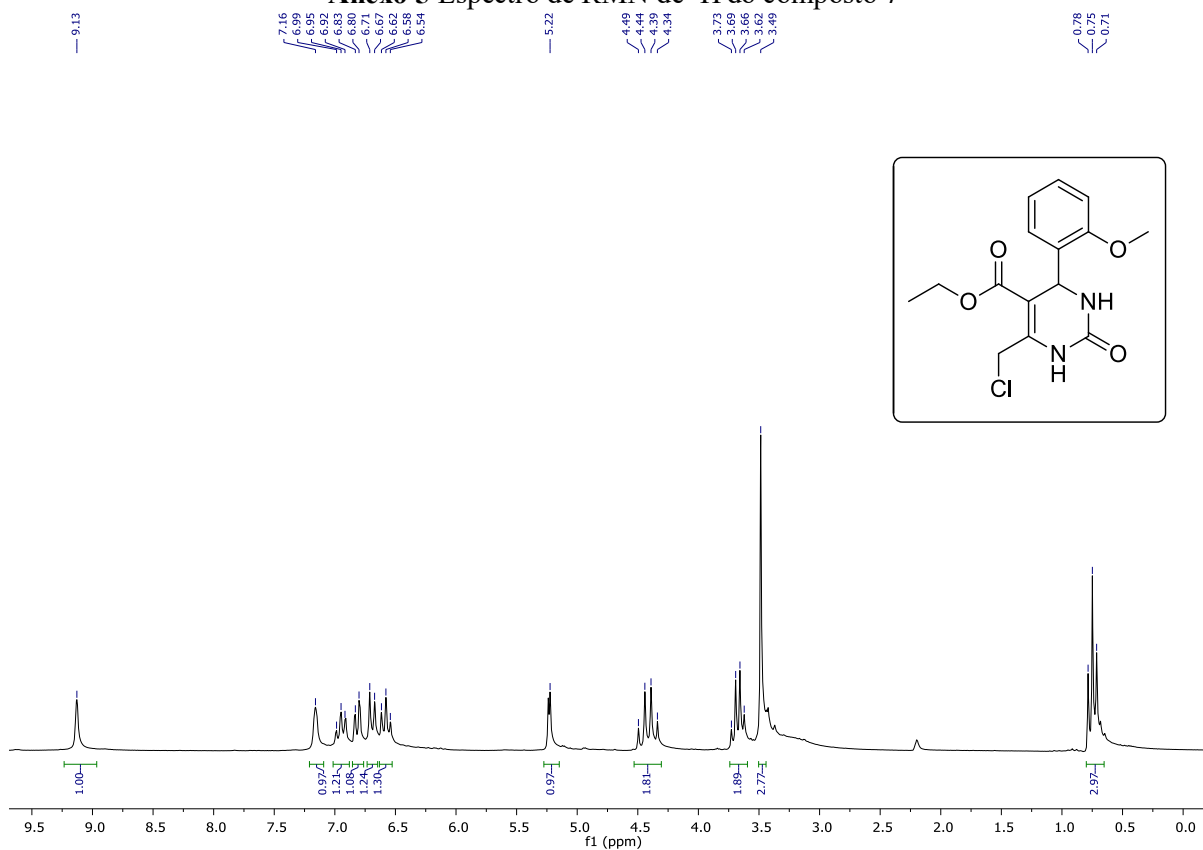


Anexo 2 Estrutura de IV do composto 6

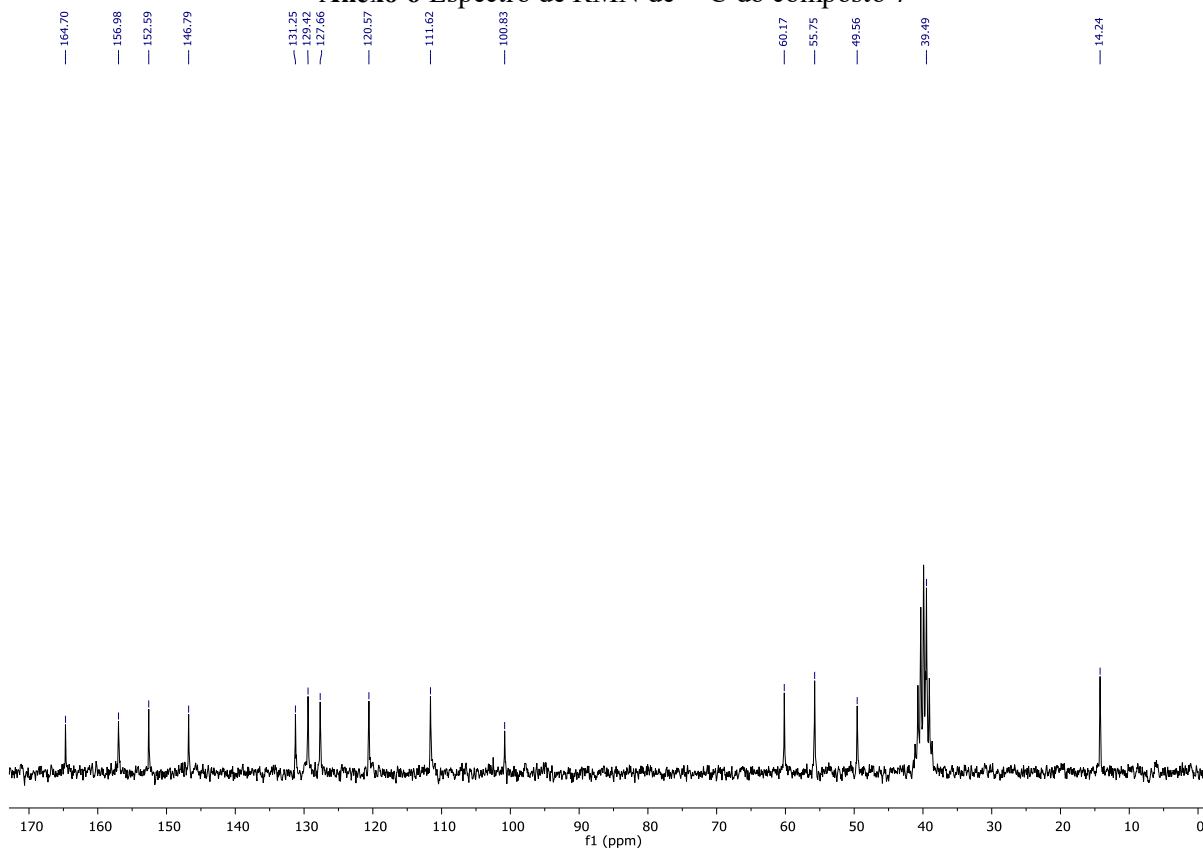




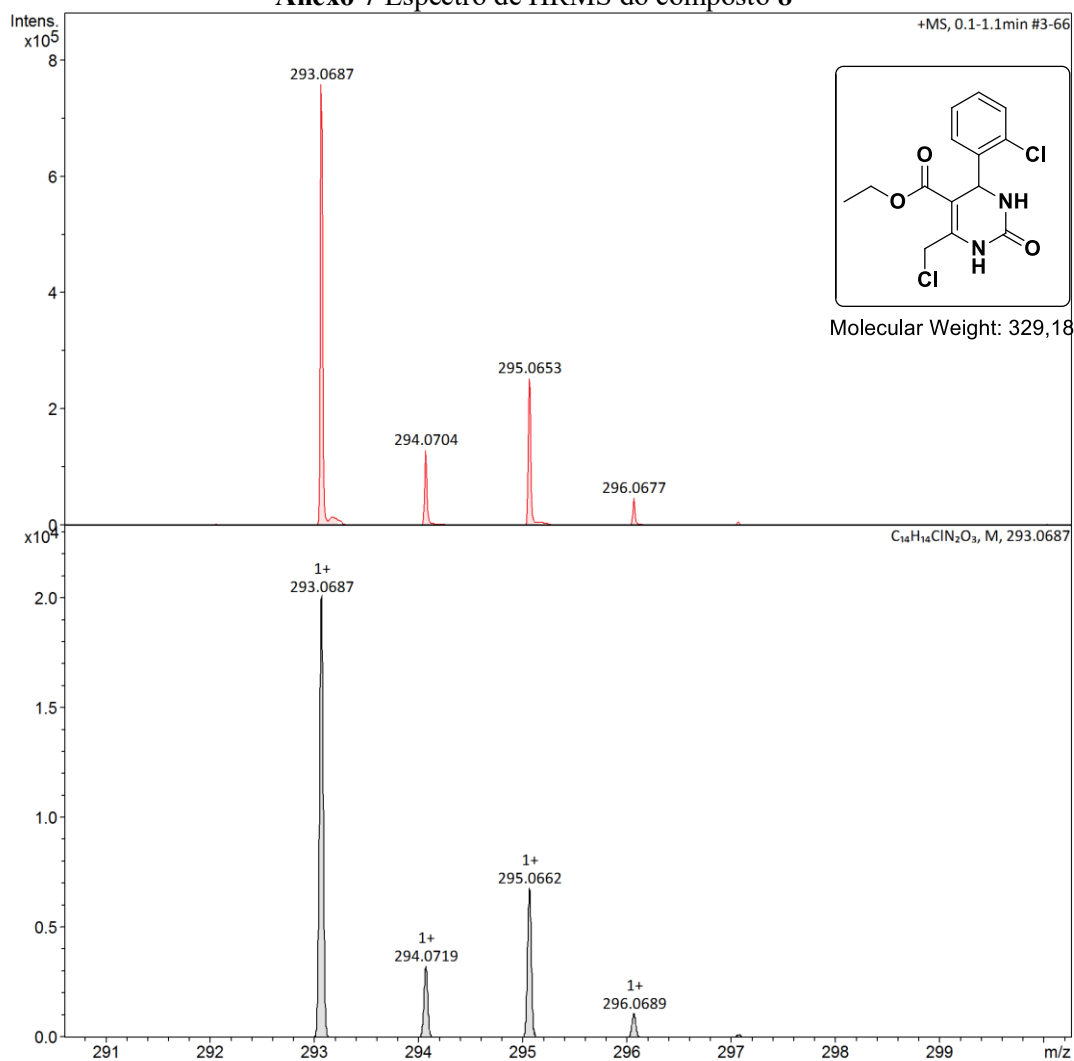
Anexo 5 Espectro de RMN de ^1H do composto 7



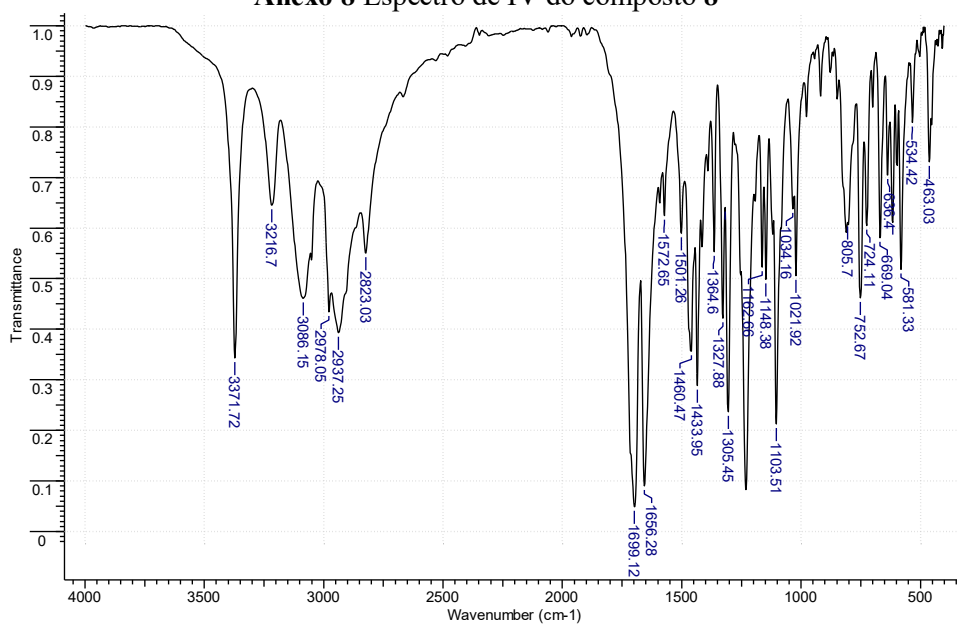
Anexo 6 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 7



