



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

Desenvolvimento de heterociclos pirimidínicos derivados de ácidos barbitúricos, como potenciais inibidores da xantina oxidase

Joana Patrícia Rodrigues Figueiredo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Medicinal
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre
Co-orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida

Covilhã, Fevereiro de 2017

Aos meus pais e irmão

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Samuel Silvestre, não só pela oportunidade que me deu para realizar este trabalho de investigação e por todos os conhecimentos transmitidos, mas também por todo o apoio e paciência, por ter acreditado em mim e nunca querer que eu desistisse.

De igual modo, quero agradecer ao meu co-orientador, o Professor Paulo Almeida, por ter estado sempre presente, por toda a ajuda e dedicação.

Á doutora Susana Ferreira, não só pela realização dos ensaios antibacterianos, mas também por toda a disponibilidade.

Ao Doutor Renjith Raveendran Pillai do *TKM College of Arts and Science*, por disponibilizar alguns parâmetros para a realização dos estudos de *Docking* molecular.

A todos os colegas de laboratório, em especial ao João Serrano, que comigo “partiu pedra” muitas vezes. Falhamos tantas vezes, mas acertamos as suficientes. Tornou-se sem duvida num bom amigo.

Á Andreia Marta e Paula Martins, por toda a ajuda, por terem estado presentes na hora mais difícil, jamais esquecerei o que fizeram por mim.

Á Daniela Coutinho, Marta Salvador e Joana Gonçalves por estarem presentes durante todo o percurso.

Ao Carlos, por toda a ajuda, paciência, cumplicidade, por todos os conselhos, por ter estado sempre do meu lado.

Por último, mas sem duvida o mais importante, quero agradecer a toda a minha família, em especial aos meus pais e irmão. Sem eles jamais teria conseguido concluir esta etapa. Obrigada por todas as oportunidades que me deram, por terem acreditado sempre em mim e nunca me deixarem desistir. Até para nascer é preciso ter sorte, e eu tive.

Resumo

O desenvolvimento da biologia molecular e da química computacional entre outras áreas levou ao isolamento e caracterização de diversos alvos biológicos, sendo a xantina oxidase um destes casos. Esta enzima chamou a atenção dos químicos medicinais, uma vez que o aumento da sua atividade conduz a estados patológicos graves. A xantina oxidase é uma importante e versátil molibdoflavoproteína, envolvida no metabolismo de purinas, que catalisa a transformação da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico, com concomitante produção de espécies reativas de oxigénio. Além disso, níveis elevados de ácido úrico podem levar à gota, uma doença geralmente controlada utilizando o fármaco alopurinol, que é considerado o inibidor protótipo desta enzima. No entanto, a utilização deste fármaco na clínica está associada a efeitos adversos relevantes, o que levou ao desenvolvimento de novos inibidores.

Os barbituratos constituíram, ao longo dos anos uma estrutura base importante para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo as modificações no anel pirimidínico, em especial, alterações em C-5, as mais relevantes na descoberta de novas moléculas bioativas.

Com este trabalho de dissertação, e com o objetivo de se obterem análogos ao alopurinol, pretendia-se a síntese de novos barbituratos ciclizados em C-5-C-6 do anel pirimidínico. Não se confirmando a ciclização pretendida, optou-se por realizar modificações ao anel pirimidico em C-5, obtendo-se derivados de hidrazinilpirimidinas, descritos com diversas atividades biológicas. Após a caracterização estrutural dos compostos sintetizados foram testadas as suas atividades biológicas, avaliando-se as suas capacidades de inibição da atividade da enzima xantina oxidase, e o seu potencial anti-oxidante, anti-bacteriano e anti-proliferativo, numa linha celular do cancro da mama e numa linha celular normal. Adicionalmente, foram realizados estudos complementares *in silico*, nomeadamente estudos de *docking* molecular e de previsão de propriedades farmacocinéticas. Dos resultados obtidos, destaca-se o potencial de inibição da atividade da enzima xantina oxidase de duas hidrazinilpirimidinas, tal como a capacidade de outros destes compostos como anti-oxidantes e anti-bacterianos, sendo estes últimos resultados bastantes promissores.

Palavras-chave

(Tio)barbituratos; hidrazinilpirimidinas; inibidores da xantina oxidase; atividade anti-oxidante; atividade anti-bacteriana

Abstract

With the increasingly development of fields of research like molecular biology, computational chemistry and others, a lot of new targets have been characterized and isolated, what has become truly important to appearing of xanthine oxidase. This enzyme brings the medicinal chemists attention since that your over expressed activity is quite related to serious pathological conditions. Xanthine oxidase is an important and versatile member of molybdoflavoproteins family, involved in purines metabolism that catalysis xanthine's formation by hypoxanthine and then uric acid's formation, meanwhile oxygen-reactive species are produced. Moreover, high levels of uric acid could give a known disease, named gota, which is quite controlled by allopurinol, a drug that works as it target inhibitor. Although, the use of this drug is related to serious side effects, which becomes the key to the development of new inhibitors.

Barbiturates were being the biggest example which have been increasingly developed over the years as main structure to give new and better drugs. Ring changes, mainly at C-5 are responsible are the most relevant in the research for new bioactive molecules.

The point of this work was bring new analogue drugs from allopurinol by synthesis of new cyclized barbiturates at C-5 and C-6 positions of pyrimidinic ring. Although the desired cyclization was not confirming, so it was chosen to do modifications at C-5 position, giving the hydrazinilpyrimidines which have been described with lots of biological activities. After structural characterization of synthesized compounds, biological activities were tested to assess their inhibition skills in oxidase xanthine enzyme, then your anti-oxidant, anti-bacterial and anti-proliferative potential were assessed too in both, breast cancer and in normal cell lines. Meanwhile, were done in silico complementary studies like molecular docking and pharmacokinetic properties prediction. Between the given results, was highlighted the great enzyme inhibition potential of xanthine oxidase by two hydrazinilpyrimidines and their ability to anti-oxidant and anti-bacterial activities, showing the last one, being very promising.

Keywords

(Thio)barbiturates; 5-hydrazinylpyrimidines; Xanthine oxidase inhibitors; antioxidant activity; antibacterial activity.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	A química medicinal e o desenvolvimento de fármacos	2
1.1.1.	Ensaio <i>in silico</i> - <i>docking</i> molecular e predição das propriedades ADMET	5
1.1.2.	Ensaio <i>in vitro</i>	7
1.2.	Xantina Oxidase	7
1.2.1.	Bioquímica e Mecanismo de ação.....	8
1.2.2.	Distribuição	10
1.2.3.	O papel fisiológico da XOR	11
1.2.4.	O papel da XOR em patofisiologias	11
1.2.4.1.	Produção de radicais livres induzidos pela XO	11
1.2.4.2.	Ácido úrico e hiperuricemia	12
1.2.5.	Inibidores da Xantina Oxidase	13
1.2.5.1.	Inibidores purínicos	13
1.2.5.2.	Inibidores não purínicos de origem sintética	14
1.2.5.3.	Inibidores não purínicos de origem natural	15
1.3.	Barbituratos	16
1.3.1.	Funcionalizações em C-5	19
1.3.2.	Ciclizações em C5-C6	21
2.	Objetivos.....	23
3.	Resultados e Discussão	25
3.1.	Síntese	26
3.1.1.	Ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a)	26
3.1.2.	5-(4-Metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a) e 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b).....	28
3.1.3.	Pirazolopirimidinas 7a-c e isoxazolopirimidina 7d	30
3.1.4.	5-Acilpirimidinas 9a-e	32
3.1.5.	Hidrazinilpirimidinas 10a-j	35
3.2.	Avaliação Biológica <i>in vitro</i>	40
3.2.1.	Determinação da atividade inibitória da xantina oxidase	40
3.2.2.	Determinação da atividade antioxidante.....	42
3.2.3.	Determinação da atividade antibacteriana	45
3.2.4.	Determinação dos efeitos na proliferação celular	46
3.3.	<i>Estudos in silico</i>	49
3.3.1.	<i>Docking molecular</i>	49
3.3.2.	Predição das propriedades farmacocinéticas.....	50
4.	Conclusões e Perspetivas Futuras	53
5.	Secção Experimental	55
5.1.	Síntese e caracterização estrutural.....	56
5.1.1.	1,3-Difeniltiourea (3)	57

5.1.2.	1,3-Difenil-2-tioxopirimidina-4,6-diona (4a)	57
5.1.3.	5-(4-Metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a)	58
5.1.4.	5-(4-Metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b)	58
5.1.5.	Pirazolopirimidinas 7a-c	59
5.1.6.	Isoxazolopirimidina 7d	60
5.1.7.	(Etoximetileno)-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (8a)	61
5.1.8.	5-Acilpirimidinas 9a-e	62
5.1.9.	Hidrazinilpirimidinas 10a-n	66
5.2	Avaliação biológica.....	73
5.2.1	Determinação <i>in Vitro</i> da atividade inibitória da Xantina Oxidase	74
_5.2.1.1.	Preparação das soluções	74
_5.2.1.2.	Procedimento geral.....	74
5.2.2.	Determinação da atividade antioxidante - Ensaio DPPH	75
_5.2.2.1.	Preparação das soluções	75
_5.2.2.1.	Procedimento geral.....	75
5.2.3.	Estudos celulares.....	75
_5.2.3.1	Culturas celulares.....	76
_5.2.3.2	Preparação das soluções	76
_5.2.3.3	Determinação <i>In Vitro</i> da proliferação celular	76
___5.2.3.3.1	Tratamento das células com os compostos.....	76
___5.2.3.3.2	Ensaio MTT	76
5.2.4.	Estatística	77
5.3	Estudos <i>in silico</i>	77
5.3.1.	<i>Docking molecular</i>	77
5.3.2.	Predição das propriedades farmacocinéticas	78
6.	Referências.....	79
7.	Publicações	92
8.	Anexos.....	94
	Anexo 1 - Auxiliar de estruturas dos compostos 1-7c	95
	Anexo 2 - Auxiliar de estruturas dos compostos 7d-10n	96
	Anexo 3 - Ficheiro “AD4_Parameters.dat”.....	97
	Anexo 4 - Comunicação na forma de poster no âmbito desta dissertação	100

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Classes de alvos terapêuticos. Adaptado de <i>Bleicher et al.</i> ¹⁰	4
Figura 1.2 - Múltiplas abordagens computacionais de descoberta de fármacos que foram aplicadas na identificação e validação de alvo, descoberta e otimização do composto <i>lead</i> e testes pré-clínicos. Adaptado de <i>OU-YANG et al.</i> ¹²	5
Figura 1.3 - Metodologia de <i>screening</i> virtual. Adaptado de <i>Minie et al.</i> ¹⁴	6
Figura 1.4 - Estrutura cristalizada da XDH de rato. Adaptado de <i>Nishino et al.</i> ³¹	8
Figura 1.5 - Modelo estrutural da XDH e XO. Apenas uma subunidade da proteína dimérica é mostrada. Adaptado de <i>Borges et al.</i> ²⁶	9
Figura 1.6 - Alguns análogos purínicos inibidores da XO.	14
Figura 1.7 - Alguns análogos não purínicos inibidores da XO.	15
Figura 1.8 - Alguns análogos de origem natural inibidores da XO.	16
Figura 1.9 - Alguns ácidos (tio)barbitúricos com efeitos no SNC. Adaptado de <i>Lemke et al.</i> ⁸⁶	18

Lista de Esquemas

Esquema 1.1 - Reações catalisadas pela XO. Adaptado de <i>Tamta et al.</i> ³⁶	9
Esquema 1.2 - Transformação de xantina em ácido úrico. Adaptado de <i>Kóstic et al.</i> ⁴²	10
Esquema 1.3 - Síntese do ácido barbitúrico a partir do ácido malónico e ureia.	16
Esquema 1.4 - Diferentes formas de representação do ácido barbitúrico.	16
Esquema 1.5 - Síntese do ácido barbitúrico a partir do malonato de dietilo e ureia.	17
Esquema 1.6 - Síntese de 5-benzilidenopirimidinas a partir da condensação entre o ácido barbitúrico e um aldeído aromático.	20
Esquema 1.7 - Síntese de hidrazonas ou fenil-hidrazonas a partir da condensação entre 5-acilpirimidinas com diferentes hidrazinas.	20
Esquema 1.8 - Síntese de pirazolopirimidinas e oxazolopirimidinas a partir de 5-benzilidenopirimidinas e respetiva hidrazina ou hidroxilamina.	21
Esquema 1.9 - Síntese de pirazolopirimidinas e oxazolopirimidinas a partir de 5-(etoxi)-metilenopirimidinas e respetiva hidrazina ou hidroxilamina.	21
Esquema 1.10 - Síntese de pirazolopirimidinas a partir de 5-acilpirimidinas e hidrazina.	22
Esquema 3.1 - Síntese do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a).	26
Esquema 3.2 - Síntese da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a).....	28
Esquema 3.3 - Síntese da 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b).	28
Esquema 3.4 - Tentativa de síntese das pirazolopirimidinas 7a-c , a partir da 5-(4-metoxibenzilideno) pirimidina-2,4,6-triona (6a). Condições reacionais: a) hidrato de hidrazina ou fenil-hidrazina/ácido acético/etanol/refluxo; b) hidrato de hidrazina ou <i>N,N'</i> -dimetil-hidrazina dicloridrato/ácido acético/isopropanol/refluxo.	30
Esquema 3.5 - Tentativa de síntese de 5-(etoximetileno)-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (8a).	31
Esquema 3.6 - Tentativa de síntese da isoxazolopirimidina 7d a partir da 5-(4-metoxibenzilideno) pirimidina-2,4,6- triona (3a).	31
Esquema 3.7 - Síntese das 5-acilpirimidinas 9a-e a partir de ácidos (tio)barbitúricos. Condições reacionais: a) anidrido acético/ácido sulfúrico; b) anidrido trifluoracético/THF; c) anidrido benzoico/piridina.	32
Esquema 3.8 - Tentativa de síntese das 5-acilpirimidinas 9f-i . Condições reacionais: a) anidrido acético/ácido sulfúrico; b) anidrido trifluoracético/THF; c) piridina/anidrido trifluoroacético/THF.	34
Esquema 3.9 - Síntese das hidrazinilpirimidinas 10a-j	35
Esquema 3.10 - Tentativa de síntese das hidrazinilpirimidinas 10k-n	37

Lista de Gráficos

- Gráfico 3.1** - Curva de calibração para o ácido úrico a 295 nm, com respectiva equação da reta e r^2 40
- Gráfico 3.2** - Percentagem de inibição da atividade da xantina oxidase por parte dos compostos **6a**, **6b**, **9a-e**, **10a-j** e alopurinol, usado como controlo positivo, a uma concentração de 30 μM . Os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão, representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-t de *student*). 41
- Gráfico 3.3** - Percentagem de inibição da atividade enzimática da XO em função do tempo, para os compostos **10b**, **10e**, **10g** e alopurinol a uma concentração de 30 μM 42
- Gráfico 3.4** - Percentagem de redução do radical DPPH em relação ao controlo por parte dos compostos trolox, alopurinol, **6a-b**, **9a-e**, **10a-j** a uma concentração de 30 μM , aos 20 e 60 minutos de exposição. Os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-t de *student*). 44
- Gráfico 3.5** - Percentagem relativa de proliferação celular em células NHDF após 72 horas de exposição aos compostos 5-FU, **6a-b**, **9a-e** e **10a-j** a uma concentração de 30 μM . Os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão e são representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-t de *student*). 47
- Gráfico 3.6** - Percentagem relativa de proliferação celular em células MCF-7 após 72 horas de exposição aos compostos 5-FU, **6a-b**, **9a-e** e **10a-j** a uma concentração de 30 μM . Os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-t de *student*). 48

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Alguns dados farmacocinéticos de alguns barbituratos. Adaptado de <i>Lemke et al.</i> ⁸⁶	18
Tabela 3.1 - Bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão e rendimento para a 1,3-difeniltioureia (3) e ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a). 27	27
Tabela 3.2 - RMN de ¹ H da 1,3-difeniltioureia (3) e do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a). . 27	27
Tabela 3.3 - RMN de ¹³ C da 1,3-difeniltioureia (3) e do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a). 27	27
Tabela 3.4 - Bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão e rendimento da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a) e 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b).....	29
Tabela 3.5 - RMN de ¹ H da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a) e 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b).	29
Tabela 3.6 - RMN de ¹³ C da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a) e 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b).	29
Tabela 3.7 - Bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão e rendimento das 5-acilpirimidinas 9a-e	33
Tabela 3.8 - RMN de ¹ H das 5-acilpirimidinas 9a-e	33
Tabela 3.9 - RMN de ¹³ C das 5-acilpirimidinas 9a-e	34
Tabela 3.10 - Bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão e rendimento das hidrazinilpirimidinas 10a-j	36
Tabela 3.11 - RMN de ¹ H das hidrazinilpirimidinas 10a-j	38
Tabela 3.12 - RMN de ¹³ C das hidrazinilpirimidinas 10a-j	39
Tabela 3.13 - Valores de IC ₅₀ estimados para a inibição da atividade da XO dos compostos alopurinol, 10b e 10h	42
Tabela 3.14 - Curvas de calibração para o radical DPPH aos comprimentos de onda de 515 e 517 nm.	43
Tabela 3.15 - Valores de IC ₅₀ para a atividade antioxidante pelo método de DPPH dos compostos trolox, 10a-d e 10g-i	45
Tabela 3.16 - Atividade antibacteriana dos compostos tetraciclina, 6a-b , 9a-e , 10a-j contra a) Bacillus cereus , b) Staphylococcus aureus , c) Escherichia coli , d) Klebsiella pneumoniae , e) Pseudomonas aeruginosa , f) Salmonella Typhimurium , g) Acinetobacter baumani (MIC, µM).46	46
Tabela 3.17 - Valores de IC ₅₀ estimados para a inibição da atividade anti-proliferativa nas células NHDF dos compostos 5-FU , 10a , 10f , 10g e 10h	47
Tabela 3.18 - Energias de ligação e interações por pontes de hidrogénio dos compostos Y-700, alopurinol, 10b e 10g no sitio ativo da XO.....	50

Tabela 3.19 - Dados computacionais para os descritores das regras de Lipinski e parâmetros de Veber, calculados através do *software* pkSCM *on-line* para **10a-c** e **10f-h**. 50

Tabela 3.21 - Dados computacionais calculados para as propriedades ADMET com base nos modelos do *software* pkSCM *on-line* para os compostos **10a-c** e **10f-h**..... 51

Lista de Acrónimos, abreviaturas e símbolos

AB	antibiótico/antimicótico
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AO	Aldeído oxidase
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Refletância total atenuada - do inglês, <i>Attenued Total Reflectance</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
ccf	Cromatografia em camada fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
d	duplete
dd	duplo duplete
DPPH	2,2-difenilo-1-picrilhidrazilo
EMA	Agência Europeia do Medicamento - do inglês, <i>European Medicines Agency</i>
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina - do inglês <i>Flavine Adenine Dinucleotide</i>
FBS	Soro fetal bovino - do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe/S	Ferro sulfúrico
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier - do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GLU	Glutamina
GABA	Recetor ácido γ -aminobutírico
GPCRs	Recetores acoplados à proteína G - do inglês, <i>G protein-coupled receptors</i>
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações - do inglês, <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanesulfónico
HSQC	Correlação heteronuclear a uma ligação - do inglês, <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HTS	<i>Screening</i> de alto rendimento - do inglês, <i>High-throughput screening</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
IC ₅₀	concentração inibitória para metade da atividade máxima - do inglês, <i>half maximal inhibitory concentration</i>
Lit.	Literatura

log P	logaritmo do coeficiente de partilha
m	multipleto
MIC	Concentração mínima inibitória - do inglês, <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MCF-7	Células epiteliais humanas do cancro da mama - do inglês <i>Michigan Cancer Foundation-7, human breast adenocarcinoma cell line</i>
Mo-P	molibdopterinina
MSU	Urato monossódico - do inglês, <i>Monosodium urate</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina - do inglês, <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NHDF	Fibroblastos normais da derme humana - do inglês Normal Human Dermal Fibroblast
NO	Oxido nítrico - do inglês <i>Nitric Oxide</i>
O ₂	Oxigénio molecular
O ₂ ⁻	Anião superóxido
·OH	Radical hidroxilo
PDB	Base de dados de proteínas - do inglês, <i>Protein Data Bank</i>
pf	ponto de fusão
QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa - do inglês, <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de protão
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMSD	Desvio da raiz quadrada média, do inglês - <i>Root Mean Square Deviation</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	Espécies reativas de oxigénio - do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
SAR	Relação estrutura atividade - do inglês, <i>Structure-Activity Relationship</i>
SER	Serina
SNC	Sistema Nervoso Central
SO	Sulfite oxidase
s	singuleto
t	tripleto
THF	tetrahidrofurano
THR	Tirosina
XDH	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase
XOR	Xantina oxidorredutase
δ	Desvio(s) químico(s) em RMN

η	Rendimento
$\nu_{\text{máx}}$	frequência máxima da banda de absorção
5-FU	5-fluorouracilo

1. Introdução

O presente capítulo tem como objetivo fazer uma introdução à química medicinal e ao desenvolvimento de fármacos, com especial atenção à importância da enzima xantina oxidase (XO) como alvo biológico relevante na procura de novos fármacos e dos barbituratos funcionalizados em C-5. Numa primeira fase será apresentada uma breve história do processo de desenvolvimento de fármacos desde a antiguidade, inserindo-se temas como importância da química medicinal no desenvolvimento atual de fármacos, assim como a identificação de alvos biológicos e a importância dos ensaios *in vitro* e *in silico* com especial atenção ao *docking* molecular e à predição de propriedades farmacocinéticas. Na secção 1.2 será apresentada a enzima XO, com especial atenção ao seu mecanismo de ação e ao seu papel na patofisiologia humana, fazendo-se uma revisão sumária acerca dos seus inibidores. Na secção 1.3 será apresentada uma contextualização história e farmacológica dos barbituratos, com especial atenção para as funcionalizações em C-5.

1.1. A química medicinal e o desenvolvimento de fármacos

A história da descoberta e desenvolvimento de fármacos remonta ao início da civilização humana. Naqueles tempos, os “fármacos” não eram usados como remédios físicos, sendo facilmente associados com a uma cura religiosa ou espiritual, e eram administrados frequentemente por sábios ou líderes religiosos.¹

Até ao final do século XIX, a maioria dos fármacos, ou medicamentos populares, eram extraídos de plantas, devendo-se a sua descoberta muito provavelmente à combinação de experiências e observação das reações humanas e animais à ingestão dos produtos.^{1,2} Com o desenvolvimento da química no início do século XIX, as plantas passaram a ser examinadas cuidadosamente para assim se compreender melhor a sua utilidade terapêutica. O seu sucesso levou à procura dos “princípios ativos” de plantas medicinais e, durante o decorrer do século, produtos bioativos purificados foram extraídos (embora com níveis de pureza abaixo do desejado) de muitas plantas. Um exemplo é a morfina, um analgésico altamente potente, isolado a partir do ópio.³ O isolamento e purificação dos princípios ativos, consequência do avanço da química analítica, no final do século XIX, assim como o avanço dos fundamentos essenciais da “teoria” da química, como a teoria do benzeno e as investigações de Paul Ehrlich, impulsionaram a descoberta dos primeiros fármacos sintéticos e racionais, como a arsfenamina, utilizada no tratamento da sífilis.^{4,5} Nesta fase, numa era pré-ressonância magnética nuclear (RMN) e pré-química computacional, as ferramentas dos químicos eram um pouco limitadas, podendo-se afirmar que o “acaso” foi a base da descoberta de muitos fármacos, como por exemplo a penicilina, utilizada, ainda hoje, no combate a infeções por microrganismos Gram-positivos.⁵

Durante a primeira metade do século XX, a investigação sobre fármacos foi moldada e enriquecida por várias novas tecnologias, alterando-se o paradigma da descoberta e

desenvolvimento de fármacos e, conseqüentemente o papel do químico e da química medicinal.⁴ Assim, a química medicinal pode ser dividida em dois períodos importantes. Um período onde a química medicinal se baseava mais em testes *in vivo*, em que a intuição do químico medicinal era fundamental para o sucesso, tendo em conta o número limitado de compostos sintetizados, onde o serendipismo desempenhava um papel importante.^{5,6} Por outro lado, e mais recentemente, um período que se distingue pelo aparecimento de novas tecnologias e formas de *screening*, que permitem um desenvolvimento mais racional de fármacos.⁵ Neste contexto, a química medicinal moderna pode ser entendida como uma ciência interdisciplinar que abrange um domínio particularmente amplo situado na interface da química orgânica com as ciências da vida, tais como bioquímica, farmacologia, biologia molecular, genética, imunologia, farmacocinética e a toxicologia, e outras áreas como a cristalografia, espectroscopia e técnicas computacionais de simulação, análise e visualização de dados. Atualmente, o objetivo do químico medicinal é encontrar, desenvolver e melhorar substâncias medicamentosas que curem ou aliviem doenças, assim como compreender todos os processos químicos envolventes.⁷ Neste âmbito, o rápido desenvolvimento das tecnologias, juntamente com o advento da química computacional, impulsionaram em grande escala a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.⁸ Os avanços rápidos nas ferramentas de modelação molecular, bem como a aplicação da química combinatória e os métodos automatizados de *screening* de alto rendimento (HTS - do inglês, *High-throughput screening*), trouxeram benefícios imediatos na passagem da “descoberta do composto *lead*” para a “otimização do *lead*”. Assim, bibliotecas de compostos com designação racional, com base em *scaffolds* de fármacos conhecidos, podem ser geradas num curto espaço de tempo e o HTS automatizado leva a um encurtamento do tempo entre a entrega dos compostos e a verificação dos resultados.^{6,8} Os dados de *screening* são então reenviados para um processo de conceção de relação estrutura-atividade (SAR - do inglês, *structure-activity relationship*), conduzindo a um ciclo iterativo de refinamento, síntese e *screening* até que as propriedades desejadas sejam alcançadas.⁶

A revolução da biologia molecular e o advento da genómica permitiu a definição de novos alvos e a caracterização de base genética dos estados patológicos, impulsionando o uso de alvos biológicos molecularmente bem definidos como ponto de partida para a busca de novos fármacos.⁹ Estima-se que todos os fármacos existentes no mercado se destinam a menos de 500 biomoléculas variando desde ácidos nucleicos até enzimas, recetores acoplados à proteína G (GPCRs - do inglês, *G protein-coupled receptors*) e canais iónicos (figura 1.1).¹⁰