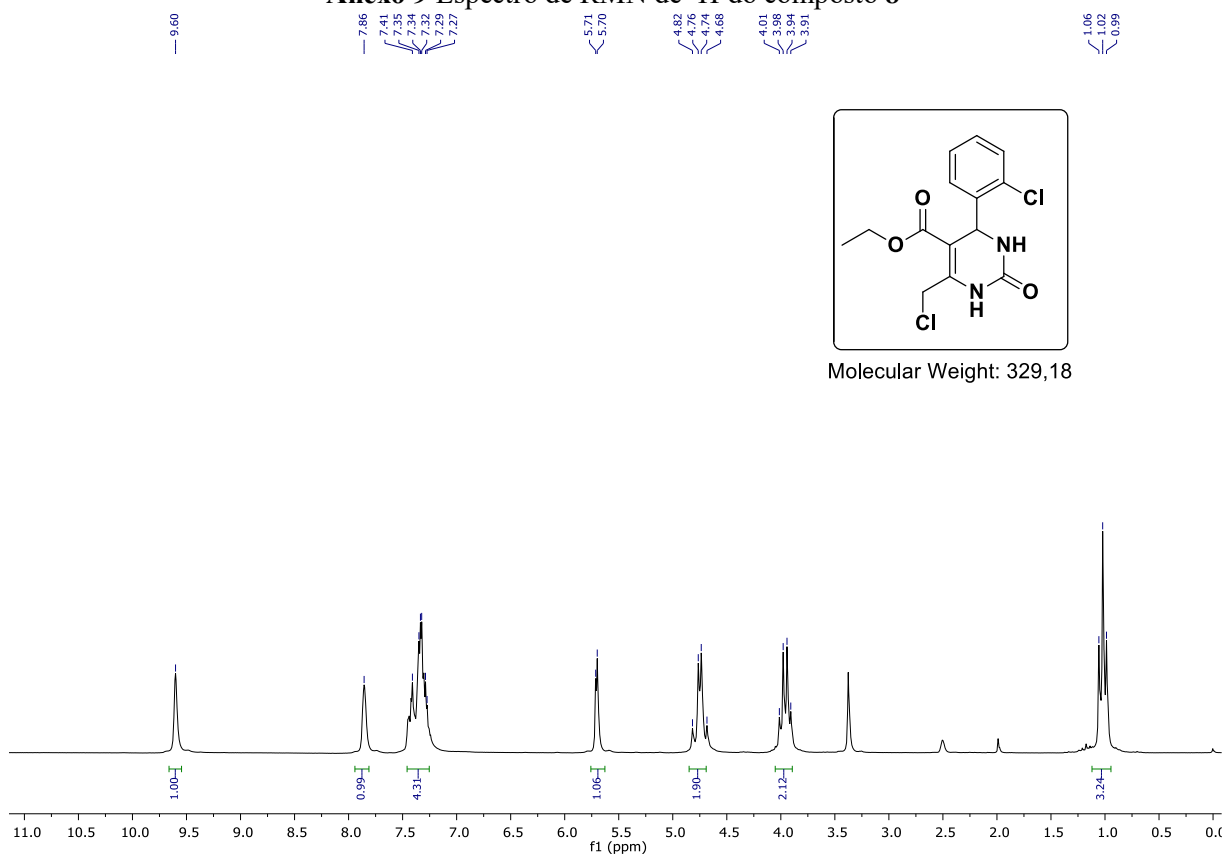
Anexo 7 Espectro de HRMS do composto 8



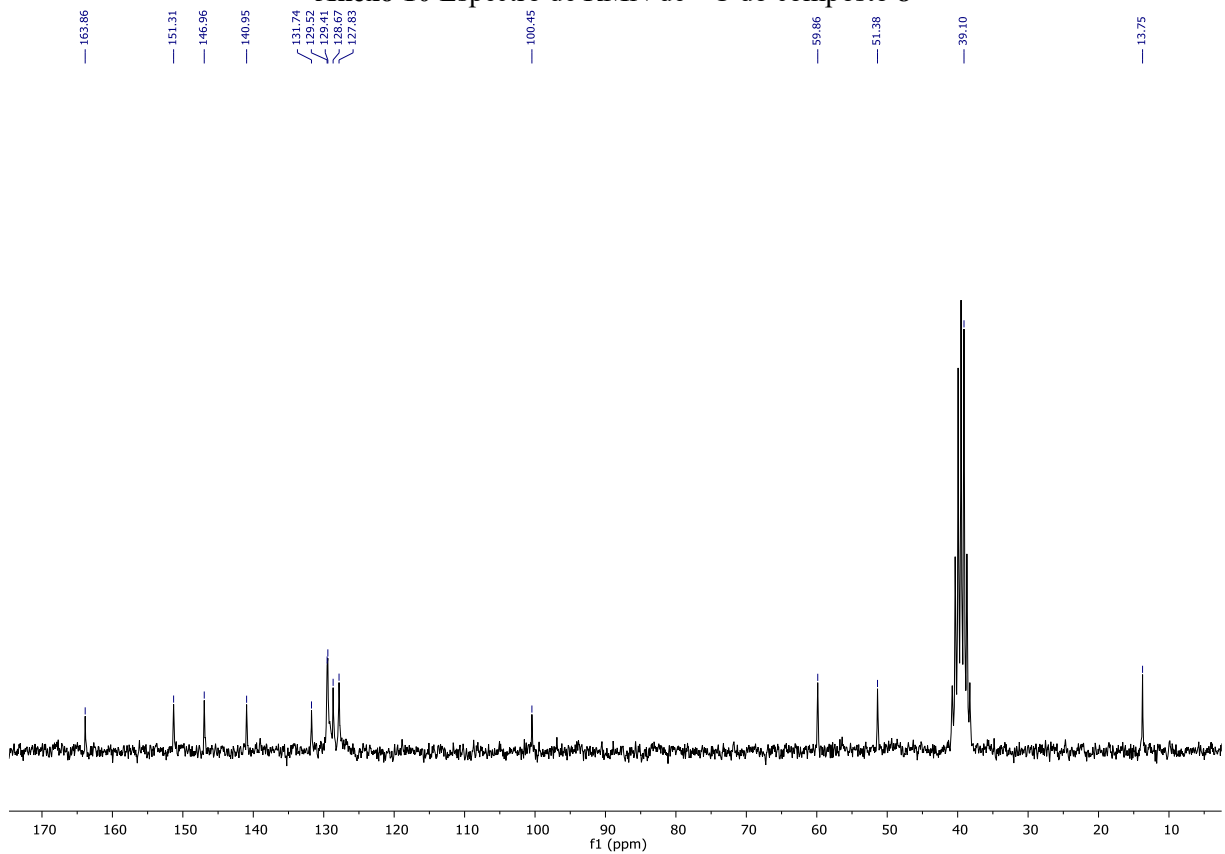
Anexo 8 Espectro de IV do composto 8



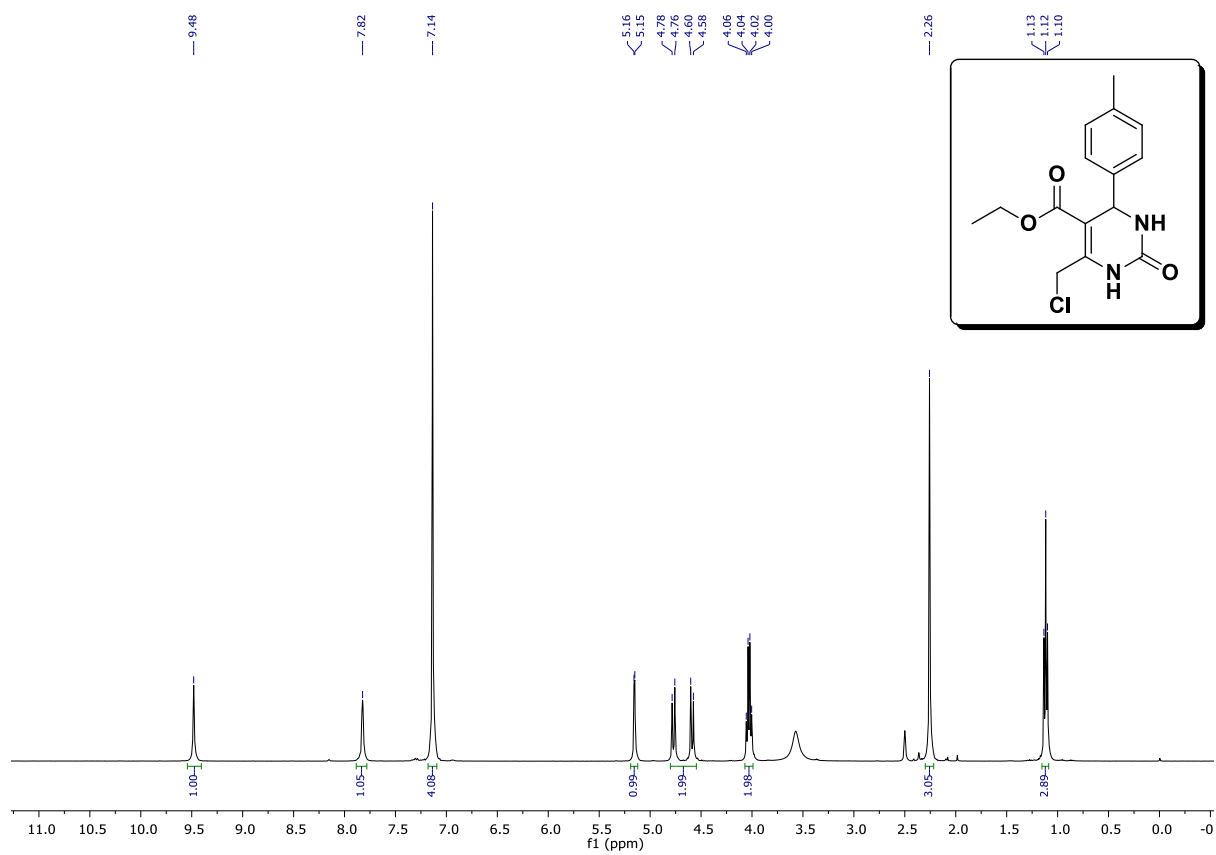
Anexo 9 Espectro de RMN de ^1H do composto **8**



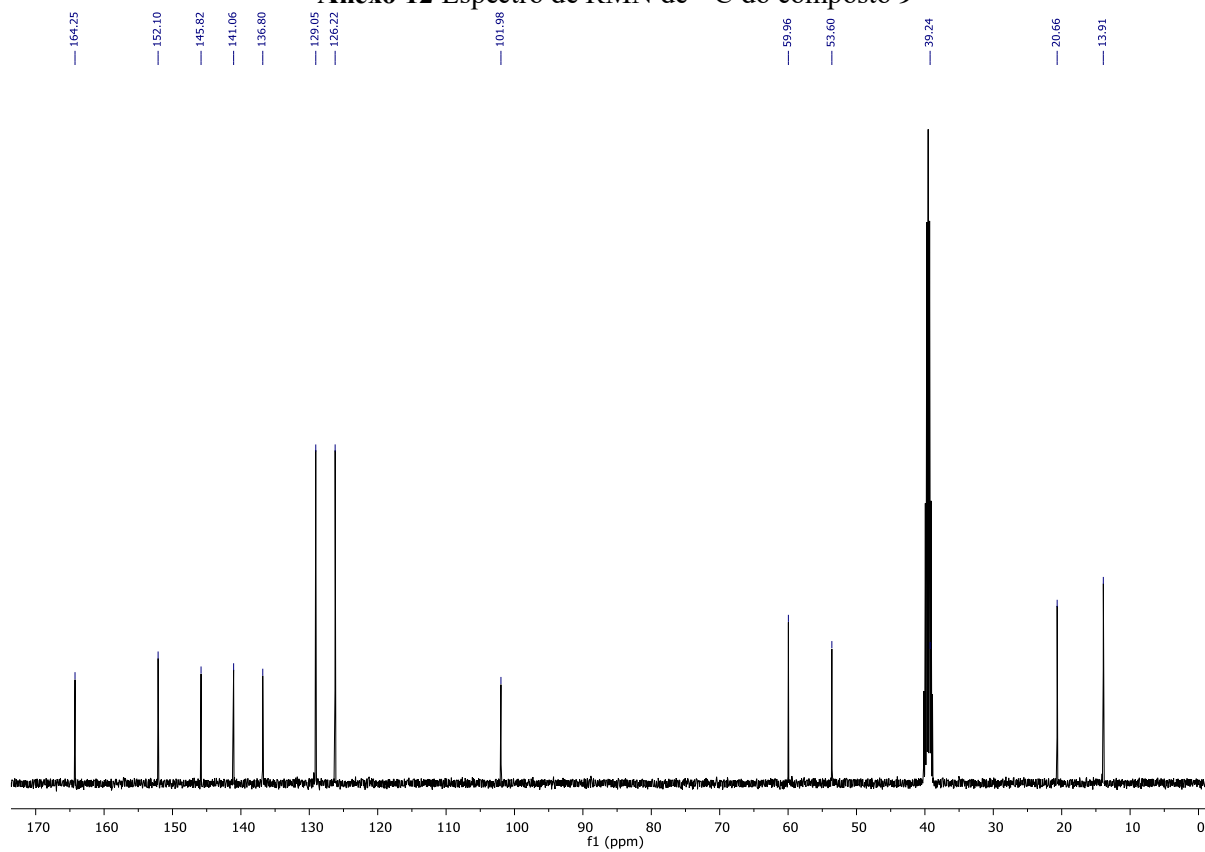
Anexo 10 Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8**



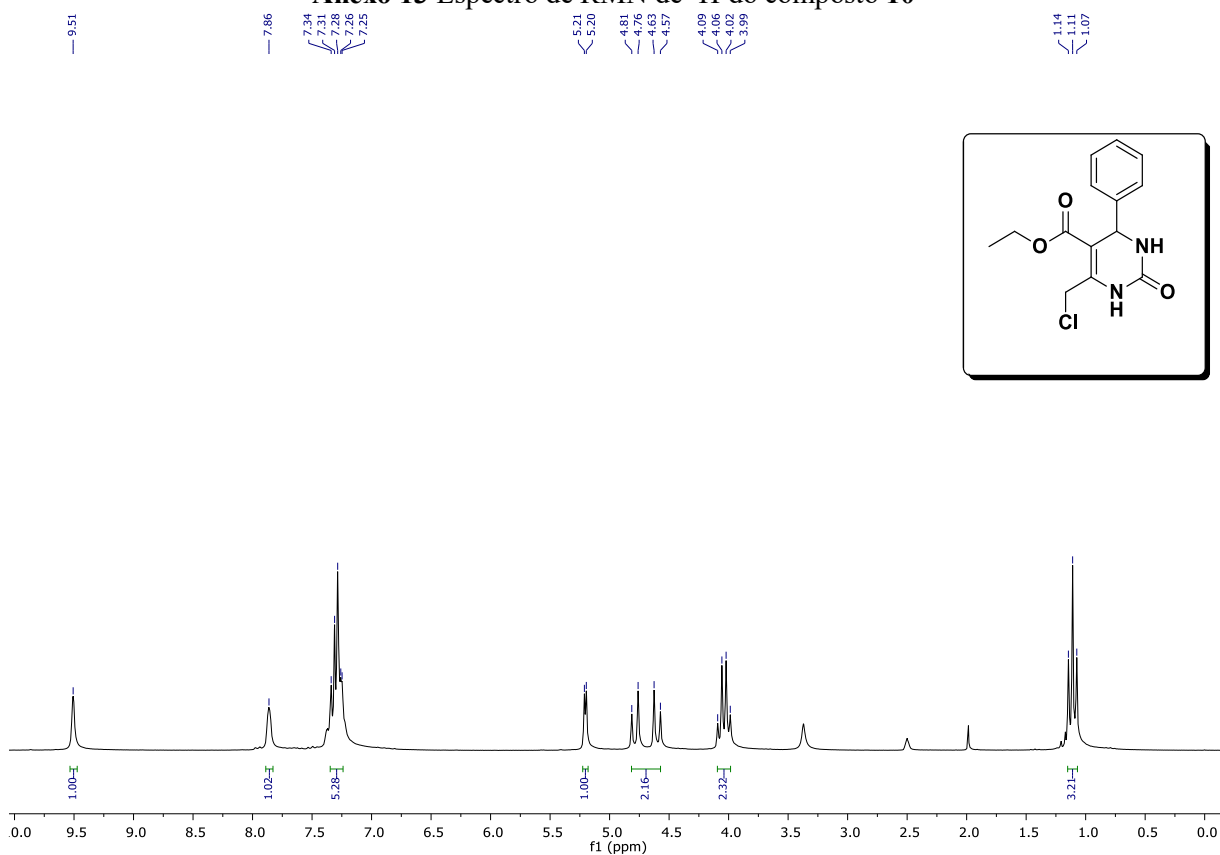
Anexo 11 Espectro de RMN de ^1H do composto 9



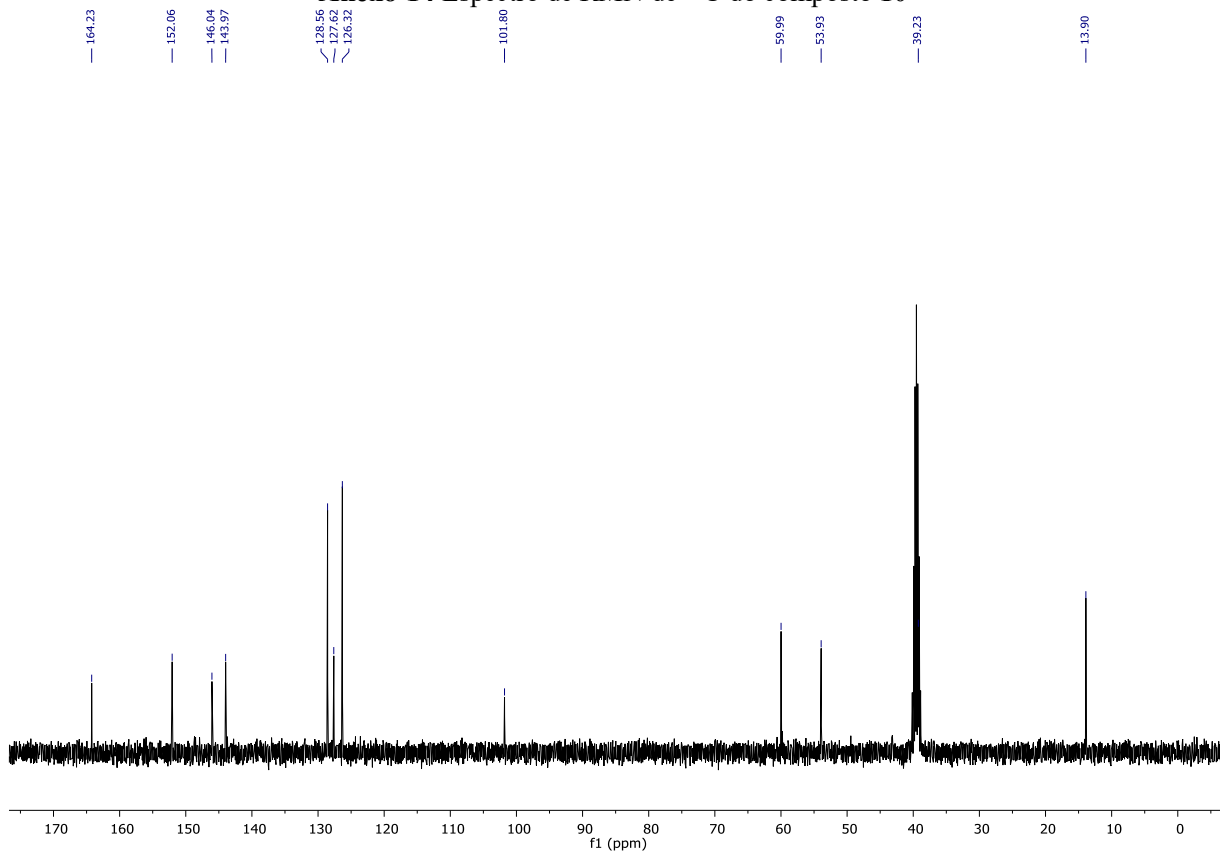
Anexo 12 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9



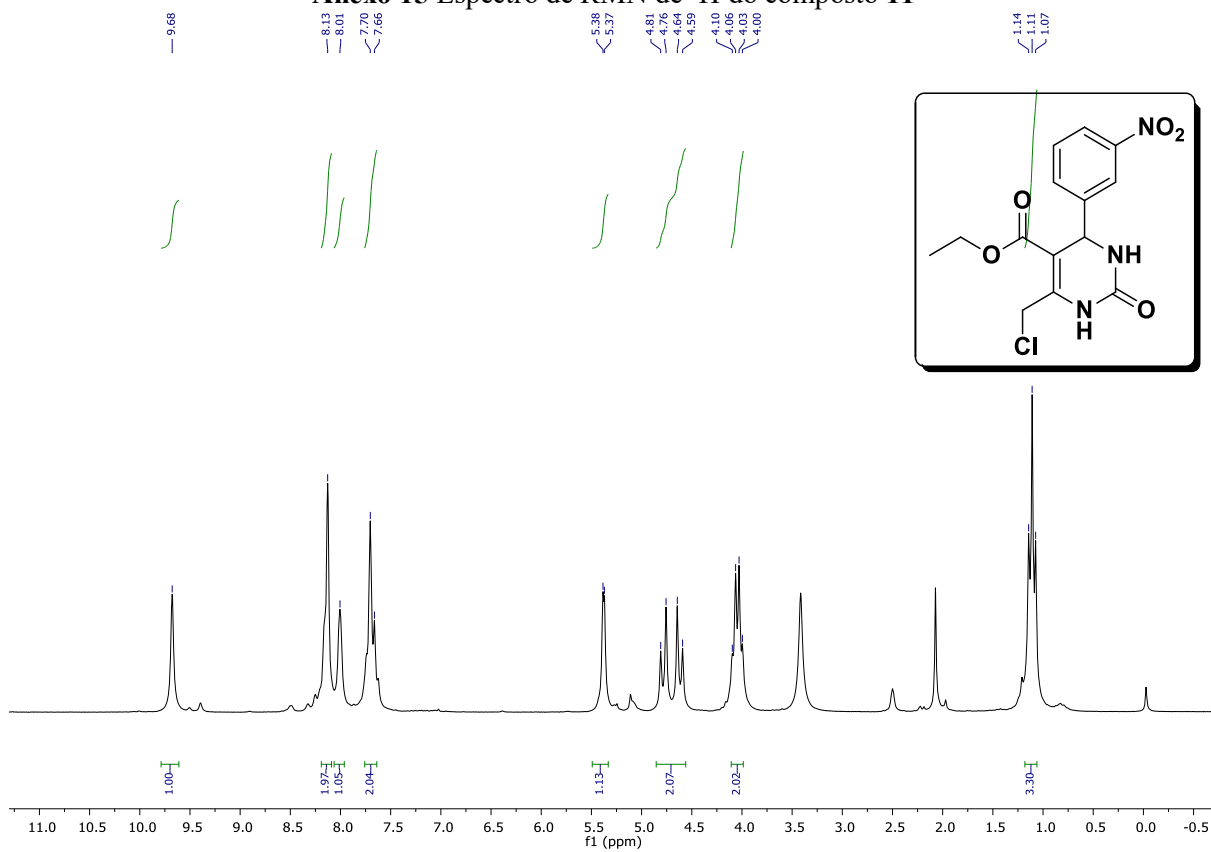
Anexo 13 Espectro de RMN de ^1H do composto 10



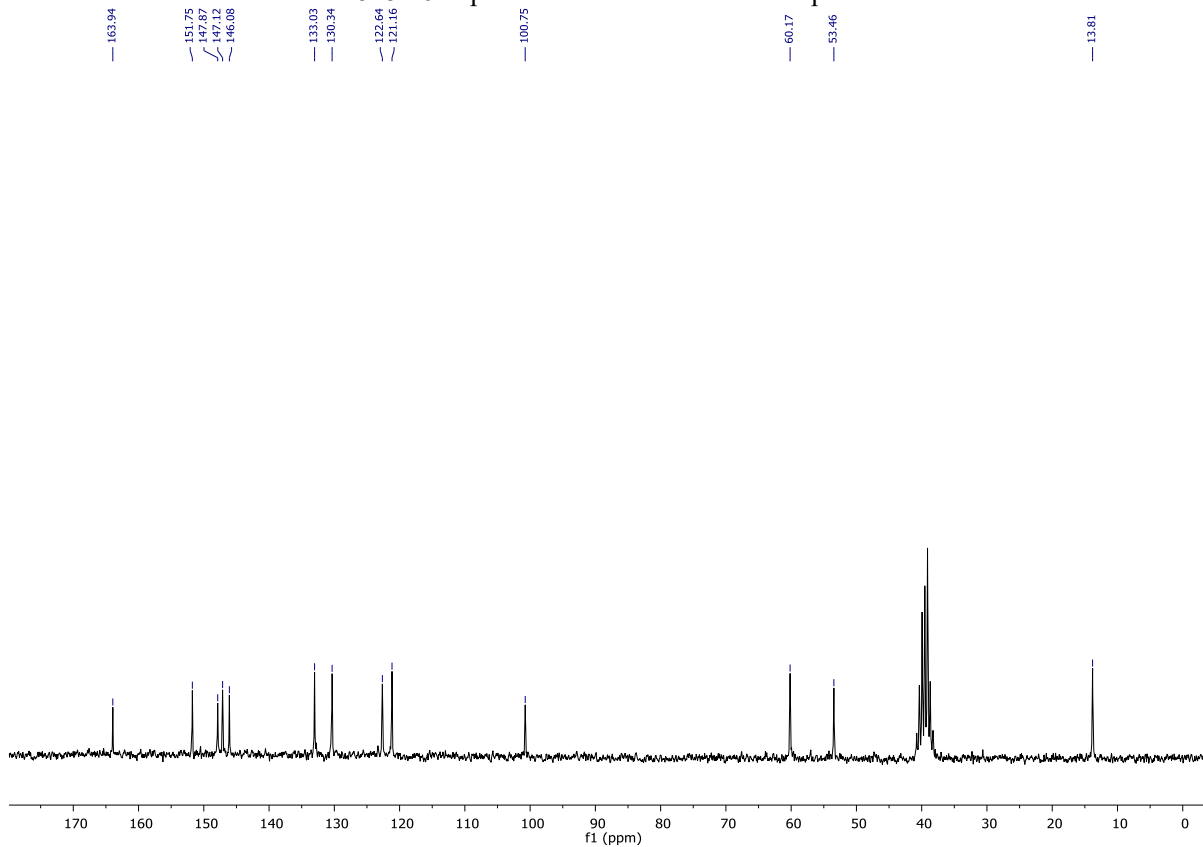
Anexo 14 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10



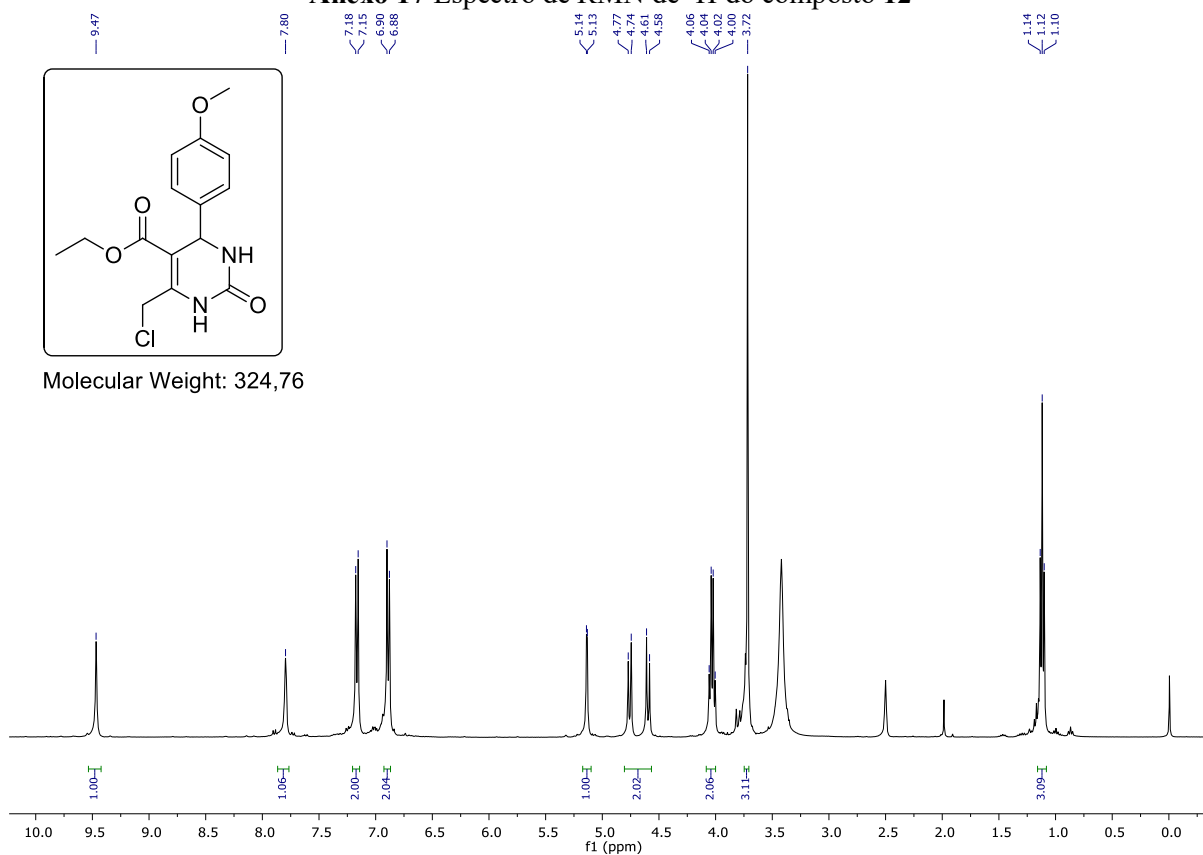
Anexo 15 Espectro de RMN de ^1H do composto 11



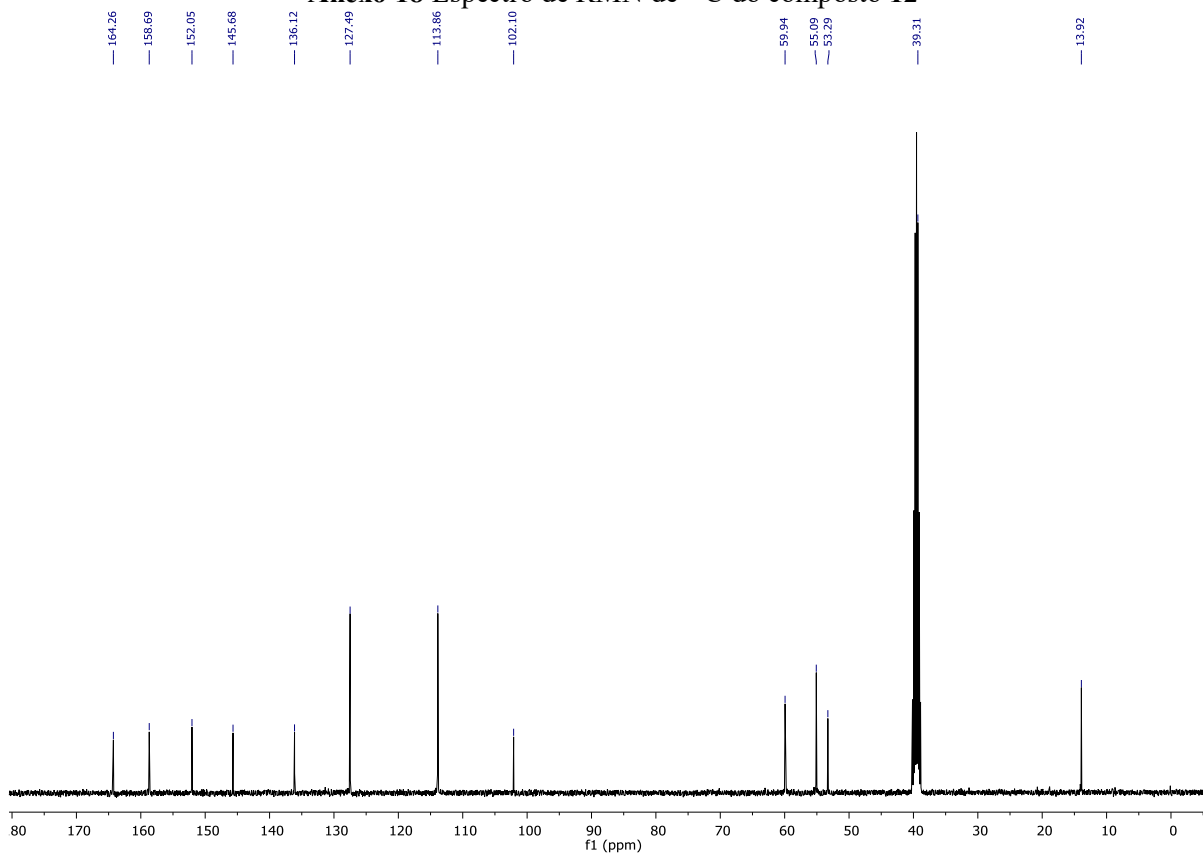
Anexo 16 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 11



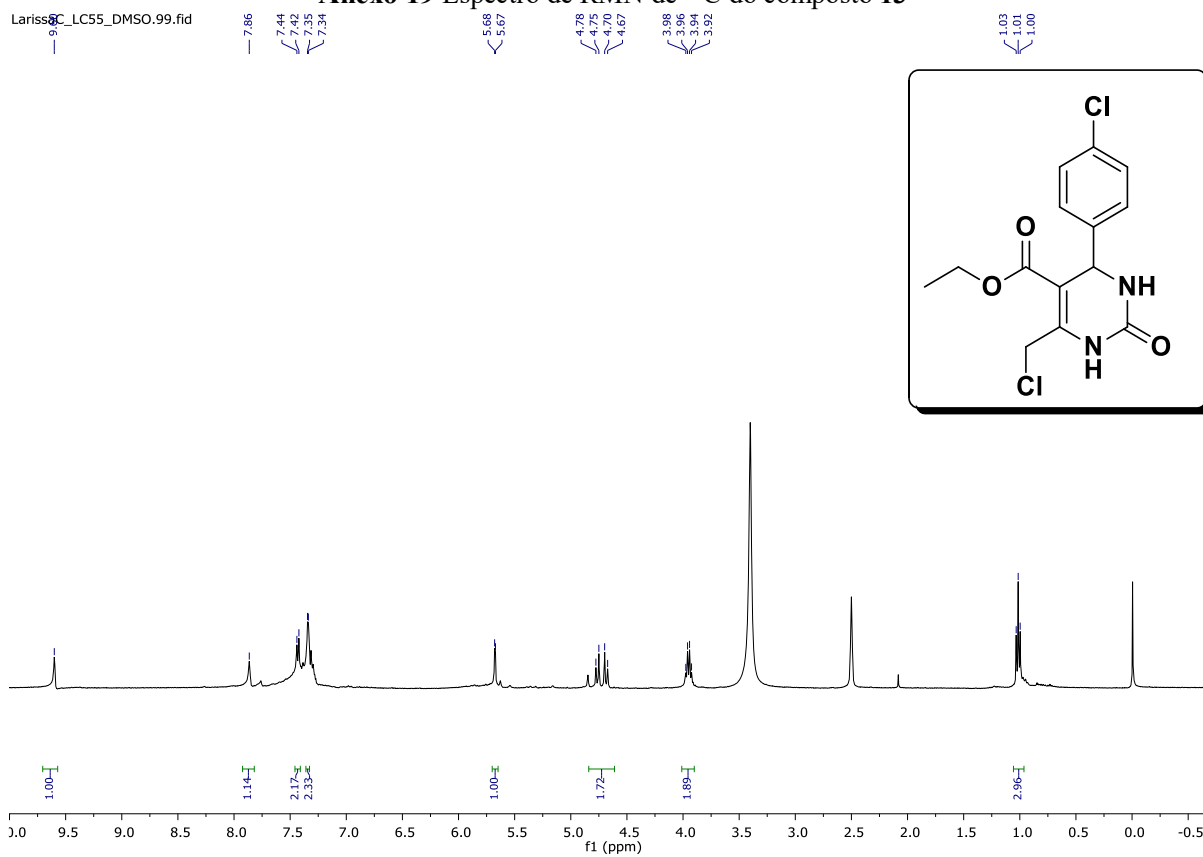
Anexo 17 Espectro de RMN de ^1H do composto 12



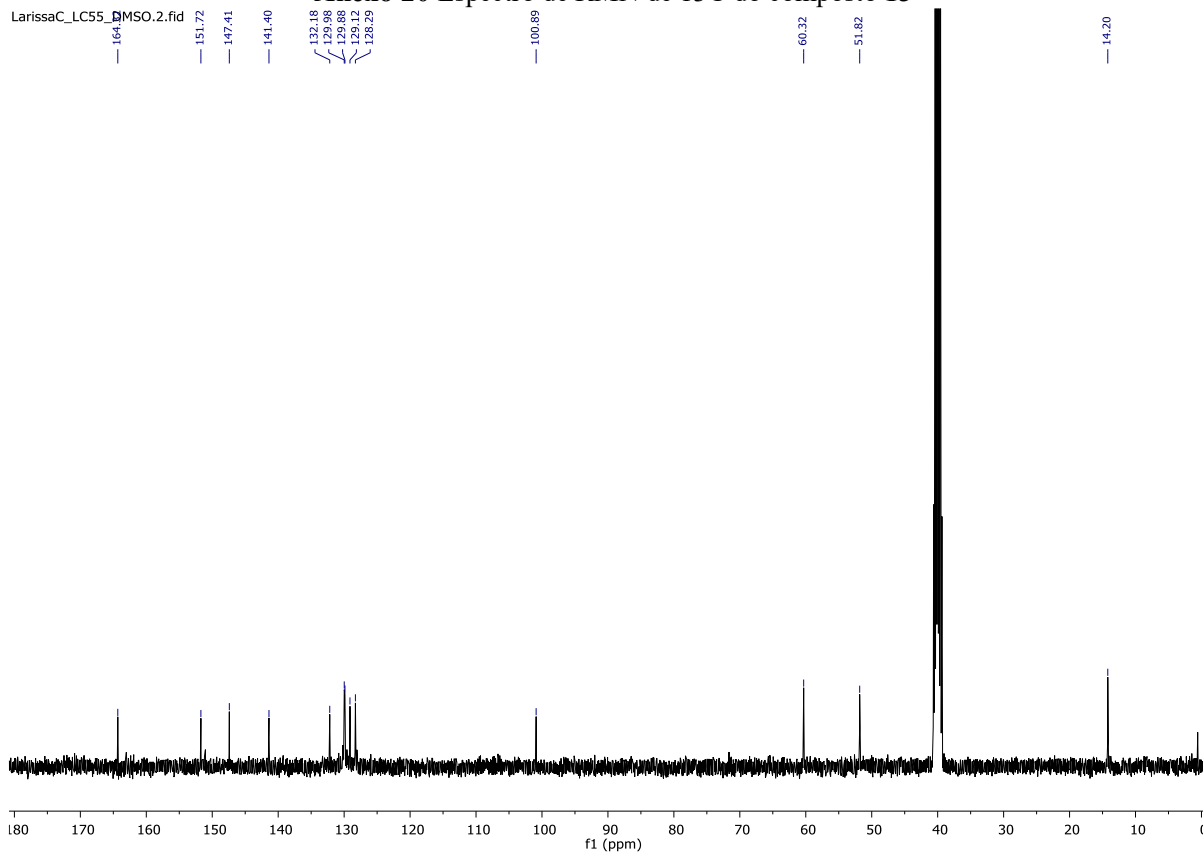
Anexo 18 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12



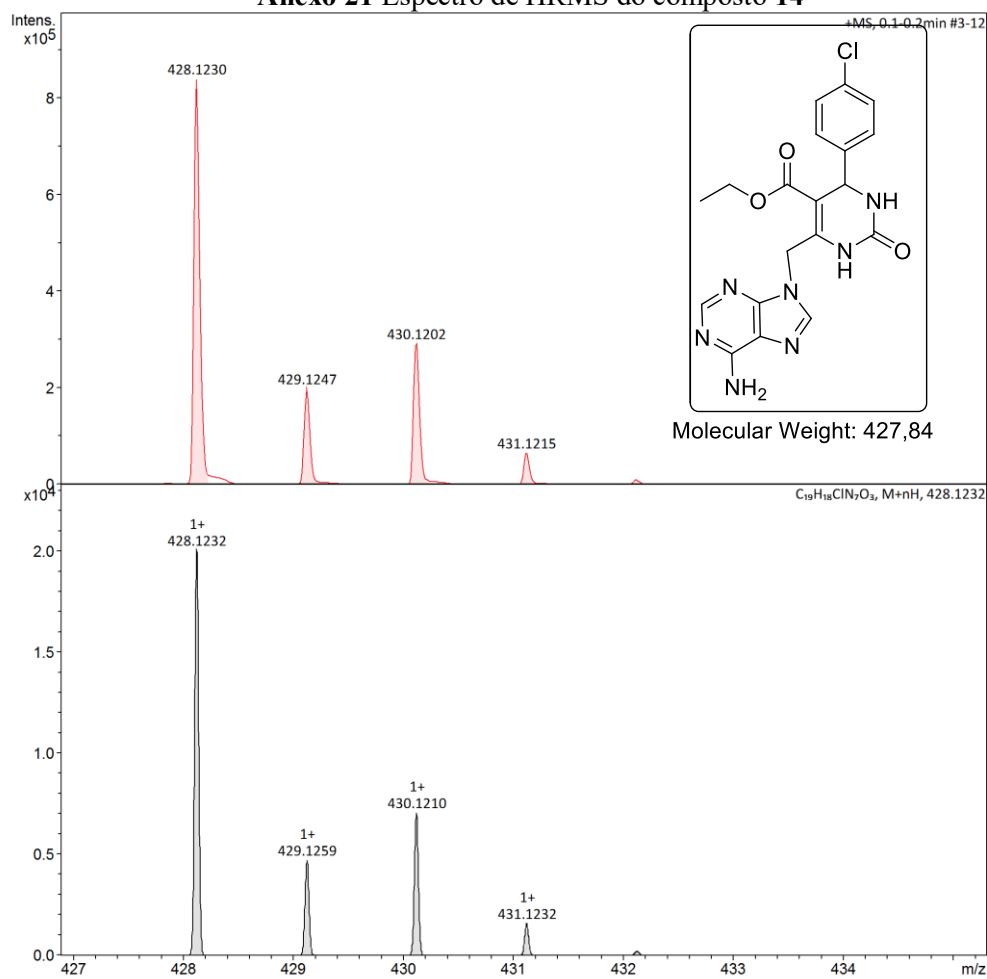
Anexo 19 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 13