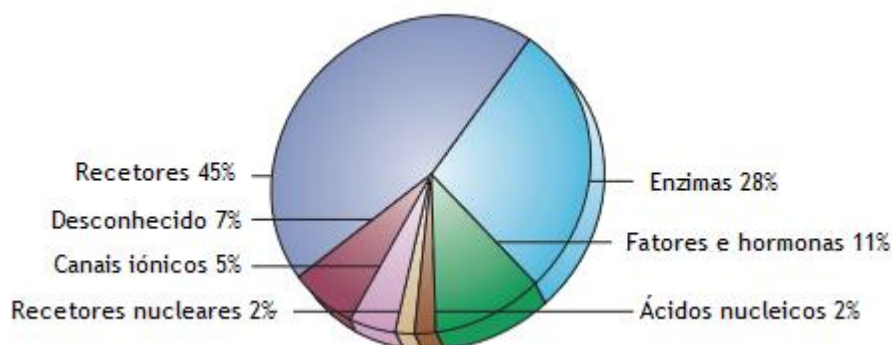


Figura 1.1 - Classes de alvos terapêuticos. Adaptado de *Bleicher et al.*¹⁰

Dentro da comunidade científica é bem aceite que, independentemente da tecnologia aplicada, certas famílias de alvos biológicos são mais facilmente moduladas pela intervenção de pequenas moléculas do que outras. Assim, a seleção de objetivos desempenha um papel fundamental no resultado final das atividades de identificação de *hits* e de *leads*. Além dos desafios bioquímicos e cinéticos intrínsecos na identificação de um modulador adequado de um alvo, a gama de ensaios utilizados influencia significativamente as hipóteses do sucesso.¹⁰

Na fase de descoberta de novos fármacos tornam-se importantes as ferramentas computacionais, nomeadamente o *docking* molecular e o estudo de bibliotecas selecionadas de compostos. É nesta fase que se obtêm os primeiros *hits*, que irão sofrer um processo de refinamento até à obtenção dos compostos *lead*. Na fase de refinamento do *hit*, as ferramentas computacionais tornam-se igualmente importantes, nomeadamente no auxílio da predição de propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e de toxicidade (ADMET) e nas relações quantitativas de relação estrutura-atividade (QSAR - do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Para além dos métodos *in silico*, também a química combinatória e as tecnologias de HTS desempenham um papel fundamental. Realizados todos os ensaios *in vitro* e *ex vivo* é necessário a confirmação do hit. Neste contexto, são desenvolvidos modelos *in vivo*, capazes de reproduzir as circunstâncias associadas à doença em estudo. Nesta fase são testadas as capacidades farmacológicas do *hit*, através de modelos de segurança e eficácia, e são escolhidos os compostos *lead*. Após selecionado o composto *lead*, todos os dados referentes à investigação são entregues às agências reguladoras do medicamento, como é o caso da Agência Europeia do Medicamento (EMA - do inglês, *European Medicines Agency*) e da *Food and Drug Administration* (FDA), para que possam ser realizados os respetivos ensaios clínicos. A realização destes ensaios compreende quatro fases, realizadas de uma forma sequencial. Na fase I são realizados ensaios de tolerância ao fármaco em voluntários saudáveis. Na fase II fazem-se ensaios de eficácia e intervalos de doses em voluntários doentes. Na fase III efetuam-se ensaios generalizados em milhares de pacientes, para se desenvolver uma ampla base de dados sobre a eficácia e segurança do potencial fármaco. E, por fim, a fase IV onde se realizam estudos após comercialização.^{6, 8, 10,11}

Apesar do desenvolvimento e investimento na indústria farmacêutica, o desenvolvimento de fármacos continua a ser um processo longo, caro, complexo e altamente arriscado. A investigação e desenvolvimento para a maioria dos medicamentos disponíveis requer entre 12 a 24 anos, desde o seu início até à aprovação do fármaco. Na fase de pesquisa (“descoberta”), apenas uma fração das hipóteses produzem um fármaco candidato para o desenvolvimento. A experiência tem demonstrado que, na fase de desenvolvimento, apenas cerca de um em cada 15 a 25 candidatos sobrevivem aos testes detalhados de segurança e eficácia necessários para ser comercializado e, mesmo após a comercialização, alguns não irão recuperar os seus custos de desenvolvimento no mercado competitivo e apenas um em cada três se tornará um produto comercialmente importante.⁶

1.1.1. Ensaios *in silico* - *docking* molecular e predição das propriedades ADMET

O uso de técnicas computacionais tem vindo a demonstrar ser uma estratégia eficaz para acelerar e economizar o processo da descoberta e desenvolvimento de fármacos. O aumento dramático na disponibilidade de informações sobre macromoléculas biológicas e pequenas moléculas ampliou a aplicabilidade do desenvolvimento computacional de fármacos, que passou a ser fortemente utilizado em quase todas as fases do processo de desenvolvimento de fármacos, incluindo a identificação e validação de alvos, descoberta e otimização dos compostos *lead* e testes pré-clínicos (figura 1.2).¹²

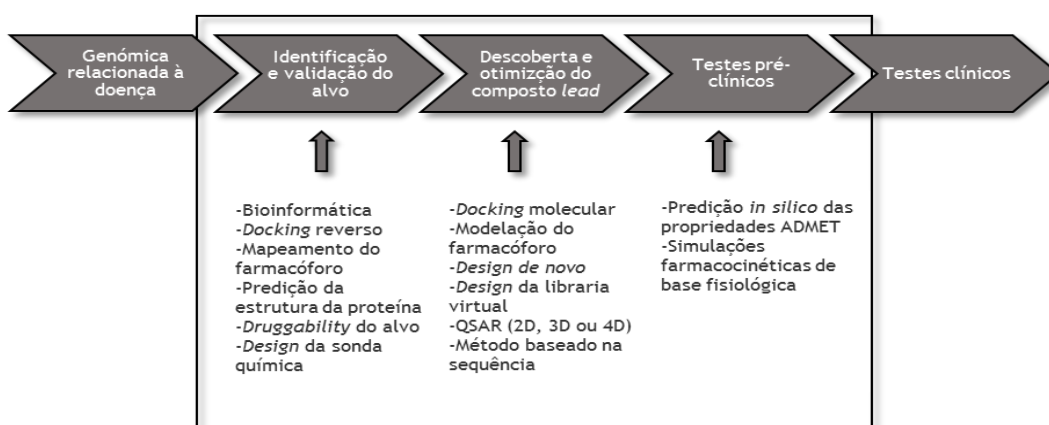


Figura 1.2 - Múltiplas abordagens computacionais de descoberta de fármacos que foram aplicadas na identificação e validação de alvo, descoberta e otimização do composto *lead* e testes pré-clínicos. Adaptado de OU-YANG *et al.*¹²

Um dos objetivos da descoberta racional de fármacos é a projeção de moléculas que possam modular seletivamente um alvo fisiológico, uma proteína na maioria dos casos, e usualmente

um recetor clássico ou uma enzima, cuja atividade ou expressão está especificamente associada a um estado patológico.¹³

Neste contexto, o *screening* virtual utilizando o *docking* molecular (figura 1.3) para identificar possíveis candidatos a fármacos tem revelado muito sucesso na última década, tendo mostrado ser uma ferramenta muito útil para o estudo do reconhecimento molecular de um ponto de vista qualitativo e quantitativo, encontrando-se entre as ferramentas mais utilizadas em estratégias de descobertas de fármacos baseadas na estrutura (SBDD - do inglês *structure-based drug design approach*), devido à sua vasta gama de aplicações.^{14,15,16} Esta ferramenta computacional permite prever com precisão a estrutura de um possível ligando confinado ao local de ligação do recetor e estimar corretamente a sua força de ligação.¹⁷

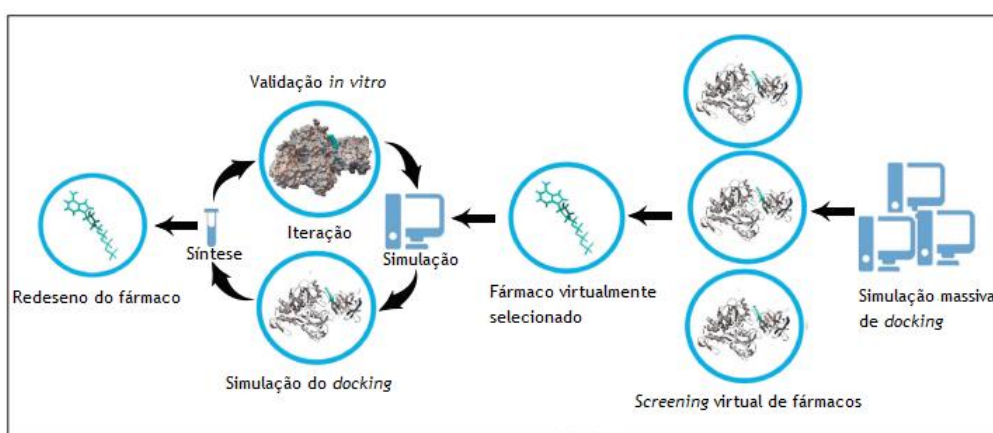


Figura 1.3 - Metodologia de *screening* virtual. Adaptado de Minie et al..¹⁴

Os *softwares* mais utilizados para a realização do *docking* molecular são o Gold, o Glide e o AutoDock, sendo que os dois primeiros são comerciais e o último encontra-se livre para utilização.¹⁸

A investigação tem demonstrado que a principal causa para a falha de candidatos a fármacos na sua fase de desenvolvimento são as fracas propriedades farmacocinéticas. Os ensaios rápidos de perfil de propriedades ADMET permitem a otimização dos candidatos a fármacos pelas suas propriedades biofarmacêuticas em paralelo com a otimização da sua eficácia nas fases iniciais da descoberta.¹⁹ Neste contexto, e em analogia com os *softwares* utilizados para a realização do *docking* molecular, também os *softwares* de predição de propriedades ADMET têm contribuído para o desenvolvimento de fármacos. De facto, muitas abordagens *in silico* foram desenvolvidas para prever propriedades farmacocinéticas e toxicidade de compostos a partir da sua estrutura química, nomeadamente usando modelos de QSAR 2D e 3D, pesquisa de similaridade e modelação do farmacóforo.²⁰

Entre outras, a abordagem, chamada pkCSM fornece uma plataforma para análise e otimização das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade implementadas numa interface *web*, fácil

de usar e disponível gratuitamente. Este método baseia-se em assinaturas de gráficos com base na distância, onde o conceito de *Cutoff Scanning* é utilizado para representar a estrutura e a química de pequenas moléculas (expressas como farmacóforos atômicos) para representar e prever as propriedades farmacocinéticas e de toxicidade, envolvendo 30 preditores, divididos em cinco classes principais: absorção (7 preditores), distribuição (4 preditores), metabolismo (7 preditores), excreção (2 preditores) e toxicidade (10 preditores).²⁰

1.1.2. Ensaios *in vitro*

Em analogia com os ensaios *in silico*, também os ensaios *in vitro* têm sido uma ferramenta importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. O perfil farmacológico *in vitro* de larga escala de novas entidades químicas durante as fases iniciais da descoberta de fármacos tornou-se uma ferramenta essencial na predição de efeitos clínicos. As tecnologias de ensaio modernas e o conhecimento em rápida expansão sobre recetores acoplados à proteína G, recetores nucleares, canais iónicos e enzimas tornaram possível implementar um grande número de ensaios que abordam possíveis potencialidades clínicas que, juntamente com outros ensaios *in vitro* com foco na toxicologia e biodisponibilidade, fornecem uma poderosa ferramenta no auxílio do desenvolvimento de novos fármacos.²¹

De uma forma geral, os ensaios baseados em células são aplicados a classes de alvo incluindo recetores de membrana, canais iónicos e recetores nucleares, gerando uma leitura funcional como consequência da atividade do composto. Contrariamente, os ensaios bioquímicos são aplicados num alvo recetor, como uma enzima, medindo simplesmente a afinidade do composto teste para a proteína alvo. No entanto, qualquer que seja o formato de ensaio selecionado é importante considerar uma série de fatores como a sua relevância farmacológica, reprodutibilidade, custos, qualidade e efeitos dos compostos no ensaio.¹¹

1.2. Xantina Oxidase

A XO, foi descoberta em 1902 por Sharding, ficando conhecida como “enzima de Sharding”.²² Desde cedo, que ficou conhecida como tendo a capacidade de desempenhar inúmeras funções, nomeadamente a capacidade de oxidar aldeídos a ácidos, de oxidar a hipoxantina em xantina com concomitante redução de oxigénio molecular (O₂) a peróxido de hidrogénio (H₂O₂), oxidar nitrito a nitrato, e ainda reduzir o mesmo nitrato a nitrito.^{23,24} Desde então, reconheceu-se que esta enzima desempenha um papel importante como alvo biológico na procura de novos fármacos.^{25,26}

1.2.1. Bioquímica e Mecanismo de ação

Atualmente, sabe-se que a XO e Xantina desidrogenase (XDH) mamíferas são formas interconversíveis do mesmo produto de gene, conhecido como Xantina Oxidorredutase (XOR). Estas enzimas contêm cerca de 1330 aminoácidos e a sequência de aminoácidos é altamente homóloga entre as enzimas de ratinho, rato, vaca e humano, com cerca de 90% de homologia.²⁷ Estas caracterizam-se por serem complexas flavoproteínas, compostas por duas subunidades catalíticas com aproximadamente 150 KDa.²⁸ Cada subunidade atua de forma independente durante a catálise e está organizada em três domínios associados a um cofator específico (figura 1.4).²⁹ O domínio N-terminal (resíduos 3-164), com 20 KDa, é composto por duas subunidades, cada uma com um centro ferro sulfúrico (Fe/S) coordenado com quatro resíduos de cisteína. Este domínio está ligado, através de um péptido de ligação ao segundo domínio (resíduos 192-527), com 40KDa, que contém um cofator de dinucleótido de adenina flavina (FAD - do inglês *Flavine Adenine Dinucleotide*). O domínio FAD está ligado ao terceiro domínio (resíduos 590-1315) através de outro péptido de ligação. Este domínio, o C-terminal, com 85 kDa contém o cofator de molibdopterina (Mo-P).^{30,31}