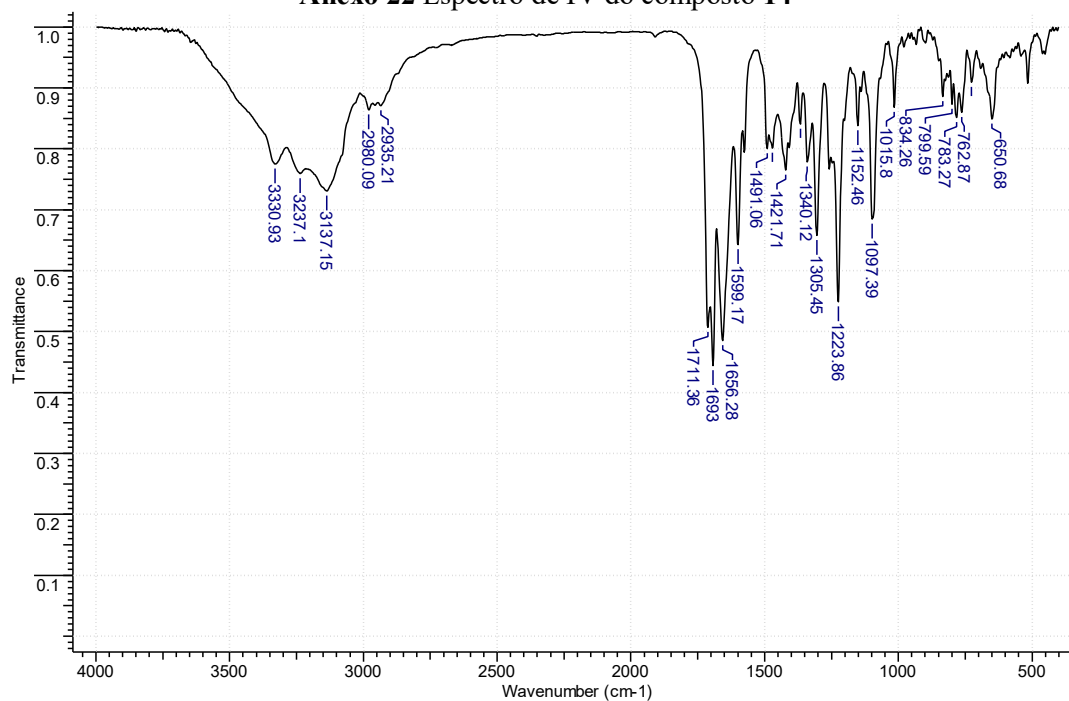
Anexo 20 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 13

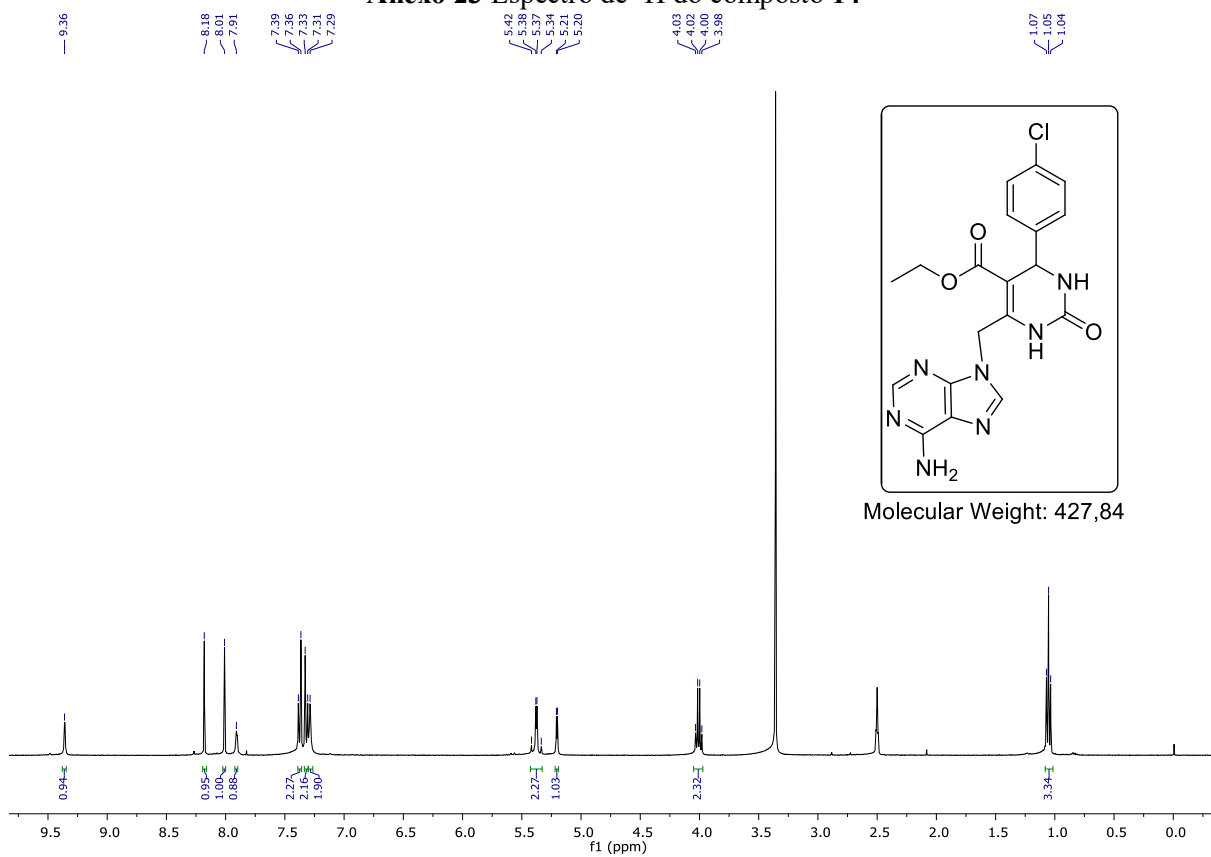
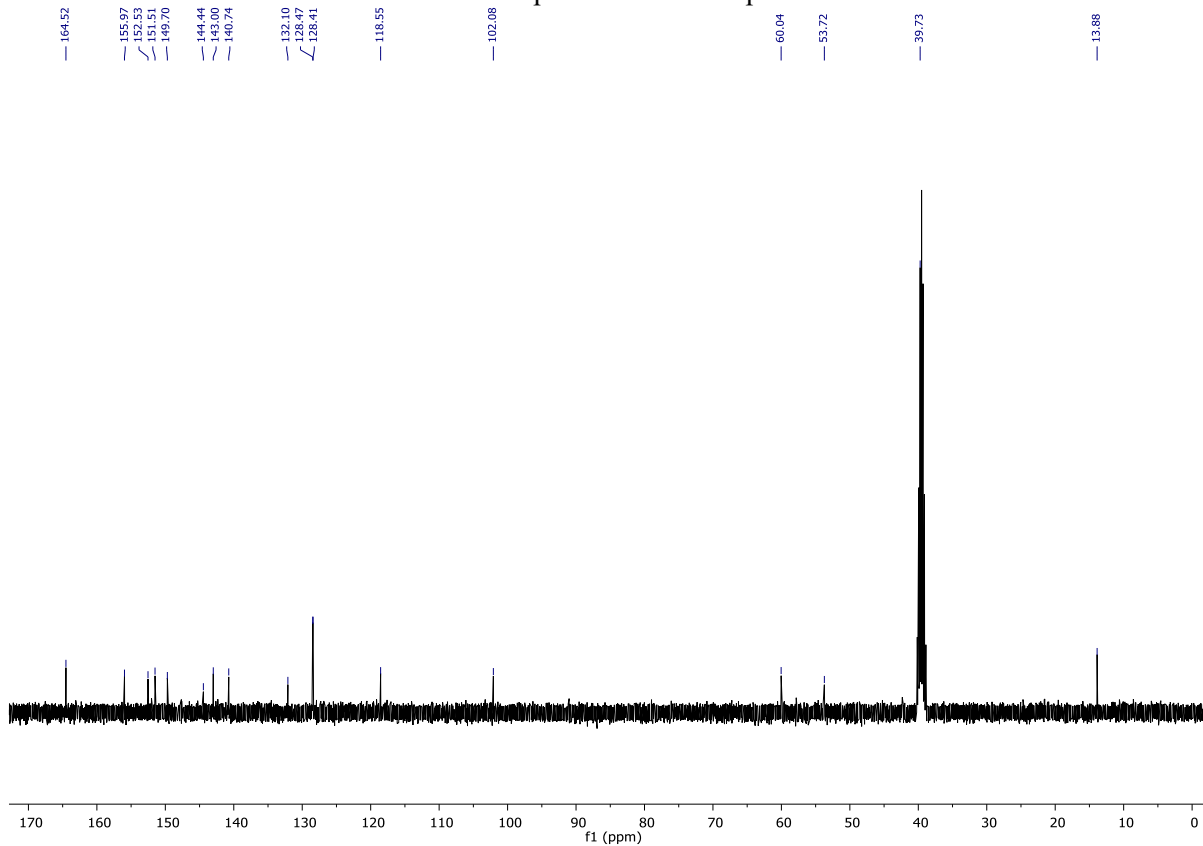


Anexo 21 Espectro de HRMS do composto 14

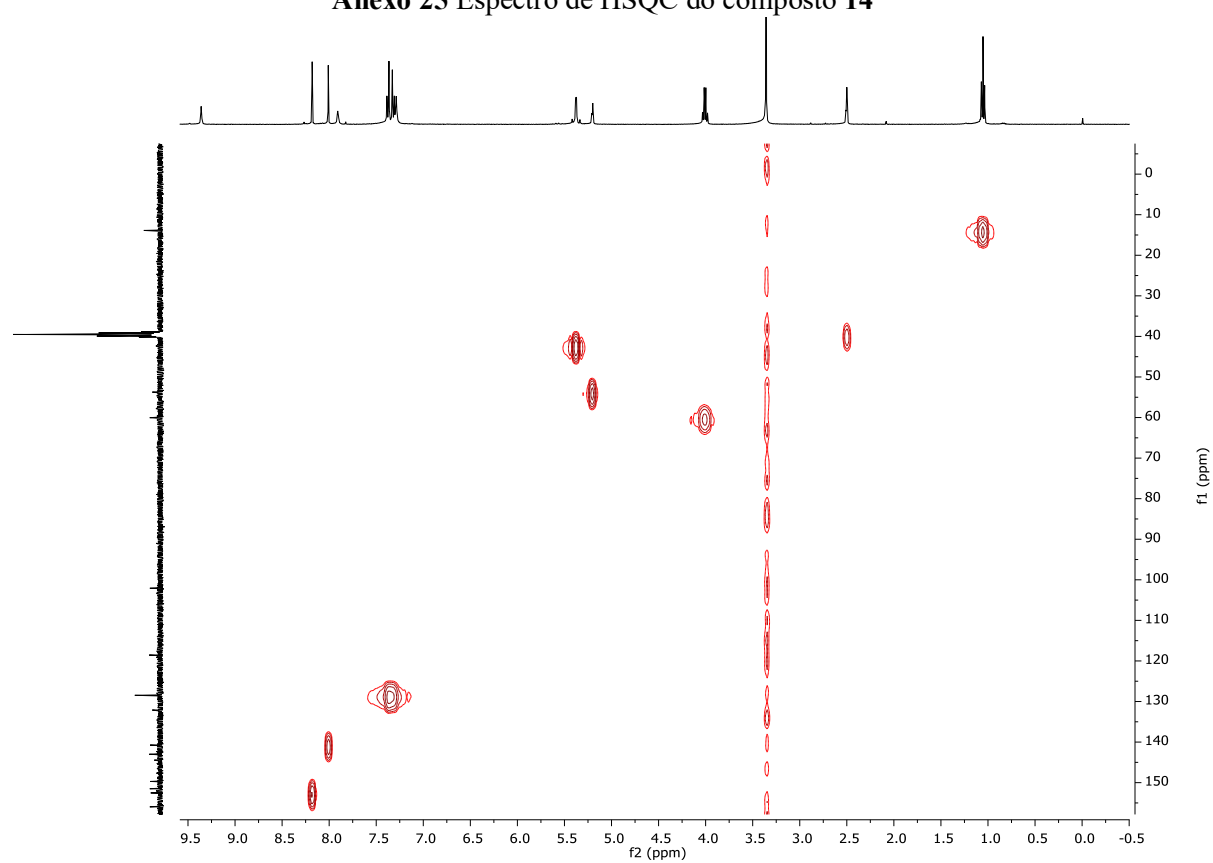


Anexo 22 Espectro de IV do composto 14

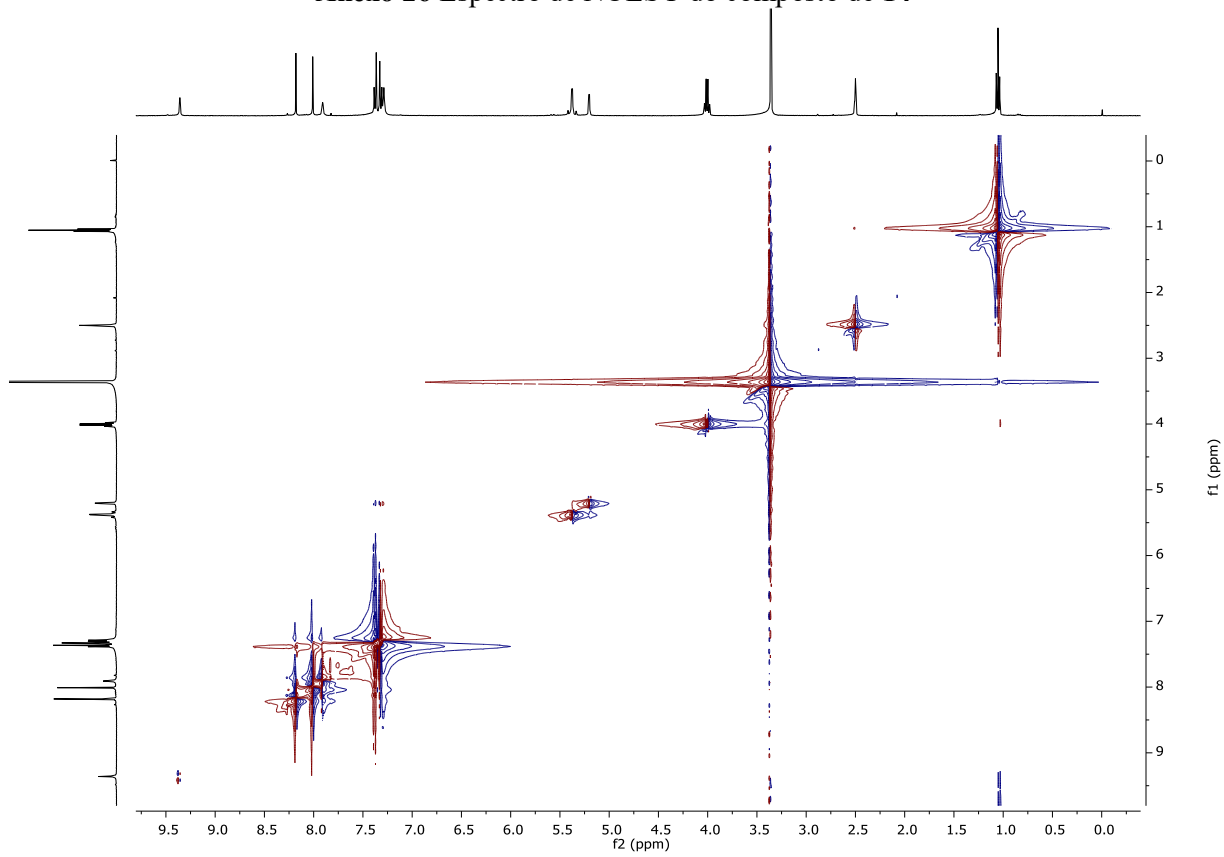


Anexo 23 Espectro de ^1H do composto 14Anexo 24 Espectro ^{13}C do composto 14

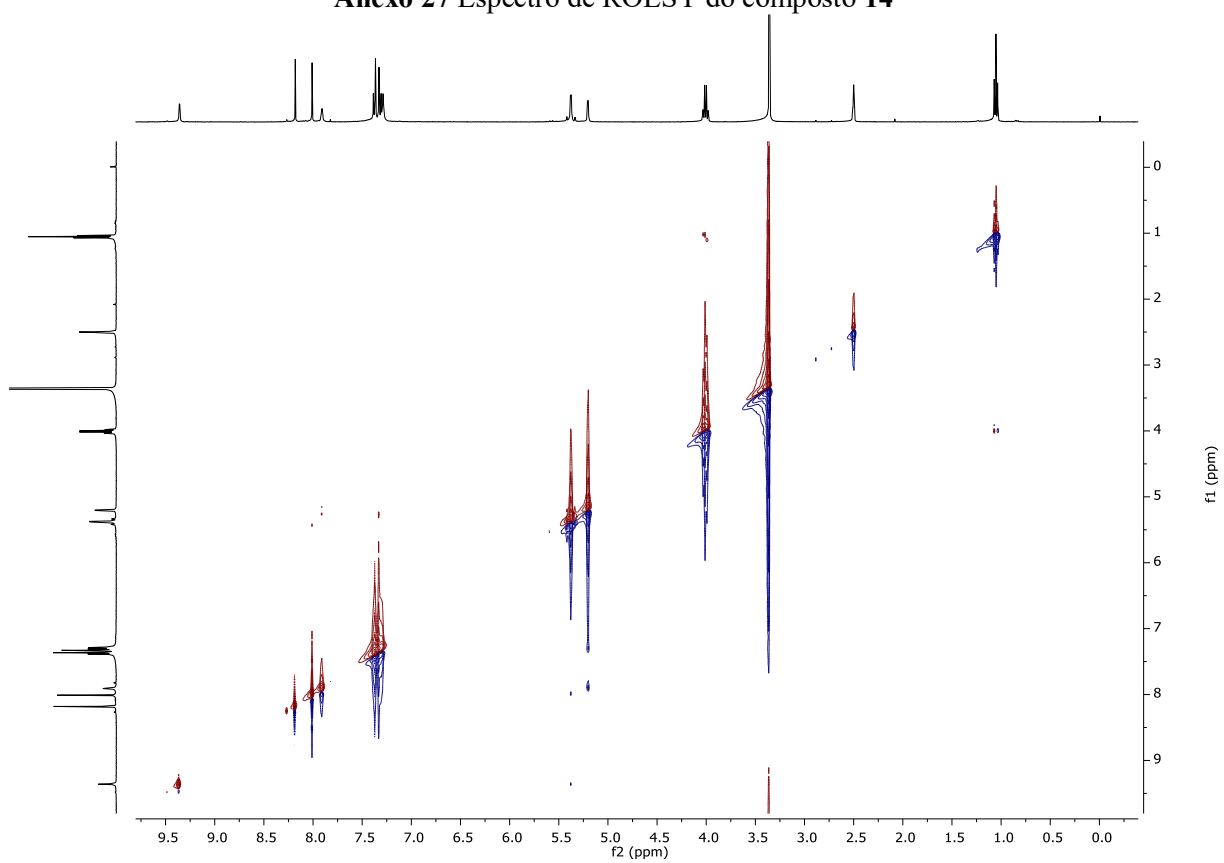
Anexo 25 Espectro de HSQC do composto 14