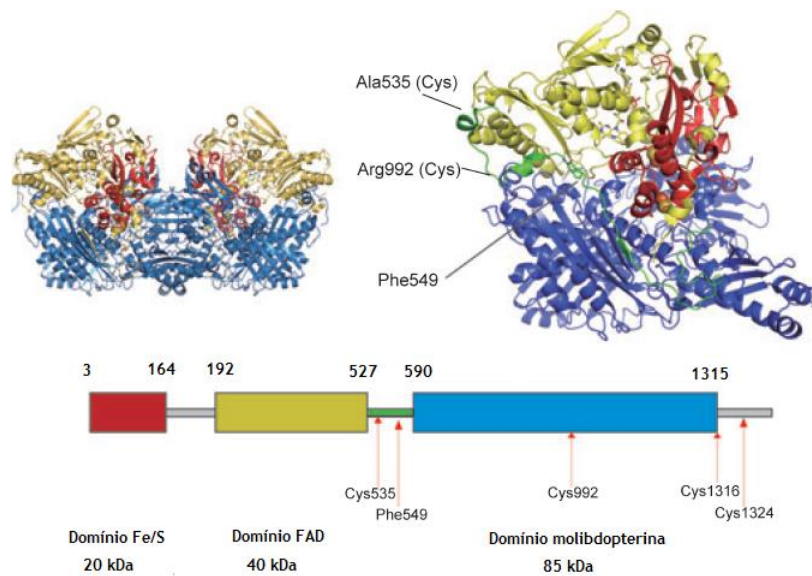


Figura 1.4 - Estrutura cristalizada da XDH de rato. Adaptado de Nishino *et al.*.³¹

A XOR encontra-se amplamente distribuída por várias espécies animais, no entanto, em células de mamíferos encontra-se maioritariamente na sua forma desidrogenase, que rapidamente é convertida na sua forma oxidase. A conversão de XDH em XO pode ocorrer de forma reversível, por oxidação dos resíduos de cisteína formando pontes dissulfureto, ou de forma irreversível, através de clivagem proteolítica.³² Durante a conversão reversível de XDH para XO, quatro resíduos de cisteína são modificados para formar duas pontes dissulfureto, em enzima de rato e leite de bovino.³³ Quando a XDH é tratada com proteases, é convertida irreversivelmente em XO. A tripsinização da enzima de rato dá origem a três fragmentos de 20, 40 e 85 KDa que,

embora permaneçam fortemente associados para manter a atividade enzimática, podem ser dissociados sob condições de desnaturação.³⁴ A proteólise, ou a formação de pontes dissulfureto na conversão de XDH para XO provocam alterações conformacionais na proteína, nomeadamente em torno da flavina, com a perda do local de ligação ao dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD - do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*) provocando alterações na sua reatividade (figura 1.5).³⁵

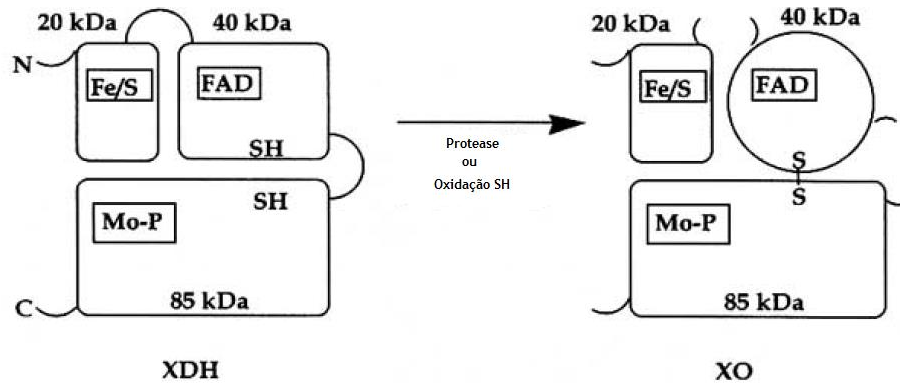
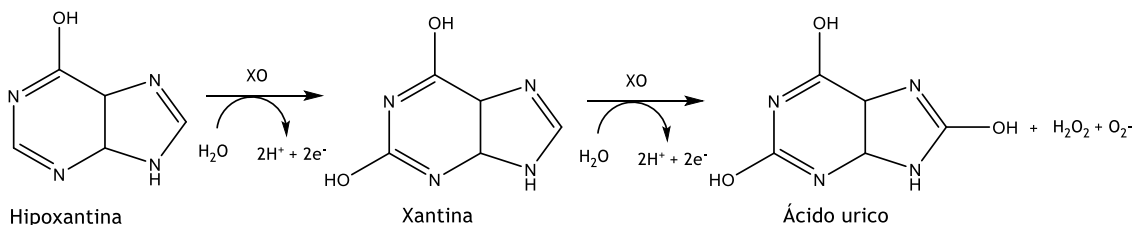


Figura 1.5 - Modelo estrutural da XDH e XO. Apenas uma subunidade da proteína dimérica é mostrada. Adaptado de Borges *et al.*²⁶

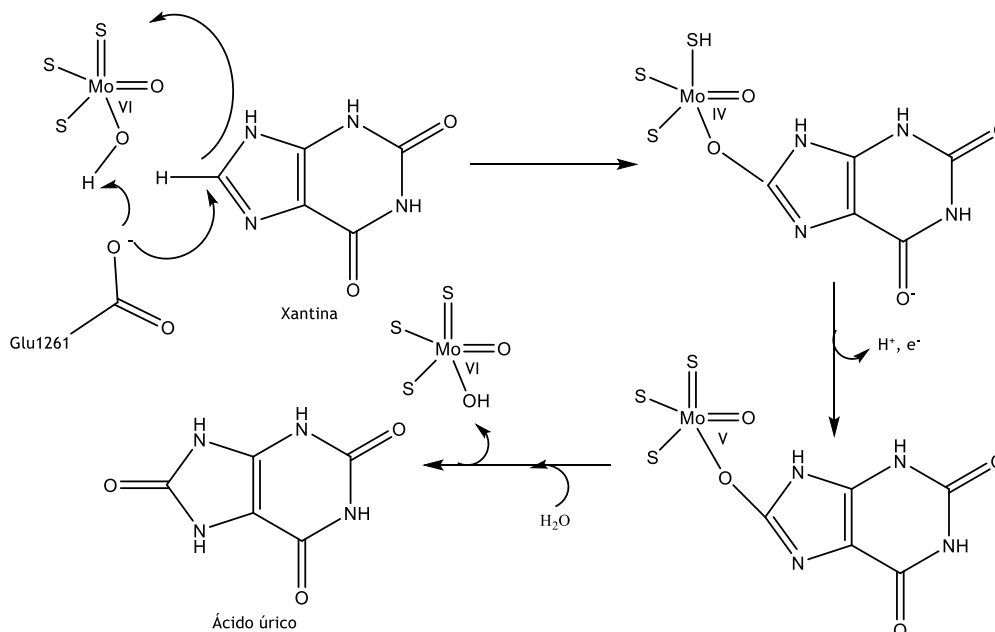
A XO é geralmente reconhecida como sendo a enzima limitadora da velocidade da via de degradação de purinas em seres humanos, convertendo hipoxantina em xantina e xantina em ácido úrico (esquema 1.1).



Esquema 1.1 - Reações catalisadas pela XO. Adaptado de Tamta *et al.*³⁶

A hidroxilação de xantina em ácido úrico ocorre no centro de Mo-P da enzima, provocando a redução do metal de Mo (VI) para Mo (IV). A reação de hidroxilação passa através de um intermediário no qual o produto de ácido úrico nascente é coordenado com o molibdénio (reduzido) através do grupo hidroxilo recentemente introduzido como Mo^{IV}-OR (esquema 1.2).^{37,38,39} Na primeira semirreação de catálise, dois eletrões são transferidos da xantina para o molibdénio sendo rapidamente transferidos para o FAD com a mediação dos centros de Fe₂-S₂, onde ocorre a segunda semirreação de catálise, com a redução do NAD⁺ a NADH e do O₂ a anião superóxido (O₂⁻) e H₂O₂.⁴⁰ Assim, a reoxidação global da XO completamente reduzida produz duas moléculas de H₂O₂ e duas espécies de O₂⁻.⁴¹ Tanto a XDH como a XO podem reduzir O₂ a O₂ e H₂O₂. No entanto, a XDH é caracterizada como tendo alta reatividade em relação ao

NAD^+ e baixa reatividade em relação a O_2 , enquanto a XO tem alta reatividade em relação a O_2 , mas reatividade insignificante em relação a NAD^+ .²⁶



Esquema 1.2 - Transformação de xantina em ácido úrico. Adaptado de *Kóstic et al.*⁴²

1.2.2. Distribuição

A XOR está presente em inúmeras espécies, incluindo bactérias, vertebrados e invertebrados. Nos mamíferos, os níveis mais elevados da atividade da XOR são encontrados no fígado e no intestino delgado.⁴³ No entanto, a sua atividade também foi identificada noutros tecidos, como no músculo esquelético, coração e cérebro.⁴⁴ Para além disso, estudos imuno-histoquímicos mostraram que a enzima está localizada em células epiteliais de glândula mamária, células endoteliais capilares e pequenos vasos.^{45,46} Após períodos de stress metabólico, a XO é libertada na circulação, a partir dos órgãos ricos nesta enzima, ligando-se com elevada afinidade às células endoteliais através de interações eletrostáticas com glicosaminoglicanos de heparina.⁴⁷ Além disso foram encontradas atividades baixas de XO no cérebro de rato, assim como em cérebro humano e placenta, para além de que a atividade da XOR também está presente em concentrações muito baixas no coração, pele, músculo, baço, pâncreas, tireoide, glândulas supra-renais, útero, diafragma, ovário, medula óssea, mesentério e tecido adiposo. No entanto, em tumores cerebrais humanos, a atividade da XO parece ser aumentada.²⁶ Contudo, a localização subcelular da XOR parece ser controversa e não se encontra completamente descrita. Porém, métodos de localização subcelular demonstraram a presença de XOR tanto no citoplasma, como nas membranas celulares.⁴⁸ Apesar de se encontrar descrita como sendo uma enzima citosólica, foi identificada nos peroxissomas de hepatócitos e em vários organelos de Kupffer e células sinusoidais, incluindo o retículo endoplasmático rugoso, vesículas endocíticas e lisossomas.^{49,50}

1.2.3. O papel fisiológico da XOR

Durante muitas décadas, acreditava-se que o único propósito da XO era o seu envolvimento no catabolismo de purinas. No entanto, um conjunto amplo de evidências sugerem um papel biológico muito amplo para esta enzima. Esta apresenta uma ampla especificidade para oxidar substratos, podendo hidroxilar uma grande variedade de purinas, pteridinas, heterociclos aromáticos e aldeídos aromáticos e alifáticos, nomeadamente o acetaldeído, índole-3-aldeído e piridina-2-aldeído.³⁸

A importância da XOR é notória no caso da deficiência hereditária de XDH, o que leva à xantínúria.⁵¹ Na xantínúria clássica tipo I, apenas a atividade da XDH está ausente, enquanto na xantínúria do tipo II a atividade da aldeído oxidase (AO) é também deficiente. Mais complicada ainda é a presença de deficiência do cofator de molibdénio, em que a atividade de sulfite oxidase (SO) está ausente, bem como a AO e XDH. As xantínúrias clássicas são desordens autossômicas recessivas raras,⁵² onde os indivíduos afetados podem desenvolver cálculos do trato urinário, insuficiência renal aguda ou miosite devido à deposição de xantina nos tecidos, permanecendo alguns indivíduos com xantínúria homozigótica assintomáticos. A deficiência de cofator molibdénio é geralmente associada a distúrbios neurológicos graves.²⁶

A XOR também pode ter propriedades antimicrobianas, uma vez que inibe o crescimento de bactérias *in vitro* de uma forma dependente de óxido nítrico (NO - do inglês *Nitric oxide*).⁵³ Existem também evidências de que a XOR desempenha um papel antimicrobiano *in vivo*, uma vez que crianças que recebem leite rico em XOR têm menos probabilidade de desenvolver gastroenterite.⁵⁴ Além disso, um papel protetor da XOR é indicado por observação de que a inibição específica de XOR pode aumentar a atividade microbiana.⁵⁵ Embora a XOR participe claramente na defesa antimicrobiana, os pacientes com xantínúria não são imunocomprometidos, indicando que o papel da XOR na defesa do hospedeiro não é essencial.²⁷

1.2.4. O papel da XOR em patofisiologias

1.2.4.1. Produção de radicais livres induzidos pela XO

As espécies reativas de oxigénio (ROS - do inglês *Reactive oxygen species*) são geradas por vários sistemas, incluindo NADPH oxidases, enzimas respiratórias mitocondriais e XO, podendo contribuir para diversos fenómenos fisiológicos e patológicos.²⁹ Os radicais livres e os seus produtos secundários têm vindo a ser implicados em muitos distúrbios vasculares, incluindo hipoxia, doença miocárdica, enfarte, hipertensão, aterosclerose e isquemia-reperusão.²⁶

As ROS geradas pela XOR estão implicadas tanto na sinalização celular quanto no dano estrutural do tecido. De uma maneira geral, as ROS podem causar peroxidação lipídica, resultando num

rompimento da arquitetura da membrana, com libertação de enzimas lisossômicas e, oxidação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e aminoácidos, causando mutações genéticas e disfunção enzimática ou proteólise.⁵⁶

Os subprodutos gerados pela XO, como o O_2^- e H_2O_2 podem levar a várias condições patológicas, como a lesão oxidativa. Na reação geral de Haber-Weiss, o ferro (III) é reduzido por O_2^- a ferro (II) e O_2 , e num segundo passo (reação de Fenton) o ferro (II) produzido reage com o H_2O_2 para gerar o radical hidroxilo ($\cdot OH$), altamente reativo. O $\cdot OH$ tem uma meia vida muito curta, oxidando indiscriminadamente o seu alvo mais próximo, sendo que em tecidos biológicos, o $\cdot OH$ pode atacar moléculas adjacentes e causar danos irreparáveis.^{57,58}