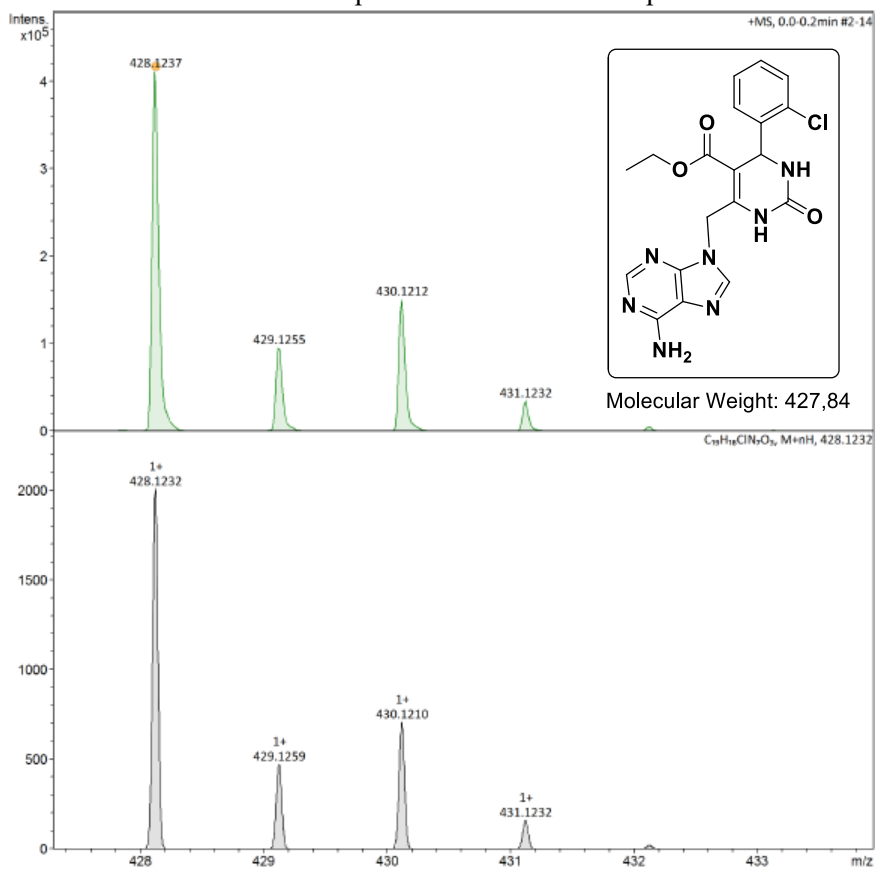
Anexo 26 Espectro de NOESY do composto de 14



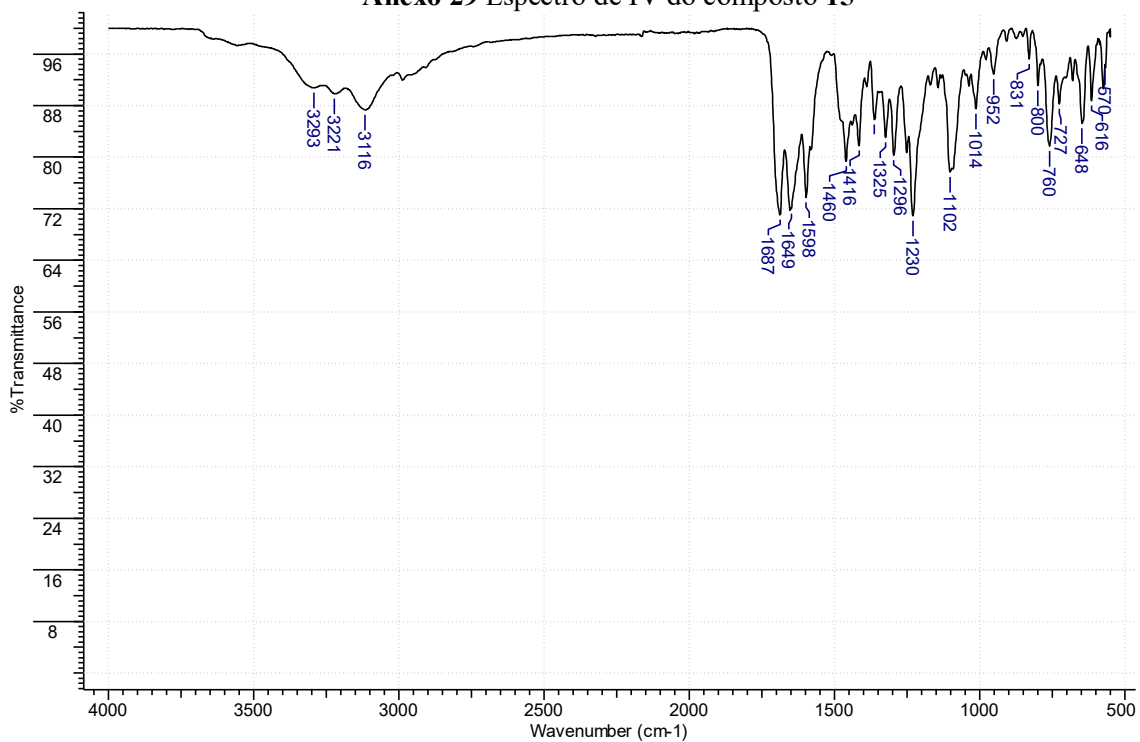
Anexo 27 Espectro de ROESY do composto 14



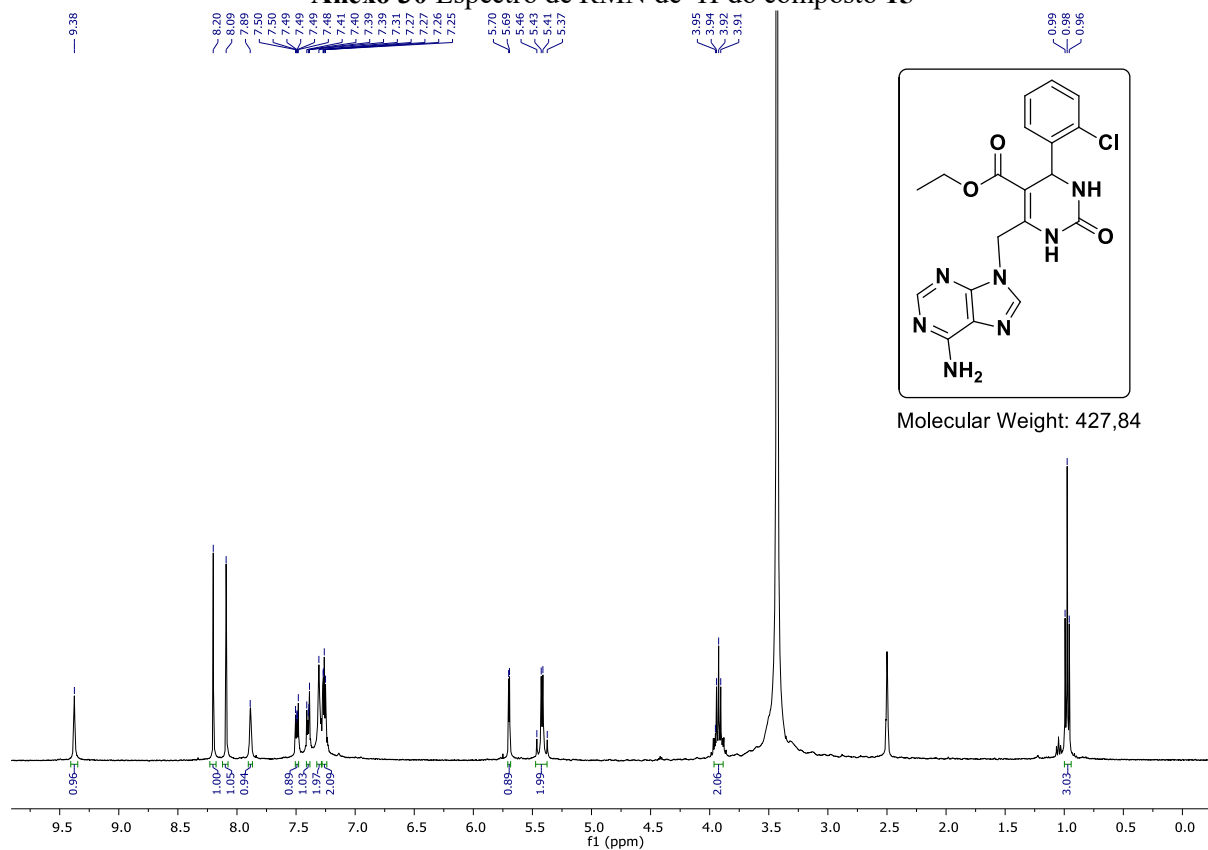
Anexo 28 Espectro de HRMS do composto 15



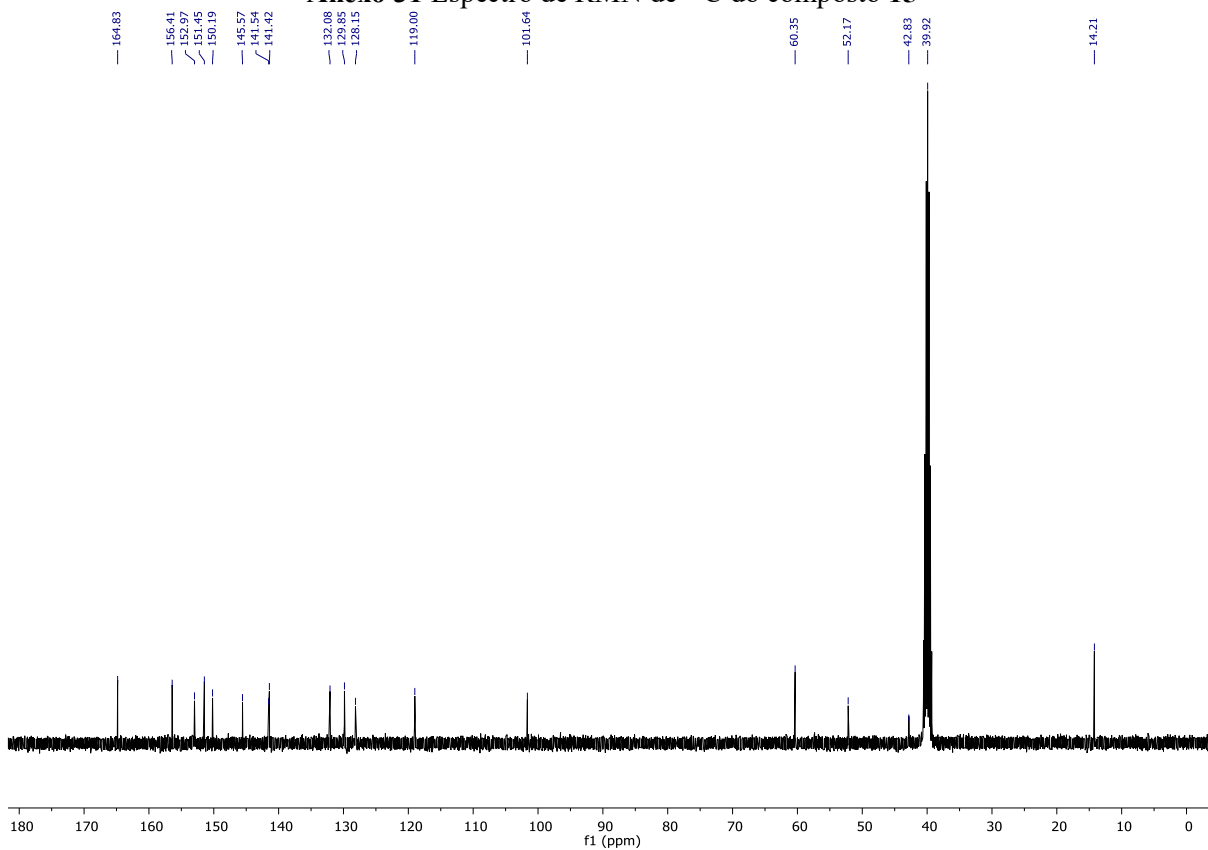
Anexo 29 Espectro de IV do composto 15

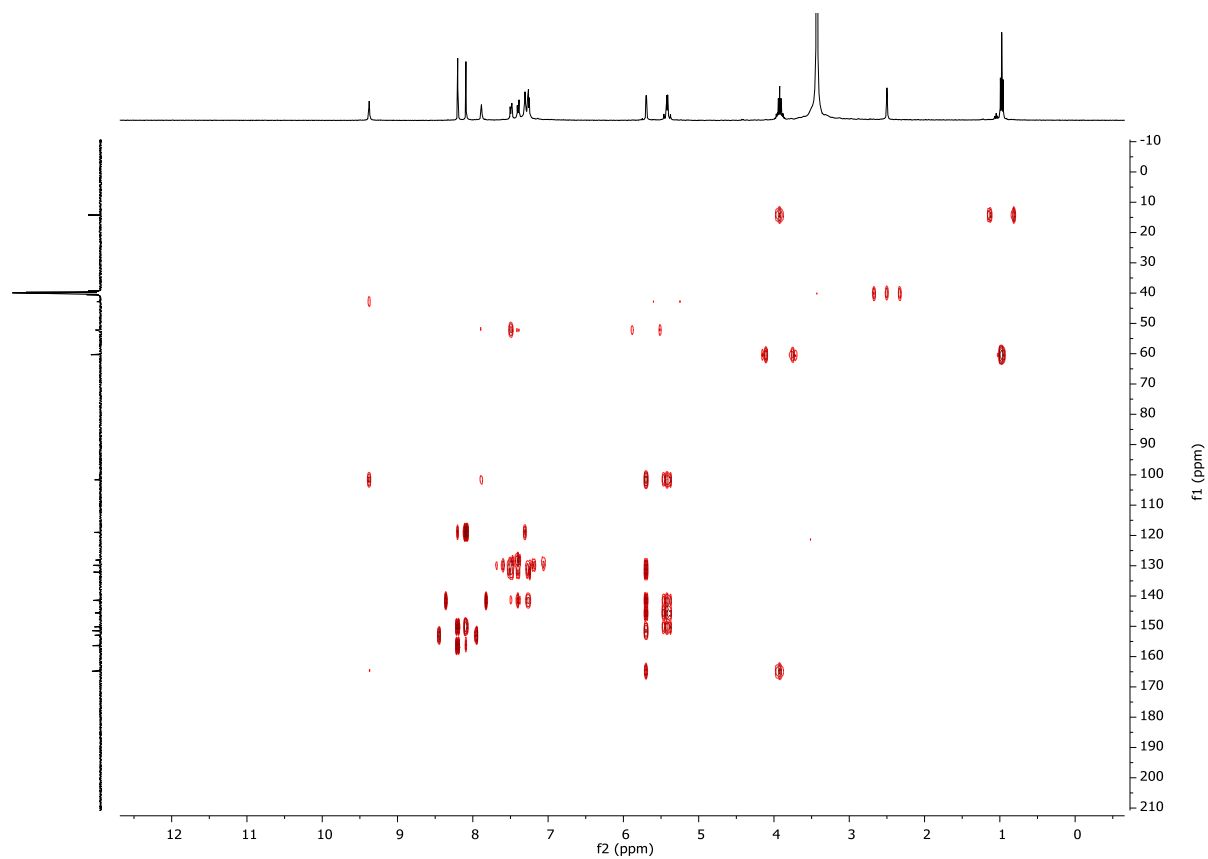
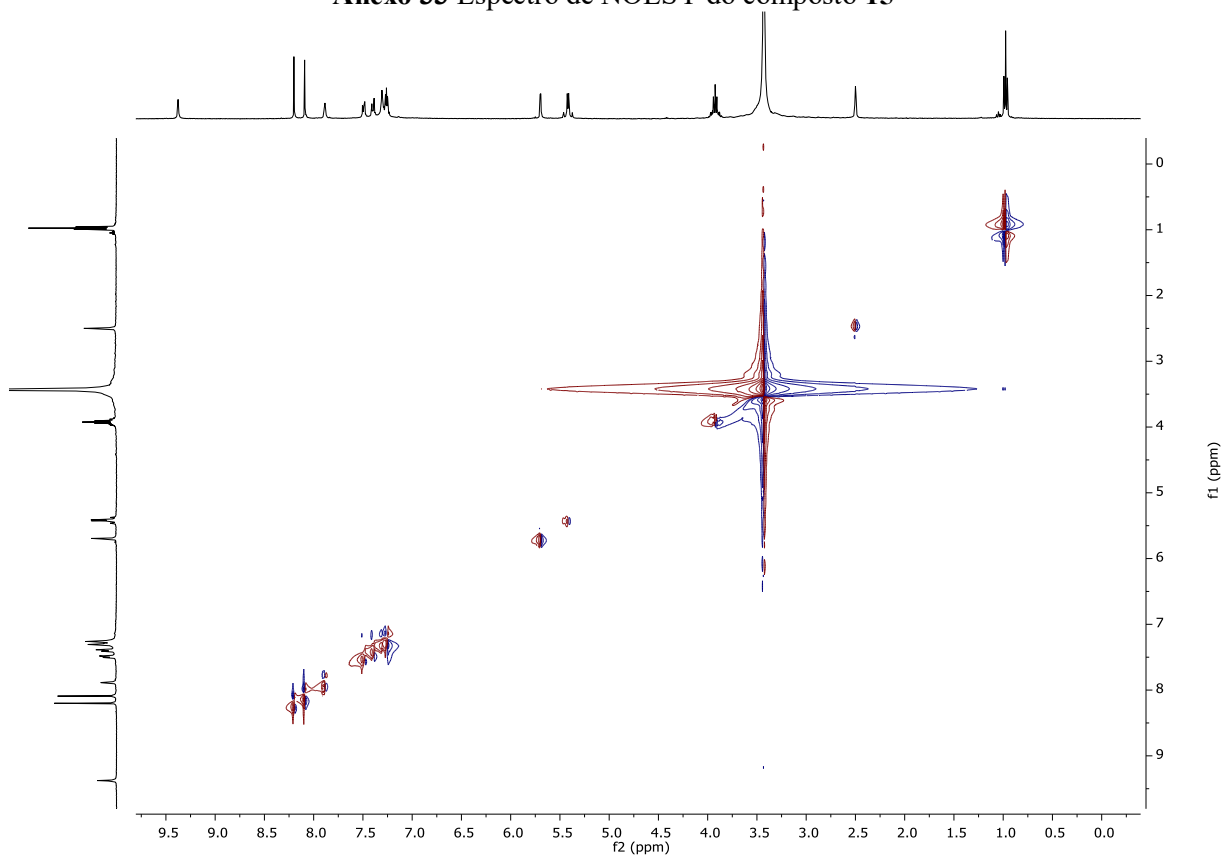