Em tecidos saudáveis, a maior parte da XOR existe como XDH, no entanto, e como já foi referido (subsecção 1.2.1) é rapidamente convertida em XO. Muita atenção tem sido dada à XO em relação à patogénese da isquemia-reperfusão e lesão de hipoxia.⁵⁹ De acordo com a hipótese principalmente considerada, uma grande quantidade de hipoxantina é libertada durante a isquemia devido à degradação de adenosina trifosfato (ATP).⁶⁰ Simultaneamente, e como consequência da rápida conversão de XDH em XO, existe uma produção aumentada de O_2^- e H_2O_2 . Após a reperfusão, quando o O_2 é reintroduzido, a XO oxida a hipoxantina acumulada e produz ainda mais radicais de oxigénio tóxicos, causando danos nos tecidos.⁵⁹ Embora o papel proposto para a XO na patogénese da isquemia-reperfusão pareça ser fundamental, é mais complexo do que inicialmente previsto.²⁶

Desde a introdução do conceito de lesão de isquemia-reperfusão, várias são as evidências que suportam o papel da produção de ROS derivadas da XO e os efeitos benéficos de inibidores da XO contra danos isquémicos do coração, cérebro, intestino, fígado, rim, pulmão e outros tecidos.⁶¹

Além disso, foi observado, que após períodos de stress metabólico, a XO é libertada na circulação a partir dos órgãos ricos na sua atividade, como o fígado e intestino. As condições patológicas que apresentam uma concentração aumentada de XO no plasma incluem hepatite de múltiplas etiologias, choque hemorrágico, isquemia-reperfusão, infeção viral aguda, stress térmico, síndrome do desconforto respiratório adulto, hipercolesterolemias e carcinogénese.⁴⁷

1.2.4.2. Ácido úrico e hiperuricemia

O ácido úrico (7,9-dihidro-1*H*-purina-2,6,8(3*H*))-triona) é o produto final do metabolismo de purinas endógenas ou exógenas. A sua produção endógena ocorre principalmente no fígado, intestinos e outros tecidos, como músculos, rins e endotélio vascular, enquanto a produção exógena está intimamente ligada com a dieta. A formação do ácido úrico a partir do catabolismo de purinas ocorre através de uma série de reações enzimáticas que envolvem, em última instância a XO.⁶² A pH fisiológico o ácido úrico, sendo um ácido fraco com pka de 5,8, é

quase todo ionizado a urato de sódio, o sal do ácido úrico. À medida que a concentração de urato aumenta no sangue, a formação de cristais de ácido úrico aumenta. A solubilidade do ácido úrico em água é baixa e, nos humanos, quando a sua concentração média está próxima do limite de solubilidade (6,8 mg/dl) são formados cristais de ácido úrico na forma de urato monossódico (MSU - do inglês *Monosodium urate*).⁶³ Em várias espécies, outra enzima, a uricase (urato oxidase), converte o ácido úrico em alantóina mais solúvel. No entanto, os seres humanos e outros primatas não possuem urato oxidase funcional, o que, conseqüentemente, leva a níveis mais elevados de ácido úrico no sangue.⁶⁴ Em condições normais, dois terços do ácido do ácido úrico produzido são eliminados pela urina e um terço é removido pelo trato biliar.⁶⁵

A hiperuricemia é uma doença metabólica caracterizada pelo aumento dos níveis de ácido úrico no sangue, provocando a deposição de cristais de urato nas articulações e nos rins.⁶⁶ A hiperuricemia e a gota não devem ser confundidas. Enquanto a hiperuricemia é normalmente uma doença assintomática, os ataques de gota são descritos como sendo extremamente dolorosos. A gota ocorre, quando os cristais de MSU se depositam no fluido sinovial envolvendo as articulações e nos tecidos moles, provocando uma resposta inflamatória grave. A hiperuricemia é um fator de risco importante para a gota, no entanto, pode também provocar hiperlipidemia, hipertensão e diabetes.^{66,67}

1.2.5. Inibidores da Xantina Oxidase

1.2.5.1. Inibidores purínicos

O alopurinol (1,5-dihidro-4-*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina-4-ona), um análogo purínico, foi o primeiro inibidor da XO aprovado pela FDA, em 1966, para o tratamento da gota, permanecendo até hoje como terapia na hiperuricemia primária e secundária.²⁵ O alopurinol atua como inibidor da XO e, *in vivo*, é rapidamente oxidado ao seu metabolito ativo, o oxipurinol (ambos isómeros da hipoxantina e xantina, respectivamente).^{25,61} Em baixas concentrações, o alopurinol é substrato e atua como inibidor competitivo da enzima, enquanto a altas concentrações atua como inibidor não competitivo. O oxipurinol atua como inibidor não competitivo, inibindo a XO através de ligação ao molibdênio por ligação covalente, e a sua formação, em conjunto com a sua persistência nos tecidos é responsável por grande parte da atividade farmacológica do alopurinol.⁶¹ Em termos farmacocinéticos, o alopurinol é rapidamente absorvido, sendo o pico de concentração plasmática atingido dentro de 30 a 60 minutos, após administração oral. Este, é rápida e completamente absorvido tendo uma meia vida no plasma de 2 a 3 horas. Por outro lado, o oxipurinol tem uma meia vida longa, de 16 a 30 horas, devido à sua reabsorção renal.²⁶

A utilização do alopurinol está, contudo, associada a vários efeitos adversos, sendo que os mais comuns são desconforto gastrointestinal, reações de hipersensibilidade e erupção cutânea. Este, pode ainda aumentar os efeitos da ciclofosfamida e inibir o metabolismo dos anticoagulantes orais e do probenecid. Os sintomas de intoxicação por alopurinol incluem febre, erupção cutânea, vasculite, eosinofilia e diminuição da função renal, o que pode levar a um desfecho fatal, especialmente em pacientes idosos com insuficiência renal medicados com diuréticos tiazídicos.⁶¹

Como tentativa de contornar os vários problemas do alopurinol, vários análogos purínicos têm vindo a ser sintetizados, nomeadamente, 2-amino-4-hidroxi-6-hidroxiimetilpteridina,⁶⁸ 6-formilpterina,⁶⁹ 3-hidroxi-1-nitrofenil-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]piridinas⁷⁰ e pirazolo (3,4-*d*)pirimidinas (figura 1.6).⁷¹

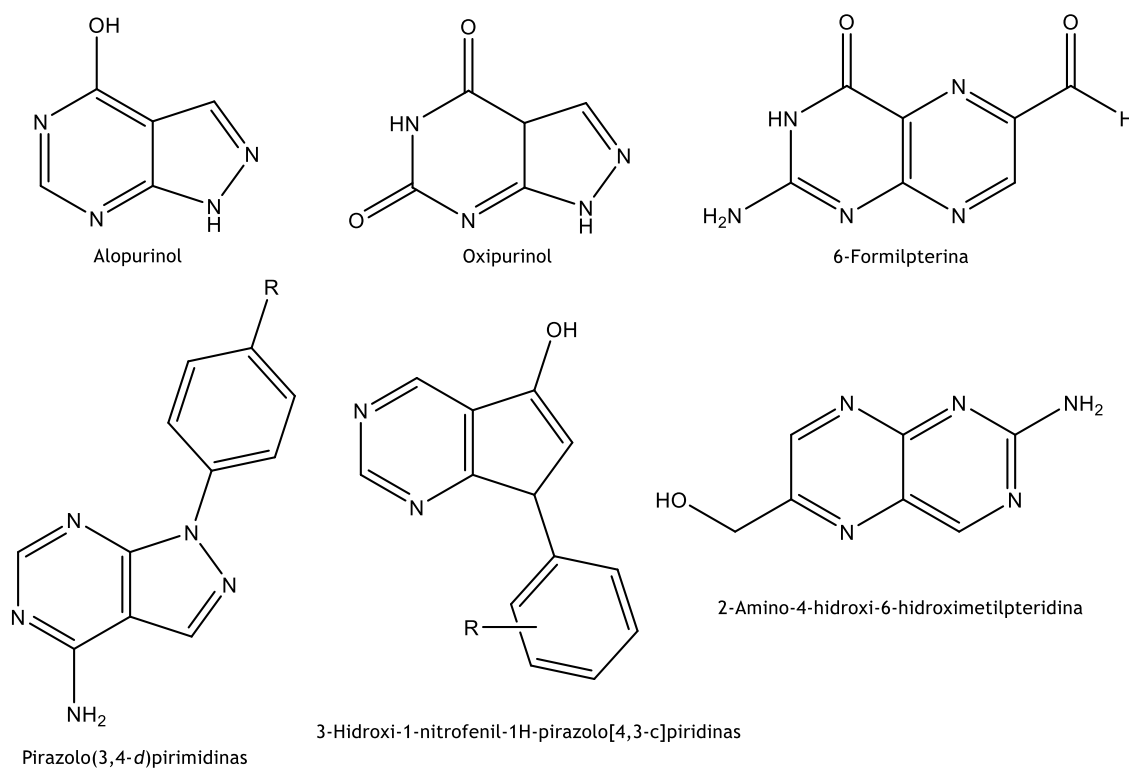


Figura 1.6 - Alguns análogos purínicos inibidores da XO.

1.2.5.2. Inibidores não purínicos de origem sintética

O febuxostat (ácido 2-[3-ciano-4-(2-metilpropoxi)-fenilo]-4-metiltiazole-5-carboxílico), um derivado tiazole, foi o primeiro inibidor seletivo não purínico da XO, aprovado para o tratamento da hiperuricemia em pacientes com gota pela EMA e FDA. É mais potente e seletivo do que o alopurinol e, é principalmente metabolizado pelo fígado. Além disso, e ao contrário do alopurinol, o febuxostat não inibe outras enzimas envolvidas no metabolismo das purinas e pirimidinas. O mecanismo de inibição da atividade da XO por parte do febuxostat é do tipo mista, contrastando com a cinética competitiva do alopurinol. Esta diferença no mecanismo

cinético é consistente com a descoberta de que o febuxostat bloqueia o acesso do substrato à porção Mo-P da XO, ocupando um canal na enzima que conduz ao local ativo e que o febuxostat é capaz de inibir tanto a forma oxidada como reduzida da enzima.⁷² Esta capacidade de inibição da atividade da XO independentemente do seu estado redox não induz a formação indesejada de ROS, ao contrário do que acontece com a inibição pelo alopurinol.⁷³

Impulsionado pela descoberta do febuxostat, que atraiu a atenção dos investigadores, muitos outros análogos não purínicos têm sido descritos como inibidores da XO. Após um *screening* a uma série de 1-fenilpirazoles foi obtido o Y-700 (ácido [1-(3-ciano-4(2,2-dimetilpropoxi)fenilo)-1H-pirazole-4-carboxílico]), um potente inibidor da XO, que atua através da obstrução do local de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, tal como o febuxostat.^{74,75} Para além deste, podem encontrar-se, entre outros, N-(1,3-diaril-3-oxopropil)amidas⁷⁶, 1-acetil-3,5-diaril-4,5-dihidro(1H)pirazoles⁷⁷ e um derivado de 4,4-dipiriditriazole, o FXY-051, que se encontra em fase II de ensaios clínicos (figura 1.7).⁷⁸

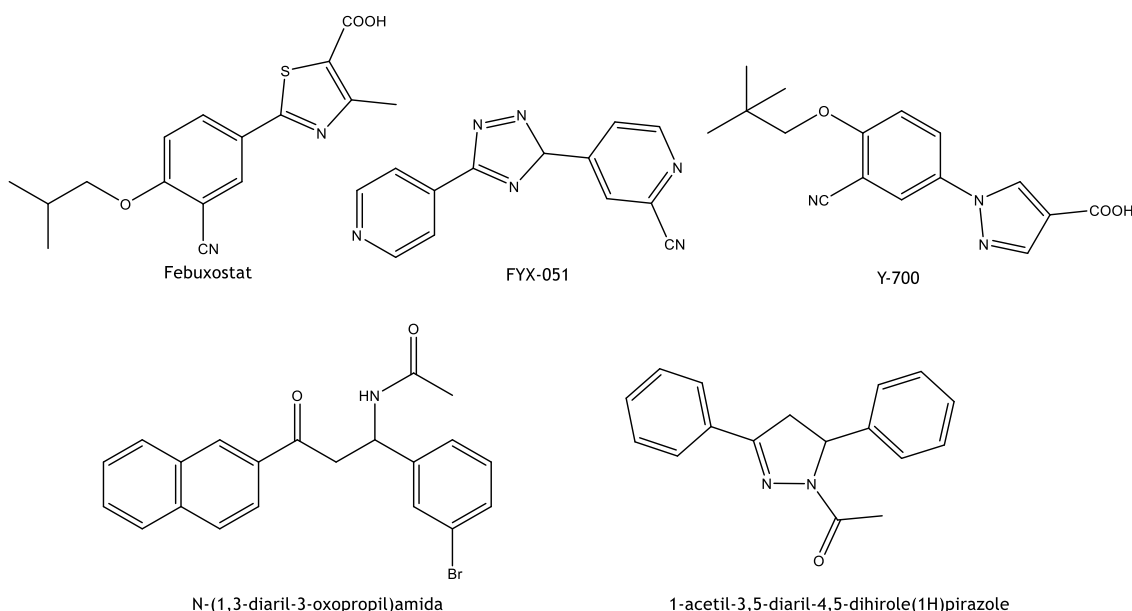


Figura 1.7 - Alguns análogos não purínicos inibidores da XO.