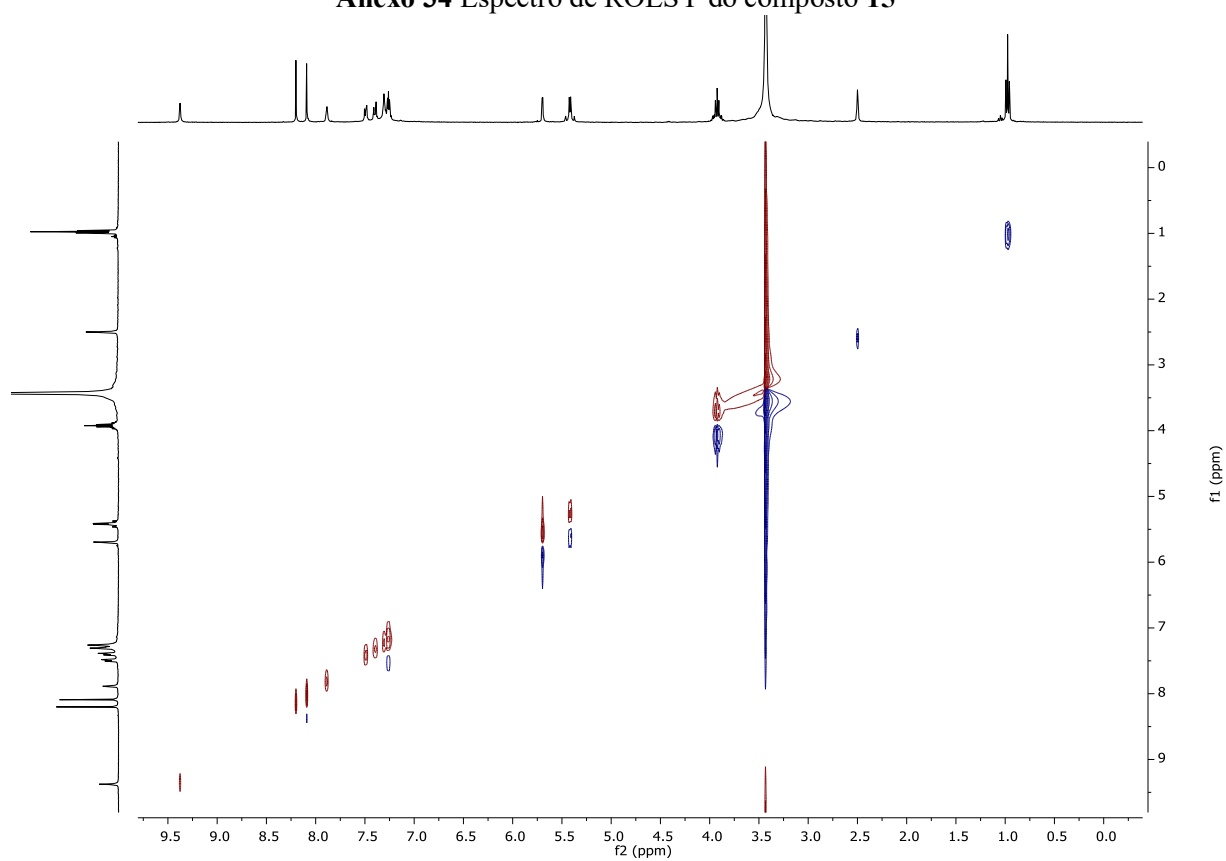
Anexo 30 Espectro de RMN de ^1H do composto 15



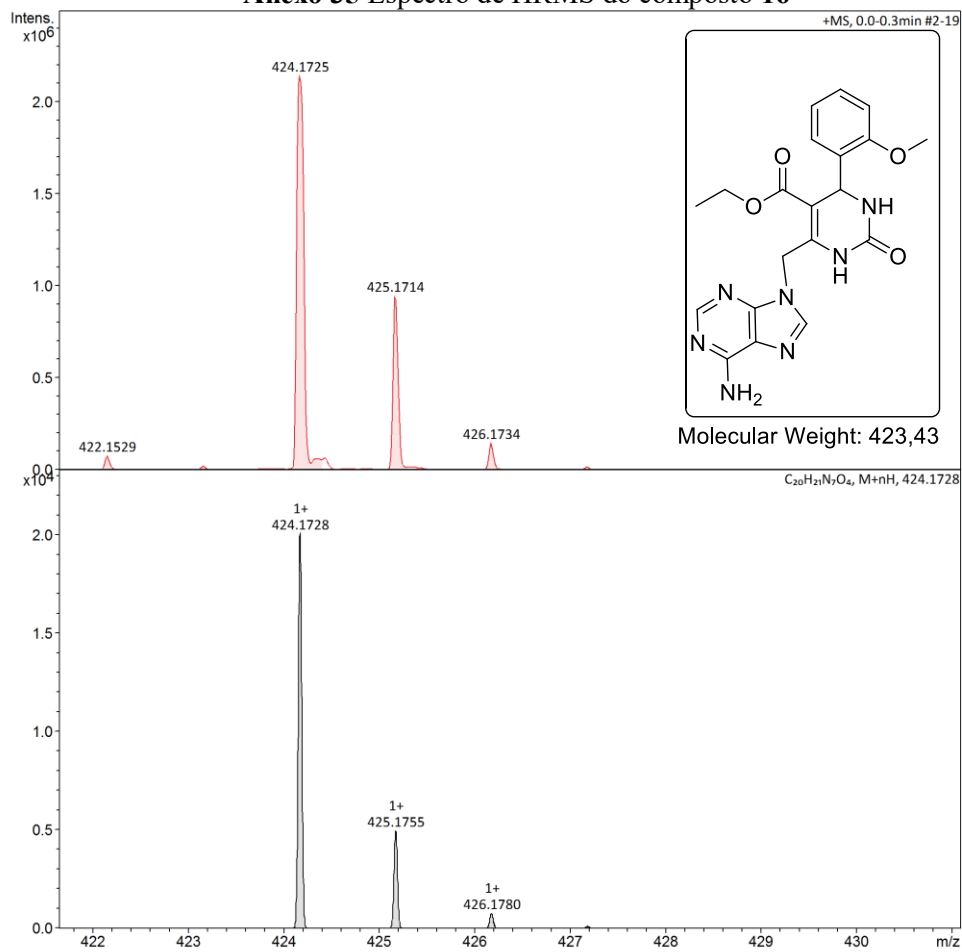
Anexo 31 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 15



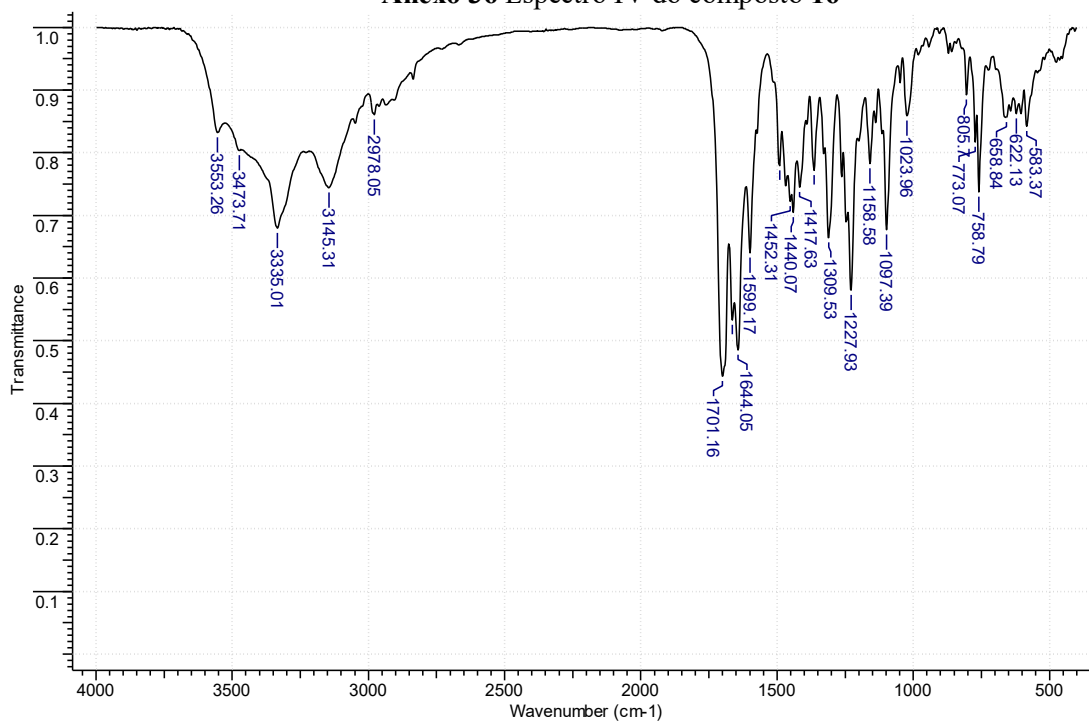
Anexo 32 Espectro de HMQC do composto **15****Anexo 33** Espectro de NOESY do composto **15**

Anexo 34 Espectro de ROESY do composto **15**

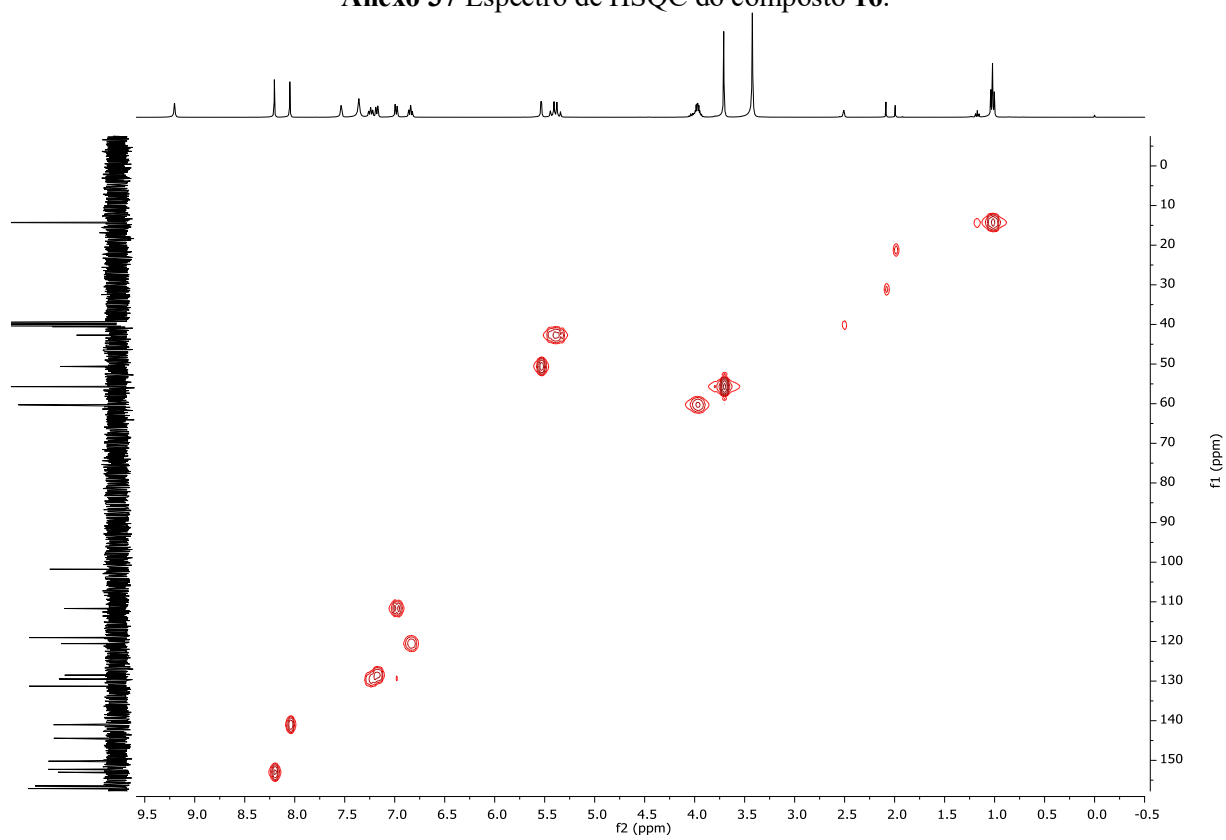
Anexo 35 Espectro de HRMS do composto 16

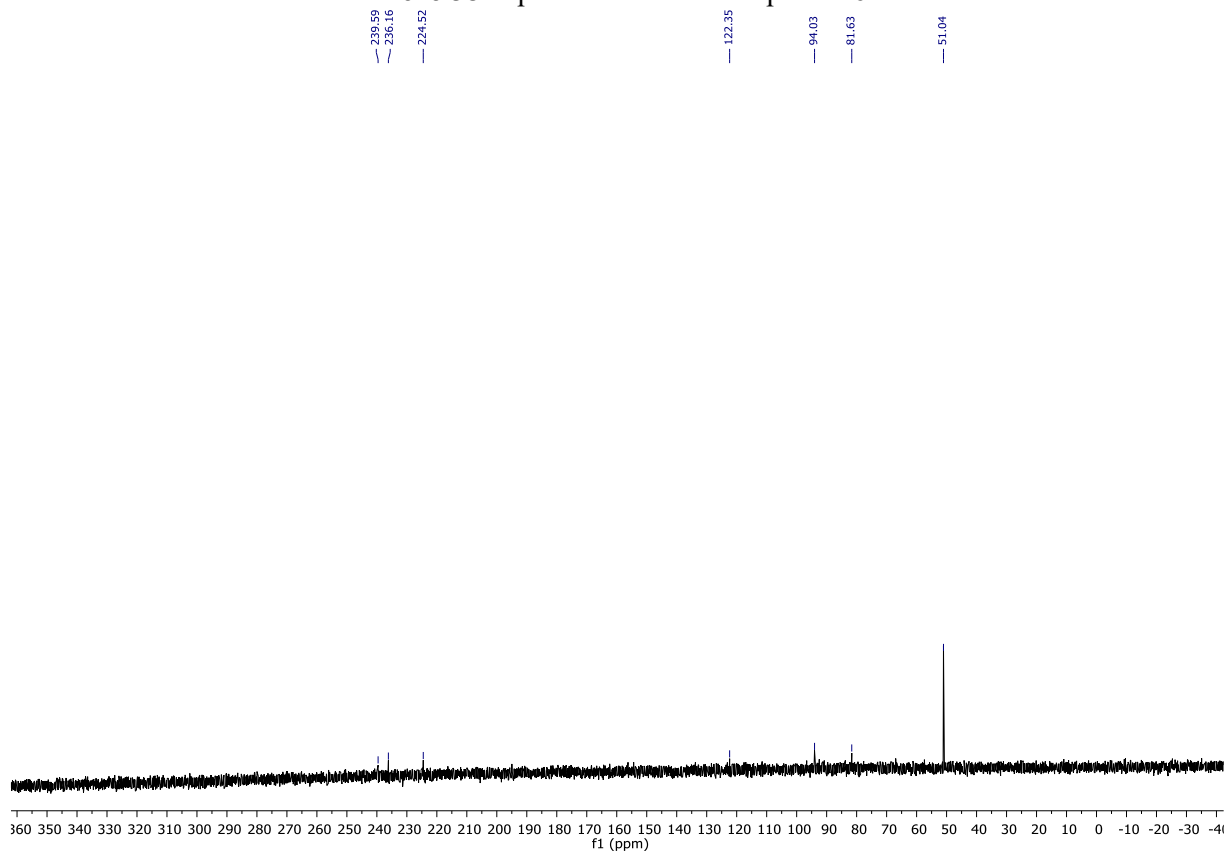
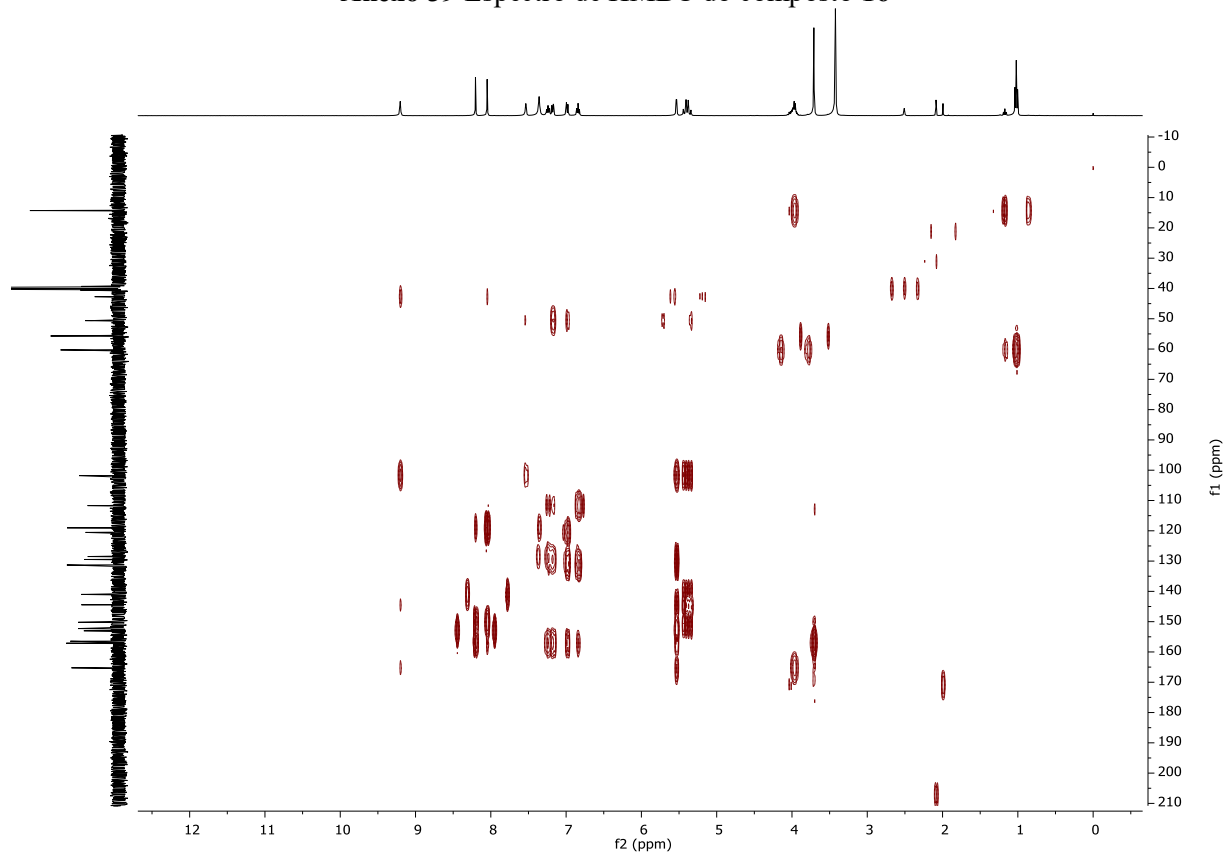