1.2.5.3. Inibidores não purínicos de origem natural

Alguns produtos naturais têm sido também reportados como sendo potentes inibidores da atividade da XO, podendo estes ser um ponto de partida para o desenvolvimento de novos inibidores da XO.⁷⁹ De entre os inibidores não purínicos de origem natural podem-se encontrar compostos flavonóides, como a quercetina⁸⁰ e apigenina⁸⁰, derivados de coumarina, como a 6,7-di-hidroxicoumarina⁸¹, assim como o ácido cafeico e o éster fenético do ácido cafeico (figura 1.8).⁸²

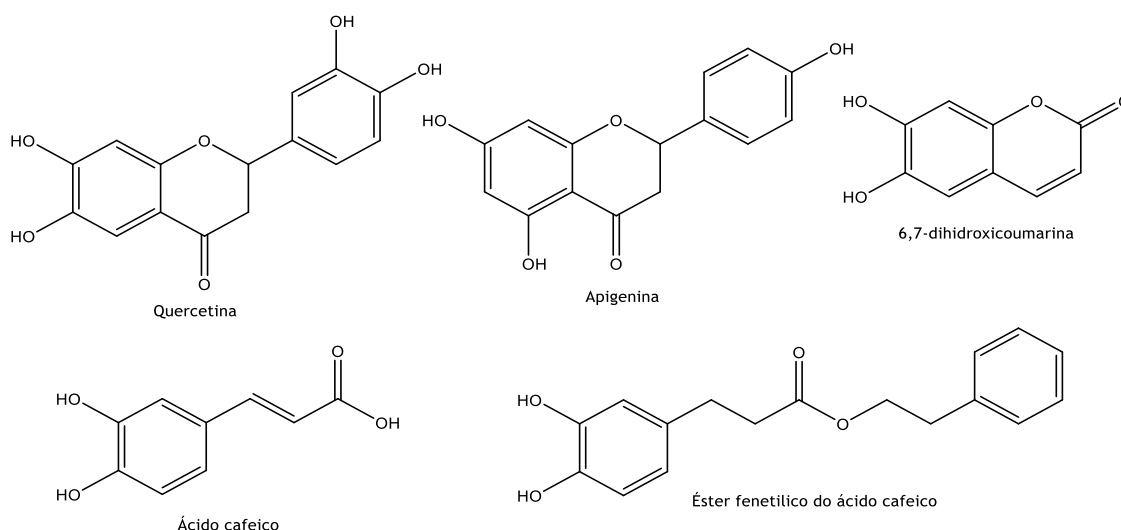
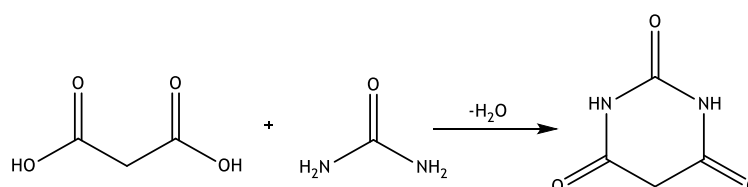


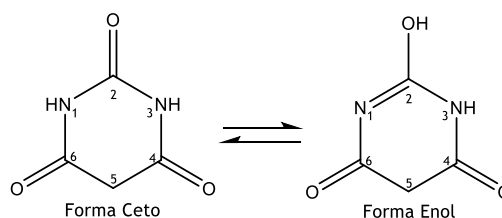
Figura 1.8 - Alguns análogos de origem natural inibidores da XO.

1.3. Barbituratos

A síntese do ácido barbitúrico, através da condensação da ureia com o ácido malónico e eliminação de água (esquema 1.3), foi descoberta em 1864 por Adolph Von Baeyer, um químico alemão, prêmio nobel da química em 1905. Embora seja mais correto considerá-lo como um derivado de pirimidina, é normalmente descrito como sendo uma ureida cíclica de ácido malónico, existindo na forma ceto ou enol (esquema 1.4).⁸³



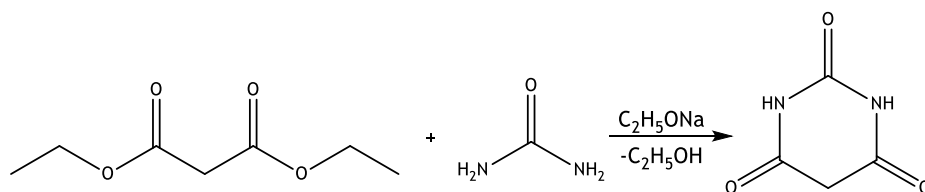
Esquema 1.3 - Síntese do ácido barbitúrico a partir do ácido malónico e ureia.



Esquema 1.4 - Diferentes formas de representação do ácido barbitúrico.

Desde a sua síntese original, muitos outros métodos têm sido descritas na literatura, sendo as mais importantes a condensação entre a ureia e ácidos malónicos, dicloretos de malonilo ou esteres malónicos. No entanto, o procedimento mais comum e amplamente utilizado na

indústria consiste na condensação da ureia com malonato de dietilo na presença de etóxido de sódio em etanol anidro (esquema 1.5).⁸⁴



Esquema 1.5 - Síntese do ácido barbitúrico a partir do malonato de dietilo e ureia.

A descoberta do ácido barbitúrico levou a uma série de derivados com estrutura similar, abrindo caminhos para a descoberta de novos compostos com valor terapêutico significativo. Em 1903, Emil Fischer e Josef Von Mering, sintetizaram o primeiro barbitúrico terapeuticamente ativo, através da substituição dos átomos de hidrogénio, em C-5, por dois substituintes etilo. Assim surgiu o ácido 5,5-dietil-barbiturico, ou barbital, um fármaco muito popular, com propriedades sedativo-hipnóticas.^{83,85}

Numa tentativa de contornar os efeitos secundários atribuídos ao ácido 5,5-dietil-barbiturico, foram feitas pequenas alterações à molécula de ácido barbitúrico, surgindo mais de 2500 novas moléculas.⁸⁵

Neste contexto, em 1912, surgiu o ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico, ou fenobarbital, tornando-se no segundo derivado terapeuticamente ativo do ácido barbitúrico, e é comercializado como Luminal®. O fenobarbital ficou conhecido como sendo o “rei dos barbituratos”, tendo representado um enorme avanço na aplicação terapêutica dos barbitúricos pois, apesar das suas propriedades sedativo-hipnóticas, possuía também propriedades anti-convulsivantes, podendo ser utilizado com sucesso contra a epilepsia.⁸⁵

A descoberta do barbital e do fenobarbital impulsionou a investigação em torno dos derivados do ácido barbitúrico, que, apesar de ser uma molécula farmacologicamente inativa, esta na base de compostos com elevada atividade biológica, quando sofre alterações no C-5 do seu esqueleto base.⁸⁵ Apesar de terem sido sintetizados milhares de compostos, o esqueleto do ácido barbitúrico 5,5-disubstituído revelou ser o farmacóforo necessário para as principais atividades farmacológicas.^{85,86} Nesta âmbito, alterações na cadeia lateral da posição 5, por dissobstituintes mais lipofílicos, levaram à descoberta do amobarbital, pentobarbital, e secobarbital (figura 1.9). Para além das alterações em C-5, as modificações na posição 2 deram origem ao tiopental e tiamilal (figura 1.9).^{86,87}

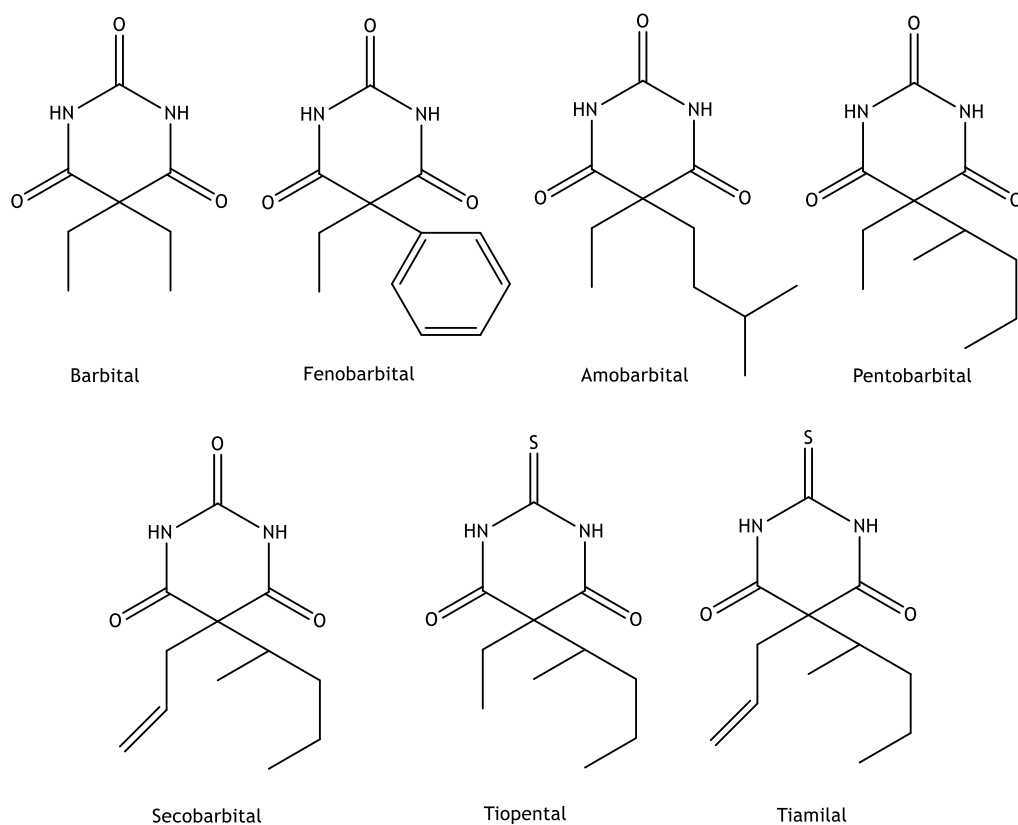


Figura 1.9 - Alguns ácidos (tio)barbitúricos com efeitos no SNC. Adaptado de *Lemke et al.*⁸⁶

Farmacologicamente os barbituratos são considerados potentes depressores do sistema nervoso central (SNC), tendo atividades sedativo-hipnóticas, anestésicas e anti-convulsivantes.⁸⁶ Estes são normalmente divididos em quatro classes e classificados de acordo com a sua duração de ação em barbitúricos de longa duração, duração intermédia, curta duração e ação ultrarrápida (Tabela 1.1), estando esta classificação intimamente ligada com o grau de lipofilia.^{86,88}

Tabela 1.1 - Alguns dados farmacocinéticos de alguns barbituratos. Adaptado de *Lemke et al.*⁸⁶

Barbiturato	Ação	Duração de ação	Log P
Barbital	Longa	10-16 h	0,65
Fenobarbital	Longa	10-16 h	1,46
Amobarbital	Intermédia	6-8 h	2,07
Pentobarbital	Curta	3-4 h	2,10
Secobarbital	Curta	3-4 h	2,36
Tiopental	Ultrarrápida	10-30 minutos	2,85
Tiamilal	Ultrarrápida	10-30 minutos	-

Embora a perda de atividade dos barbitúricos ocorra principalmente devido à redistribuição, estes também sofrem transformações metabólicas. O metabolismo dos barbituratos está diretamente relacionado com o seu grau de solubilidade lipídica, uma vez que compostos mais lipofílicos sofrem maiores alterações metabólicas, dando origem a metabolitos que não possuem um grau tão elevado de lipofilia, resultando na perda de atividade. A via mais importante no metabolismo dos barbituratos é a oxidação e/ou remoção dos substituintes em C-5. Embora não tão significativas, a dessulfuração oxidativa de tiobarbituratos ou a *N*-desalquilação oxidativa dos átomos de azoto podem também ocorrer durante o metabolismo.⁸⁶

Para além do uso clássico como potentes depressores do SNC os barbituratos desempenharam um papel importante na compreensão do recetor ácido γ -aminobutírico (GABA), e só foram substituídos por outros agentes, nomeadamente as benzodiazepinas, por problemas associados à segurança da sua utilização.⁸⁶ Hoje em dia, os derivados de ácido barbitúrico têm atraído a atenção dos investigadores, uma vez que têm sido encontradas novas aplicações biomédicas para estes compostos, como sendo inibidores de metaloproteinases da matriz,^{89,90} anti-tumorais,⁹¹ anti-bacterianos,⁹² anti-fungicos,⁹³ anti-virais⁹⁴ e anti-oxidantes⁹⁵.

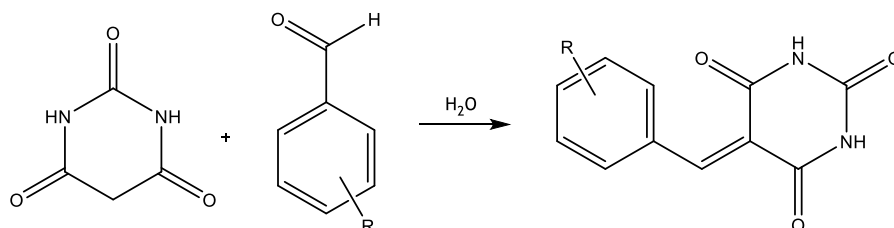
1.3.1. Funcionalizações em C-5

A diversidade de atividades biológicas e o amplo espaço químico tornam os derivados do ácido barbitúrico compostos atrativos para os químicos medicinais. Devido à sua disponibilidade e a várias possibilidades de funcionalização, o ácido (tio)barbitúrico torna-se um material de partida conveniente para a preparação de diferentes heterocíclicos fundidos, assim como de derivados 5-substituídos.^{85,96}

A presença de um grupo metileno ativo na posição 5 do ácido barbitúrico, permite que esta molécula seja facilmente envolvida em reações de condensação com aldeídos ou cetonas que, não contenham um hidrogénio- α . Este tipo de reação é conhecida como reação de condensação de Knoevenagel, podendo gerar produtos de condensação mono ou di-substituídos.⁹⁷

Para se conseguir a formação de um produto de condensação monosubstituído entre ácidos (tio)barbitúricos e aldeídos aromáticos, inúmeros métodos sintéticos têm sido descritos, nomeadamente com o uso de catalisadores ácidos ou bases, e técnicas envolvendo irradiação micro-ondas ou irradiação de infravermelho. Neste contexto, Jursic *et al* desenvolveram um método de condensação sem o uso de catalisadores e na presença de metanol.⁹⁷ No entanto, existem algumas desvantagens nos procedimentos acima descritos, nomeadamente o uso de solventes orgânicos voláteis e altos tempos de reação para se conseguirem rendimentos modestos. Assim, Deb *et al* realizaram a condensação de Knoevenagel em meio aquoso (esquema 1.6), sem adição de solventes e catalisadores, obtendo bons rendimentos num curto

tempo de reação, tornando-se num método mais vantajoso, para além de contribuir para uma química mais verde.⁹⁸



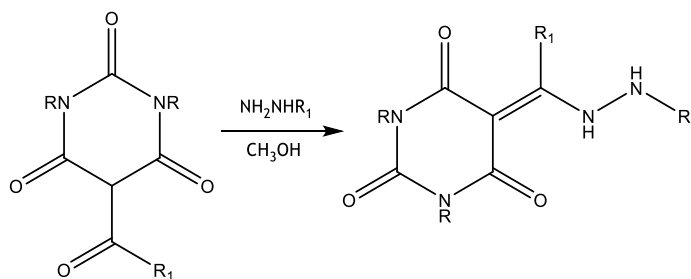
Esquema 1.6 - Síntese de 5-benzilidenopirimidinas a partir da condensação entre o ácido barbitúrico e um aldeído aromático.

Para além de serem considerados intermediários importantes para a síntese de novos compostos heterocíclicos,⁹⁹ as 5-benzilidenopirimidinas derivadas de ácidos (tio)barbitúricos, têm sido caracterizadas como sendo compostos biologicamente ativos, apresentando atividade inibitória da tirosinase dos cogumelos,¹⁰⁰ da uridina fosforilase,¹⁰¹ ação anti-bacteriana¹⁰² e inibitórios da XO.¹⁰³

De entre as funcionalizações possíveis dos ácidos (tio)barbitúricos encontram-se também as 5-acilpirimidinas, resultantes da introdução de um grupo acilo na posição 5 do ácido (tio)barbitúrico.^{104,105}

Para além das suas aplicações na medicina¹⁰⁶ e na indústria,^{107,108} os 5-acilbarbituratos desempenham um papel importante como precursores de moléculas com elevado potencial biológico, nomeadamente de bases de Schiff, benzenossulfo-hidrazonas, acil-hidrazonas, hidrazonas e fenil-hidrazonas.^{104,105}

Para a síntese de hidrazonas e fenil-hidrazonas existem várias metodologias, sendo a condensação direta de 5-acilbarbituratos com diferentes hidrazinas usando metanol como solvente, o método mais simples e rápido (esquema 1.7).¹⁰⁵

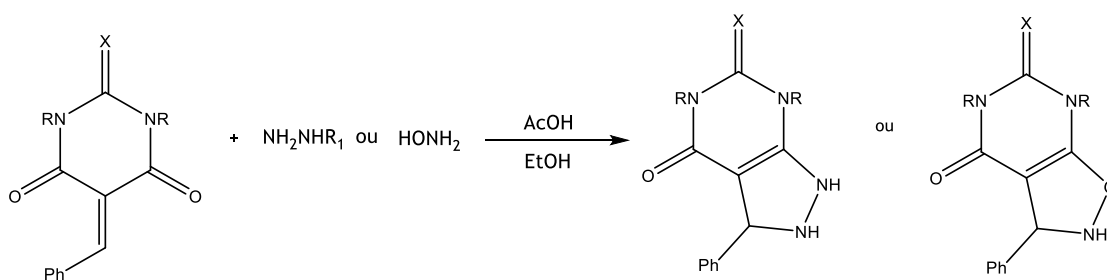


Esquema 1.7 - Síntese de hidrazonas ou fenil-hidrazonas a partir da condensação entre 5-acilpirimidinas com diferentes hidrazinas.

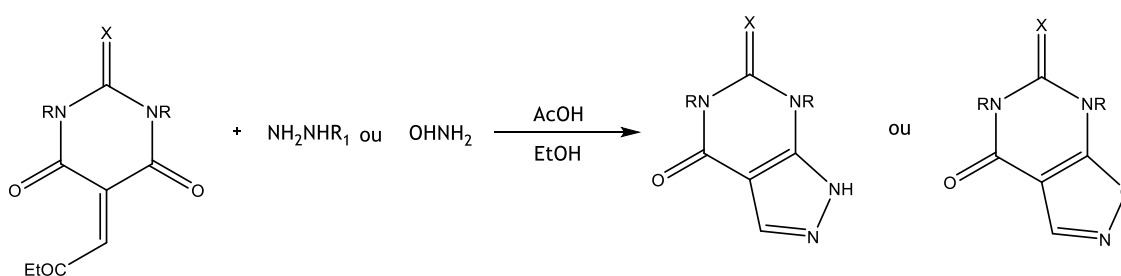
1.3.2. Ciclizações em C5-C6

Há muito que os derivados de pirimidinas estão associados a diversas atividades biológicas, observando-se que a introdução de heterociclos fundidos num núcleo pirimidínico aumenta essa atividade.¹⁰⁹ Neste contexto, e como o principal objetivo desta dissertação passava pela obtenção de derivados de ácidos (tio) barbitúricos fundidos com anéis de 5 membros em C5-C6, são aqui revistas algumas abordagens para a obtenção de pirazolopirimidinas e isoxazolopirimidinas.

A formação de pirazolopirimidinas e oxazolopirimidinas foi descrita por Thokchom *et al* através de duas abordagens.¹⁰⁹ Numa primeira abordagem, a formação de pirazolopirimidinas ou oxazolopirimidina, consoante a hidrazina utilizada, tem como base uma adição de Michael à dupla ligação de uma 5-benzilidenopirimidina, seguindo-se um ataque nucleofílico da hidrazina ao carbonilo vicinal (esquema 1.8). Na segunda abordagem, a ciclização ocorre através de uma reação de adição seguida de eliminação de etanol e posterior ataque nucleofílico ao carbonilo vicinal (esquema 1.9).

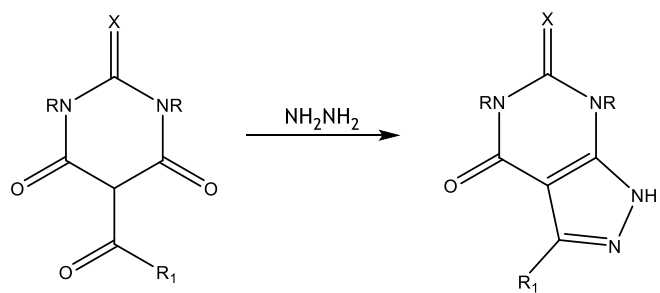


Esquema 1.8 - Síntese de pirazolopirimidinas e oxazolopirimidinas a partir de 5-benzilidenopirimidinas e respetiva hidrazina ou hidroxilamina.



Esquema 1.9 - Síntese de pirazolopirimidinas e oxazolopirimidinas a partir de 5-(etoxi)-metilenopirimidinas e respetiva hidrazina ou hidroxilamina.

Outra abordagem diferente foi reportada por Faidallah *et al*, que descreve a formação de pirazolopirimidinas a partir de 5-acilpirimidinas, através de dois ataques nucleofílicos por parte da hidrazina (esquema 1.10).¹¹⁰



Esquema 1.10 - Síntese de pirazolopimidinas a partir de 5-acilpirimidinas e hidrazina.

2. Objetivos

Esta dissertação teve como objetivos:

- A síntese e caracterização estrutural de derivados (tio)barbituratos com potencial interesse biológico.
- A avaliação biológica dos (tio)barbituratos sintetizados, na determinação da capacidade inibitória da atividade da enzima XO, capacidade antioxidante, anti-bacteriana e a atividade anti-proliferativa em fibroblastos normais da derme humana (NHDF - do inglês Normal Human Dermal Fibroblast) e em células epiteliais humanas do cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7 - do inglês Michigan Cancer Foundation-7, human breast adenocarcinoma cell line).
- Sempre que possível e adequado complementar os ensaios biológicos por estudos *in silico*.

3. Resultados e Discussão

3.1. Síntese

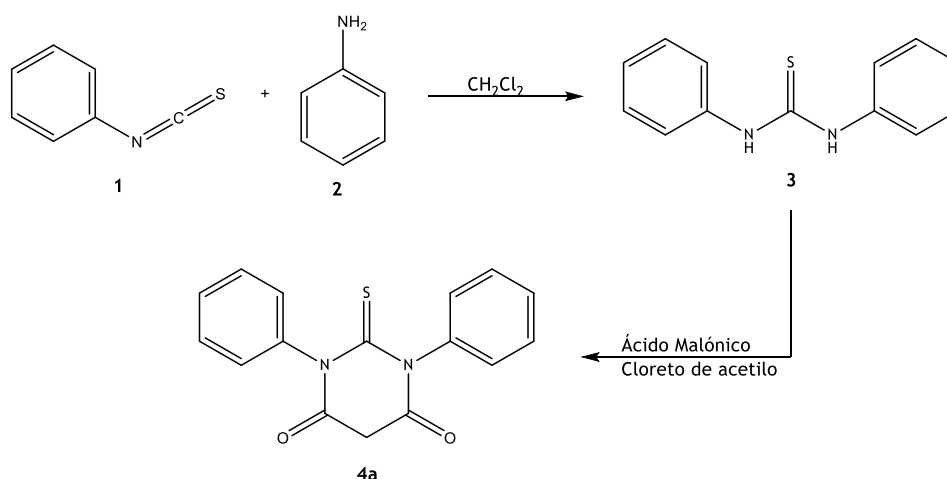
Nesta secção são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na preparação e na tentativa de preparação de derivados pirimidínicos, sintetizados a partir de ácidos (tio)barbitúricos.

Os resultados aqui discutidos são apresentados respeitando a ordem cronológica em que foram realizados, fazendo-se uma breve referência sobre a pertinência das sínteses ou tentativas de sínteses escolhidas, de maneira a clarificar sobre a evolução dos estudos realizados ao longo desta dissertação.

Para facilitar a análise dos resultados aqui discutidos, foram realizados auxiliares de estruturas, os quais poderão ser consultados nos anexos 1 e 2.

3.1.1. Ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a)

A síntese do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a) teve como objetivo a sua utilização como precursor na síntese de 5-acilpirimidinas. A obtenção da tioureia (3) a partir da anilina (2) e do isotiocianato (1) realizou-se de acordo com o método descrito por Lu *et al.*¹¹¹ (esquema 3.1). A escolha deste método deveu-se ao facto de se conseguir fazer o isolamento de uma forma fácil e rápida, uma vez que o produto precipita ao longo da sua formação, obtendo-se um elevado grau de pureza e rendimento (95% - tabela 1).



Esquema 3.1 - Síntese do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a).

Depois de isolada, a 1,3-difeniltioureia (3) foi submetida a uma ciclização com o ácido malónico em cloreto de acetilo, de acordo com o método descrito por Henda Schulte.¹¹² Mesmo sendo

necessária uma posterior recristalização em ácido acético, este método permite a obtenção do ácido 1,3-difenilbarbitúrico (**4a**) com um elevado rendimento (95% - tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão e rendimento para a 1,3-difeniltioureia (**3**) e ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**).

Composto	FTIR (bandas características)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	Rendimento (%)
3	3202 (N-H), 1598 (C=C)	142-144	140-142 ¹¹³	95
4a	1727 e 1707 (C=O), 1594 (C=C)	252-253	258-259 ¹¹²	95

Os pontos de fusão dos compostos obtidos encontram-se de acordo com a literatura, apresentando pequenos intervalos de fusão, indicando um elevado grau de pureza (tabela 3.1).

Os espectros de FTIR da 1,3-difeniltioureia (**3**) e do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**) apresentam as bandas esperadas (tabela 3.1). Para o **4a**, é de destacar o desaparecimento da banda característica das vibrações da ligação N-H a 3202 cm⁻¹ e o aparecimento das bandas a 1727 e 1707 cm⁻¹, características das vibrações dos grupos carbonilo.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C (tabela 3.2 e 3.3) comprovam a formação do produto **4a**, verificando-se a ausência do sinal relativo ao próton amino da tioureia **3** a 9,79 ppm, a presença dos sinais do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**) relativos aos carbonilos a 163,32 ppm e ainda os sinais correspondentes ao metileno a 4,10 e 41,23 ppm nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente. Os sinais observados estão de acordo com os sinais descritos na literatura.¹¹³

Tabela 3.2 - RMN de ¹H da 1,3-difeniltioureia (**3**) e do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**).

Compostos	1 e 3 <u>NH</u> J em Hz	2' e 6' - <u>ArCH</u> J em Hz	3' e 5' - <u>ArCH</u> J em Hz	4' - <u>ArCH</u> J em Hz	5 - <u>CH</u> ₂ J em Hz
3	9,79 (s, 2H)	7,48 (d, 4H, J = 7,4 Hz)	7,33 (t, 4H, J = 8,2, 7,6 Hz)	7,12 (t, 2H, J = 7,4 Hz)	-
4a	a)	7,21 (d, 4H, J = 7,3 Hz)	7,55 - 7,41 (m, 6H)	4,10 (s, 2H)	

a) Não aplicável

Tabela 3.3 - RMN de ¹³C da 1,3-difeniltioureia (**3**) e do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**).