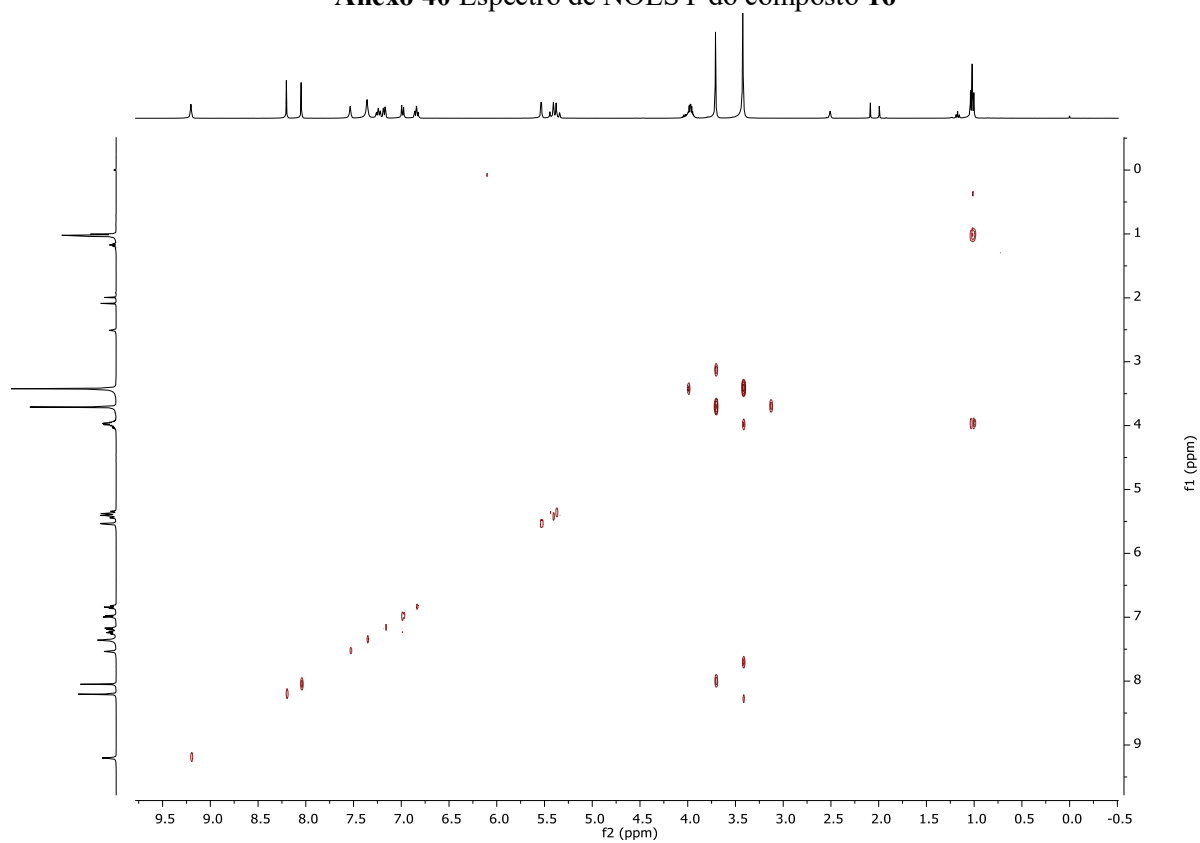
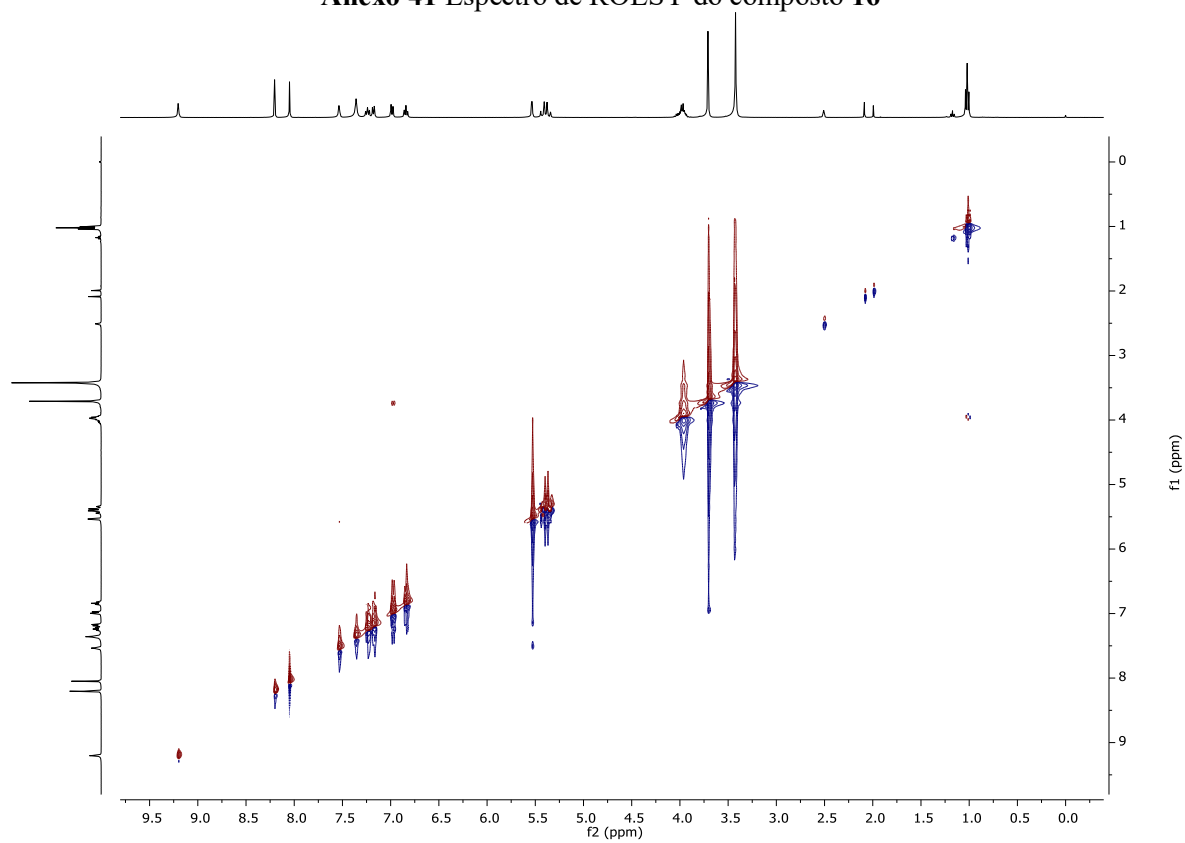
Anexo 36 Espectro IV do composto 16



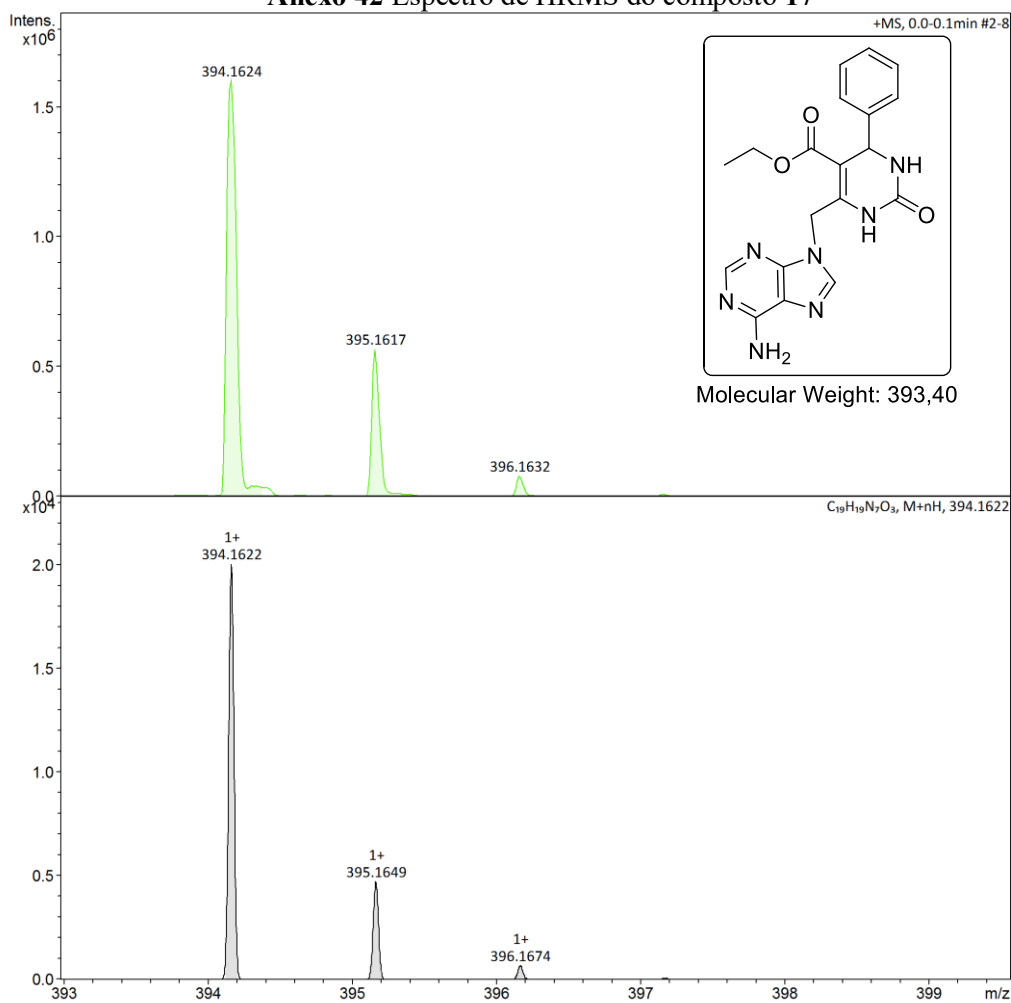
Anexo 37 Espectro de HSQC do composto 16.



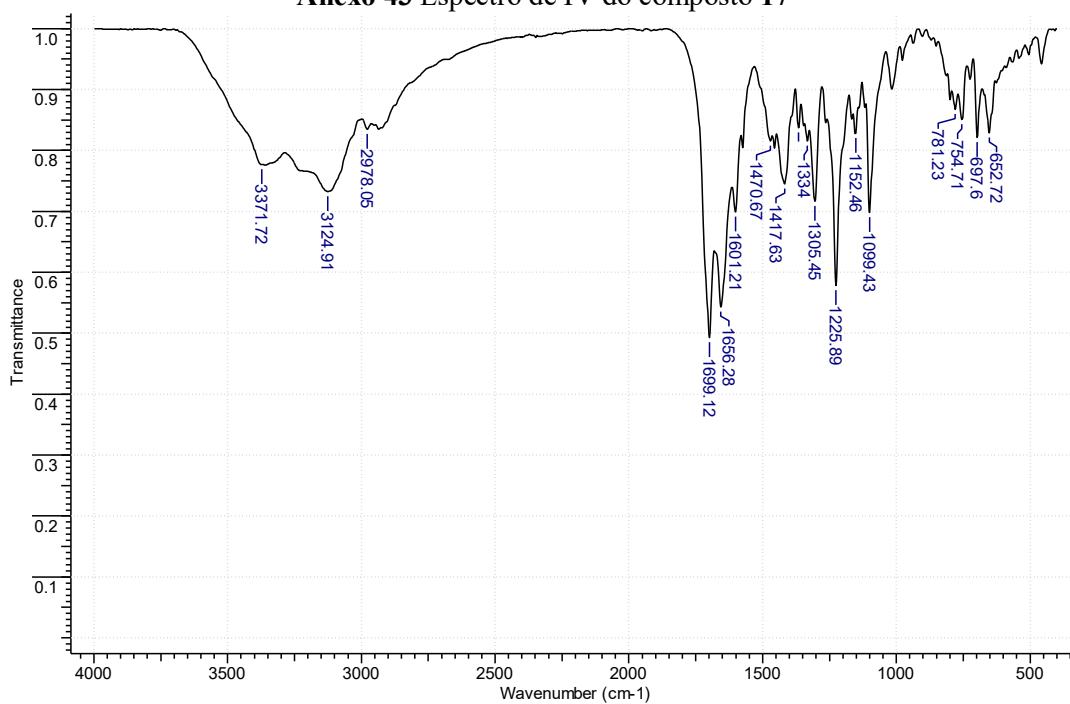
Anexo 38 Espectro de ^{15}N do composto **16****Anexo 39** Espectro de HMBC do composto **16**

Anexo 40 Espectro de NOESY do composto **16****Anexo 41** Espectro de ROESY do composto **16**

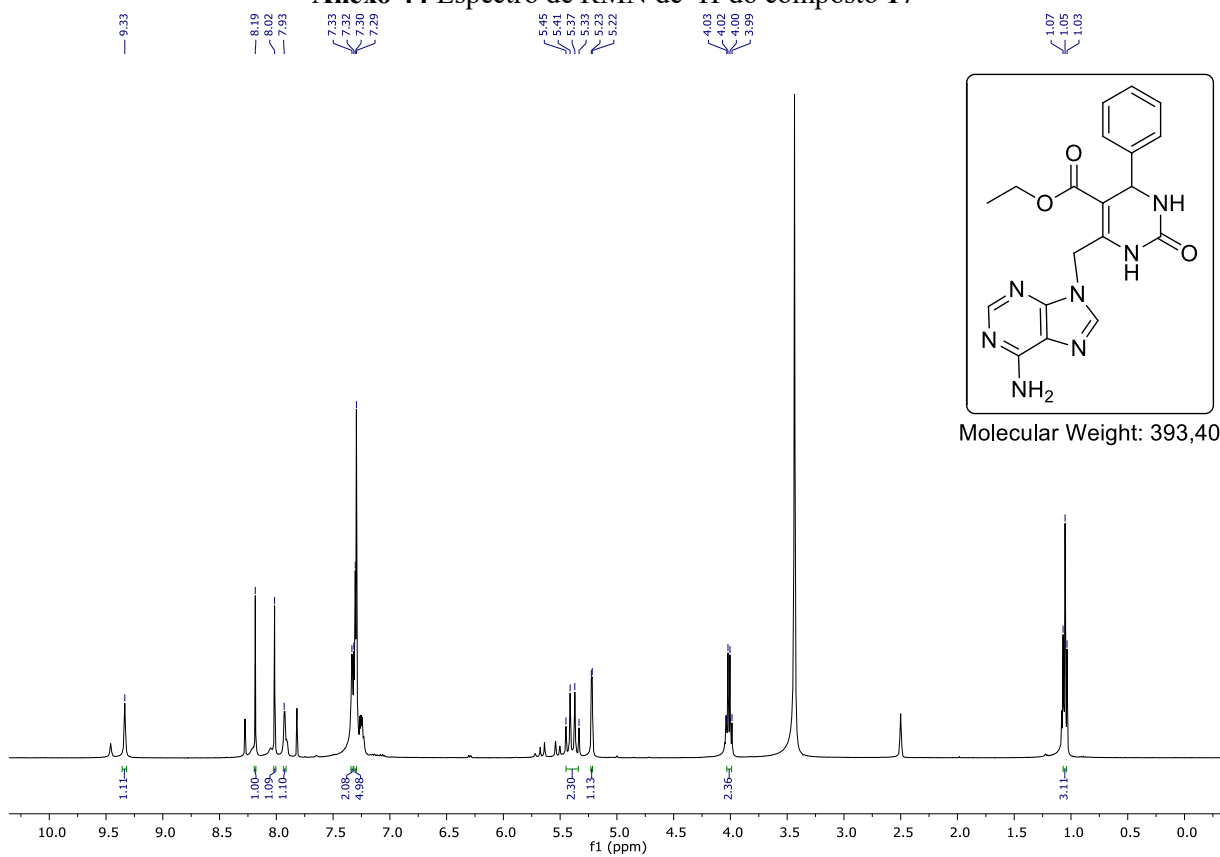
Anexo 42 Espectro de HRMS do composto 17



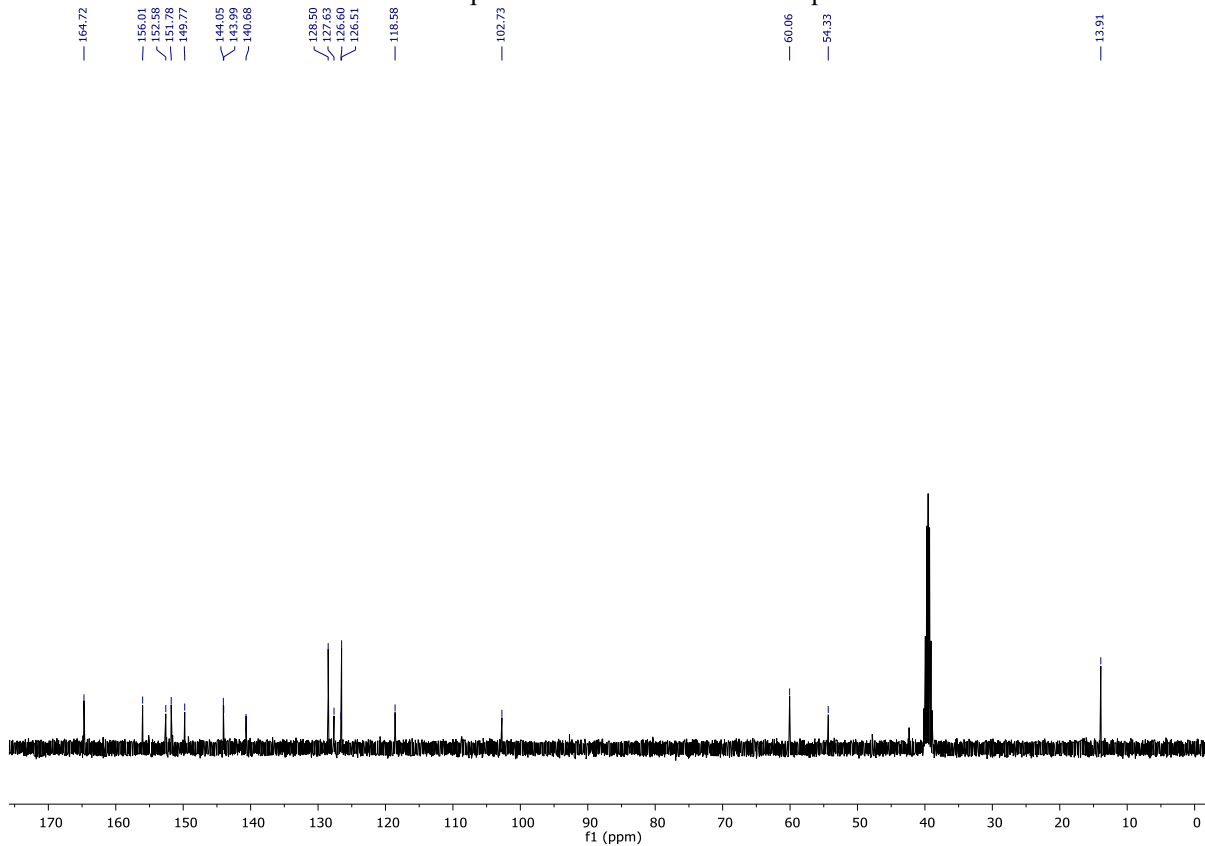
Anexo 43 Espectro de IV do composto 17



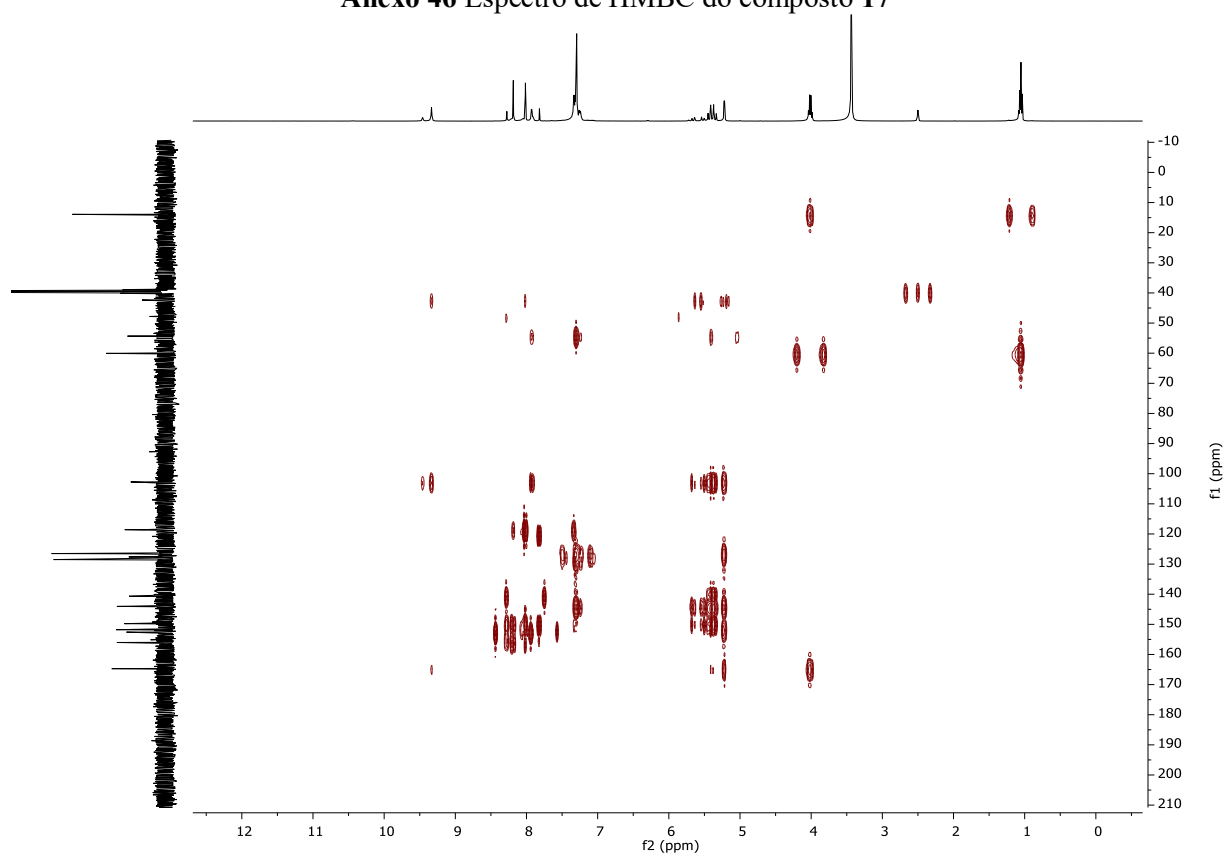
Anexo 44 Espectro de RMN de ^1H do composto 17



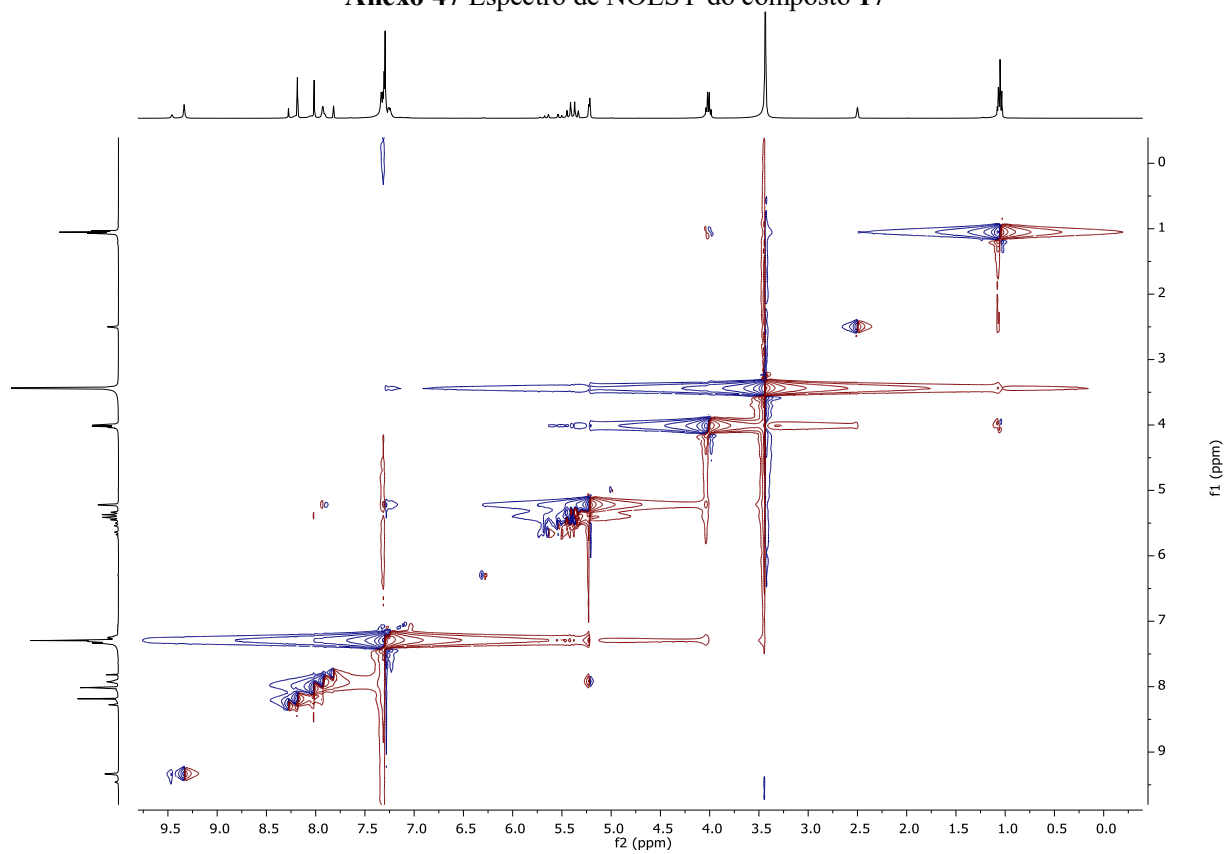
Anexo 45 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 17



Anexo 46 Espectro de HMBC do composto 17



Anexo 47 Espectro de NOESY do composto 17



Anexo 48 Dados CristalográficosTabela 1. Dados e refinamento da estrutura do cristal do híbrido **16**.

Empirical formula	C ₂₀ H ₂₂ N ₇ O _{4.50}	
Formula weight	432.44	
Temperature	150(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C 2	
Unit cell dimensions	a = 22.7512(10) Å	α = 90°.
	b = 7.5544(3) Å	β = 100.0800(10)°.
	c = 11.8118(5) Å	γ = 90°.
Volume	1998.78(15) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.437 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.879 mm ⁻¹	
F(000)	908	
Crystal size	0.400 x 0.200 x 0.120 mm ³	
Theta range for data collection	3.801 to 65.243°.	
Index ranges	-26 ≤ h ≤ 26, -8 ≤ k ≤ 8, -13 ≤ l ≤ 13	
Reflections collected	10179	
Independent reflections	3386 [R(int) = 0.0280]	
Completeness to theta = 65.243°	99.7 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7526 and 0.6260	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3386 / 1 / 303	
Goodness-of-fit on F ²	1.041	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0354, wR2 = 0.0945	
R indices (all data)	R1 = 0.0356, wR2 = 0.0948	
Absolute structure parameter	0.16(15)	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.231 and -0.191 e.Å ⁻³	

Tabela 2. Comprimento de ligação [\AA] e ângulos [$^\circ$] para o híbrido **16**.

N(1)-C(2)	1.332(4)
N(1)-C(6)	1.377(4)
C(2)-N(3)	1.331(4)
C(2)-H(2)	0.9500
N(3)-C(4)	1.356(4)
C(4)-N(9)	1.360(4)
C(4)-C(5)	1.383(4)
C(5)-N(7)	1.373(4)
C(5)-C(6)	1.410(4)
C(6)-N(10)	1.333(4)
N(7)-C(8)	1.316(4)
C(8)-N(9)	1.363(4)
C(8)-H(8)	0.9500
N(9)-C(10)	1.462(3)
N(10)-H(10C)	0.78(4)
N(10)-H(10D)	0.92(4)
C(10)-C(11)	1.510(4)
C(10)-H(10A)	0.9900
C(10)-H(10B)	0.9900
C(11)-C(12)	1.351(4)
C(11)-N(26)	1.371(4)
C(12)-C(13)	1.471(4)
C(12)-C(16)	1.522(4)
C(13)-O(2)	1.214(4)
C(13)-O(1)	1.338(3)
C(14)-O(1)	1.459(4)
C(14)-C(15)	1.502(4)
C(14)-H(14A)	0.9900
C(14)-H(14B)	0.9900
C(15)-H(15A)	0.9800
C(15)-H(15B)	0.9800
C(15)-H(15C)	0.9800
C(16)-N(24)	1.472(3)
C(16)-C(17)	1.526(4)
C(16)-H(16)	1.0000
C(17)-C(18)	1.387(4)

C(17)-C(22)	1.403(4)
C(18)-C(19)	1.384(4)
C(18)-H(18)	0.9500
C(19)-C(20)	1.379(4)
C(19)-H(19)	0.9500
C(20)-C(21)	1.386(4)
C(20)-H(20)	0.9500
C(21)-C(22)	1.392(4)
C(21)-H(21)	0.9500
C(22)-O(4)	1.368(3)
C(23)-O(4)	1.425(3)
C(23)-H(23A)	0.9800
C(23)-H(23B)	0.9800
C(23)-H(23C)	0.9800
N(24)-C(25)	1.344(3)
N(24)-H(24)	0.83(4)
C(25)-O(3)	1.226(3)
C(25)-N(26)	1.368(4)
N(26)-H(26)	0.79(4)
O(1W)-H(1WA)	0.9759
C(2)-N(1)-C(6)	118.7(2)
N(3)-C(2)-N(1)	129.2(3)
N(3)-C(2)-H(2)	115.4
N(1)-C(2)-H(2)	115.4
C(2)-N(3)-C(4)	110.6(2)
N(3)-C(4)-N(9)	127.9(2)
N(3)-C(4)-C(5)	127.3(3)
N(9)-C(4)-C(5)	104.8(2)
N(7)-C(5)-C(4)	111.6(2)
N(7)-C(5)-C(6)	131.7(2)
C(4)-C(5)-C(6)	116.4(3)
N(10)-C(6)-N(1)	119.1(3)
N(10)-C(6)-C(5)	123.5(3)
N(1)-C(6)-C(5)	117.4(2)
C(8)-N(7)-C(5)	103.4(2)
N(7)-C(8)-N(9)	113.2(3)
N(7)-C(8)-H(8)	123.4

N(9)-C(8)-H(8)	123.4
C(4)-N(9)-C(8)	106.9(2)
C(4)-N(9)-C(10)	126.6(2)
C(8)-N(9)-C(10)	126.2(2)
C(6)-N(10)-H(10C)	117(2)
C(6)-N(10)-H(10D)	118(2)
H(10C)-N(10)-H(10D)	123(3)
N(9)-C(10)-C(11)	109.9(2)
N(9)-C(10)-H(10A)	109.7
C(11)-C(10)-H(10A)	109.7
N(9)-C(10)-H(10B)	109.7
C(11)-C(10)-H(10B)	109.7
H(10A)-C(10)-H(10B)	108.2
C(12)-C(11)-N(26)	120.4(2)
C(12)-C(11)-C(10)	127.5(2)
N(26)-C(11)-C(10)	112.2(2)
C(11)-C(12)-C(13)	121.6(2)
C(11)-C(12)-C(16)	120.7(2)
C(13)-C(12)-C(16)	117.6(2)
O(2)-C(13)-O(1)	122.2(2)
O(2)-C(13)-C(12)	125.9(2)
O(1)-C(13)-C(12)	111.9(2)
O(1)-C(14)-C(15)	107.0(3)
O(1)-C(14)-H(14A)	110.3
C(15)-C(14)-H(14A)	110.3
O(1)-C(14)-H(14B)	110.3
C(15)-C(14)-H(14B)	110.3
H(14A)-C(14)-H(14B)	108.6
C(14)-C(15)-H(15A)	109.5
C(14)-C(15)-H(15B)	109.5
H(15A)-C(15)-H(15B)	109.5
C(14)-C(15)-H(15C)	109.5
H(15A)-C(15)-H(15C)	109.5
H(15B)-C(15)-H(15C)	109.5
N(24)-C(16)-C(12)	110.1(2)
N(24)-C(16)-C(17)	111.2(2)
C(12)-C(16)-C(17)	115.1(2)
N(24)-C(16)-H(16)	106.6

C(12)-C(16)-H(16)	106.6
C(17)-C(16)-H(16)	106.6
C(18)-C(17)-C(22)	118.5(2)
C(18)-C(17)-C(16)	119.3(2)
C(22)-C(17)-C(16)	122.2(2)
C(19)-C(18)-C(17)	121.7(2)
C(19)-C(18)-H(18)	119.2
C(17)-C(18)-H(18)	119.2
C(20)-C(19)-C(18)	119.1(3)
C(20)-C(19)-H(19)	120.5
C(18)-C(19)-H(19)	120.5
C(19)-C(20)-C(21)	121.0(3)
C(19)-C(20)-H(20)	119.5
C(21)-C(20)-H(20)	119.5
C(20)-C(21)-C(22)	119.5(3)
C(20)-C(21)-H(21)	120.3
C(22)-C(21)-H(21)	120.3
O(4)-C(22)-C(21)	123.8(2)
O(4)-C(22)-C(17)	115.9(2)
C(21)-C(22)-C(17)	120.3(2)
O(4)-C(23)-H(23A)	109.5
O(4)-C(23)-H(23B)	109.5
H(23A)-C(23)-H(23B)	109.5
O(4)-C(23)-H(23C)	109.5
H(23A)-C(23)-H(23C)	109.5
H(23B)-C(23)-H(23C)	109.5
C(25)-N(24)-C(16)	125.9(2)
C(25)-N(24)-H(24)	112(2)
C(16)-N(24)-H(24)	116(2)
O(3)-C(25)-N(24)	124.0(2)
O(3)-C(25)-N(26)	119.9(2)
N(24)-C(25)-N(26)	116.1(2)
C(25)-N(26)-C(11)	124.6(2)
C(25)-N(26)-H(26)	115(3)
C(11)-N(26)-H(26)	120(3)
C(13)-O(1)-C(14)	116.0(2)
C(22)-O(4)-C(23)	117.2(2)