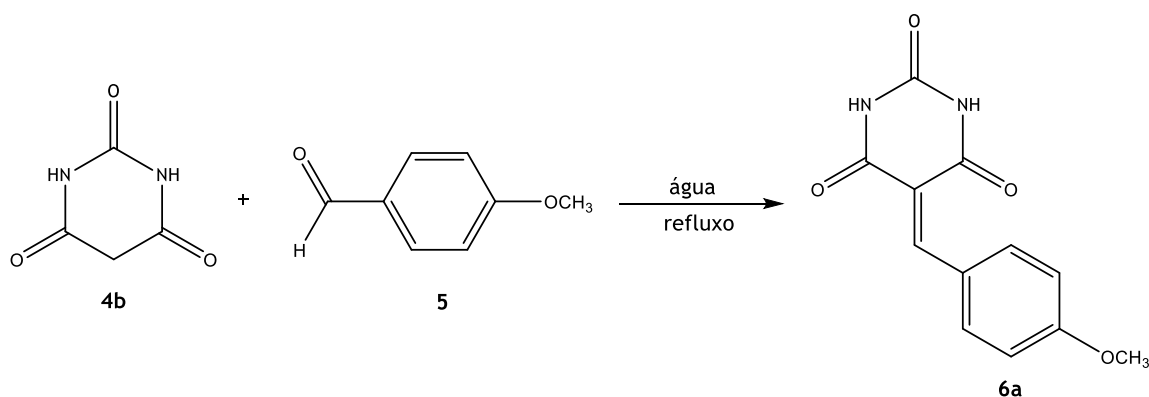
Composto	2- <u>C</u> S	4, 6- <u>C</u> O	1'- <u>ArC</u>	2', 3', 5' e 6'- <u>ArCH</u>	4'- <u>ArCH</u>	5- <u>CH</u> ₂
3	179,63	a)	139,46	128,45 e 123,66	124,44	a)
4a	181,64	163,32	138,75	129,68 e 128,64	129,20	41,23

a) Não aplicável

3.1.2. 5-(4-Metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a) e 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b)

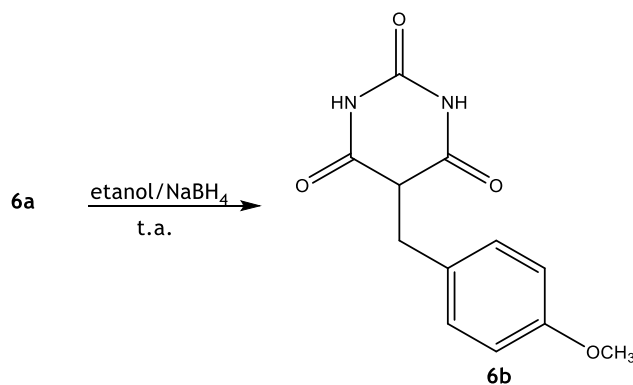
A síntese de 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a) teve como objetivo a utilização, como precursor, na tentativa de síntese de isoxazolopirimidinas e pirazolopirimidinas.

A obtenção de 6a envolveu uma reação do tipo Knoevenagel que, neste caso, consiste na adição do benzaldeído 5 ao grupo metileno ativo do ácido barbitúrico (4b). Esta síntese foi realizada com adaptação ao método descrito por Deb *et al.*⁹⁸ (esquema 3.2), aumentando-se a temperatura reacional para a temperatura de refluxo. A escolha deste método prendeu-se com o facto de representar um procedimento experimental simples, rápido e com obtenção de elevado rendimento (92% - tabela 3.1).



Esquema 3.2 - Síntese da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a).

A síntese da 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b) teve como objetivo o estudo da relação estrutura-atividade em comparação com a 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a) nas atividades biológicas estudadas durante esta dissertação. Esta síntese foi realizada de acordo com o método descrito por Cao *et al* (esquema 3.3).¹¹⁴



Esquema 3.3 - Síntese da 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b).

Os espectros de FTIR de **6a** e **6b** apresentam as bandas características esperadas (tabela 3.4). É de destacar apenas o aparecimento da banda característica das vibrações N-H a 3224 cm⁻¹ para a 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (**6b**). Isto pode ser explicado pela ausência de conjugação do anel em **6b**, quando comparado com **6a**, em que se verifica o desaparecimento dessa mesma banda.

Tabela 3.4 - Bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão e rendimento da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (**6a**) e 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (**6b**).

Composto	FTIR (bandas características)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	Rendimento (%)
6a	3046 (C-H), 2838 (C-H), 1745 (C=O), 1698 (C=O), 1651 (C=O), 1266 (C-O), 1179 (C-O)	286-289	297-300 ¹¹⁵	92
6b	3224 (N-H), 2966 (C-H), 2929 (C-H), 2835 (C-H), 1743 (C=O), 1669 (C=O), 1249 (C-O), 1175 (C-O)	194-195	205-210 ¹¹⁶	41

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C apresentam todos os sinais esperados (tabelas 3.5 e 3.6). De destacar apenas a simetria existente nos prótons do NH do anel de piridina no espectro de RMN de ¹H e nos grupos carbonilo no espectro de RMN de ¹³C para **6b**. À semelhança dos espectros de FTIR, esta alteração nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C pode ser explicada pela perda de conjugação em **6b** em comparação com **6a**.

Tabela 3.5 - RMN de ¹H da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (**6a**) e 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (**6b**).

Composto	NH J em Hz	2' e 6' -ArCH J em Hz	3' e 5' - ArCH J em Hz	5 -CCH J em Hz	CH ₃ J em Hz	5 -CCH ₂ J em Hz
6a	11,29 (s, 1H) 11,16 (s, 1H)	8,37 (d, 2H, J = 9,1 Hz)	7,06 (d, 2H, J = 9,0 Hz)	8,25 (s, 1H)	3,34 (s, 3H)	a)
6b	11,15 (s, 2H)	6,99 (d, 2H, J = 8.3 Hz)	6,82 (d, 2H, J = 8.5 Hz)	3,82 (t, 1H, J = 4,8 Hz)	3,70 (s, 3H)	3,19 (d, 2H, J = 4,8 Hz)

a) Não aplicável

Tabela 3.6 - RMN de ¹³C da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (**6a**) e 5-(4-metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (**6b**).

Composto	C=O	4' - ArC=OCH ₃	5 -CCH	ArCH	1' -ArC	5-CCH	OCH ₃	5 -CCH ₂
6a	163,91 163,44 150,20	162,18	154,94	137,48 113,95	125,17	115,56	55,70	a)
6b	170,04 150,55	158,05	a)	128,93 113,71	130,03	a)	54,94	32,83

a) Não aplicável

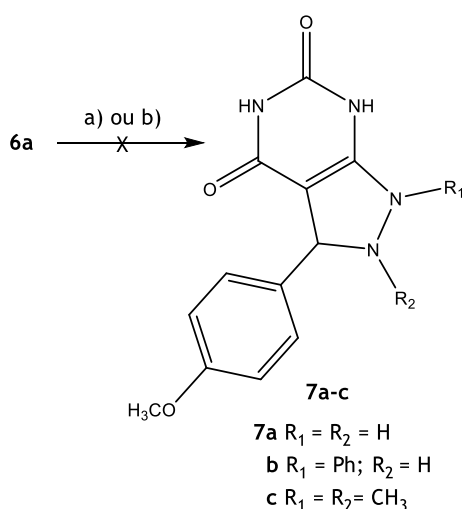
3.1.3. Pirazolopirimidinas 7a-c e isoxazolopirimidina 7d

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos nas várias tentativas de síntese com vista na obtenção de isoxazolopirimidinas e pirazolopirimidinas derivadas de ácidos barbitúricos.

Neste contexto, foi desenvolvida uma série de compostos com núcleo isoxazolopirimidina e pirazolopirimidina derivadas de 5-benzilidenopirimidinas por Thokchom *et al.*¹⁰⁹. Estas pirazolopirimidinas são descritas como análogas das purinas, uma vez que apresentam características estruturais semelhantes a estas.¹⁰⁹ Neste contexto, de maneira atingir o objetivo desta dissertação, tentaram-se desenvolver compostos com núcleos semelhantes, de acordo com o método referido anteriormente.

Assim, como já referido iniciou-se o trabalho com a síntese da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (**6a**) que, ao reagir com uma hidrazina deveria sofrer uma adição de Michel no grupo metilideno com ciclização por ataque nucleofílico ao carbonilo vicinal para a formação do anel de pirazole. No entanto, e ao contrário do descrito,¹⁰⁹ neste trabalho de dissertação não se observou a referida ciclização.

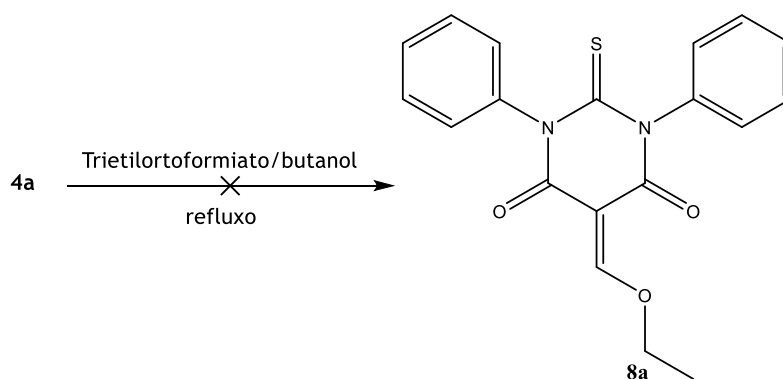
No esquema 3.4 são apresentadas duas abordagens diferentes para a formação da respetiva pirazolopirimidina. Na primeira abordagem, fez-se reagir a hidrazina correspondente com **6a** na presença de etanol e ácido acético, enquanto que na segunda abordagem, como consequência do insucesso da primeira, introduziu-se triflato de bismuto e trocou-se o solvente reacional de etanol para isopropanol. A mudança de solvente permitia aumentar a temperatura reacional de 78 °C para 83 °C, enquanto que o uso de triflato de bismuto, na qualidade de ácido de Lewis, esperava-se que a sua utilização ativasse o grupo carbonilo, funcionando desta forma como catalisador na reação. No entanto, analogamente à abordagem anterior, também esta não se revelou bem sucedida.



Esquema 3.4 - Tentativa de síntese das pirazolopirimidinas **7a-c**, a partir da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (**6a**). Condições reacionais: a) hidrato de hidrazina ou fenil-hidrazina/ácido

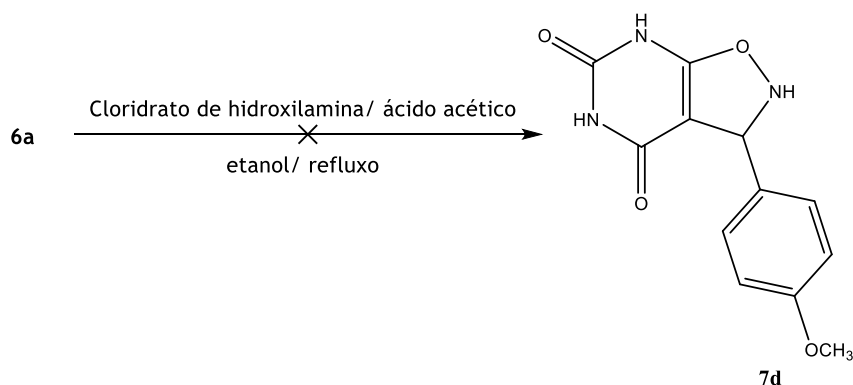
acético/etanol/refluxo; b) hidrato de hidrazina ou *N,N'*-dimetil-hidrazina dicloridrato/ácido acético/isopropanol/refluxo.

No esquema 3.5 é apresentada a tentativa de síntese da 5-(etoximetileno)-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (**8a**), através de uma reação do tipo Knoevenagel, com a adição do trietilortoformiato ao ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**). O produto obtido (**8a**) na presença de hidrato de hidrazina, etanol e ácido acético iria sofrer de ciclocondensação, formando a pirazolopirimidina correspondente, como descrito por Thokchom *et al.*¹⁰⁹ No entanto não se conseguiu obter o produto **8a**.



Esquema 3.5 - Tentativa de síntese de 5-(etoximetileno)-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (**8a**).

Depois do insucesso das sínteses referidas anteriormente, tentou-se obter um anel de isoxazole (esquema 3.6) através da reação de condensação entre **6a** e cloridrato de hidroxilamina na presença de etanol e ácido acético, que não se revelou uma vez mais bem sucedida.

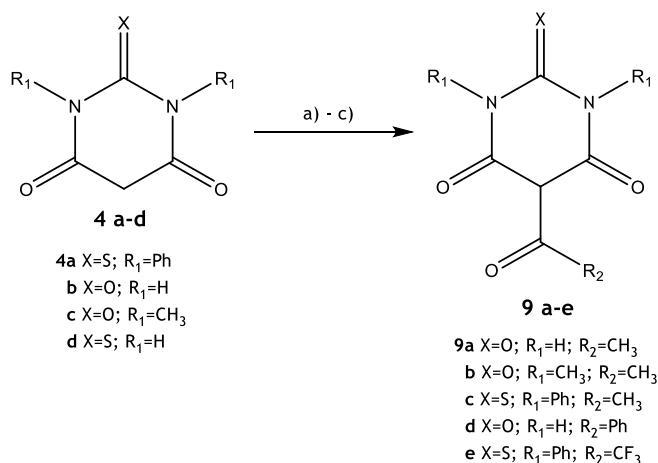


Esquema 3.6 - Tentativa de síntese da isoxazolopirimidina **7d** a partir da 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6- triona (**3a**).

3.1.4. 5-Acilpirimidinas 9a-e

Nesta secção são apresentados e discutidos os resultados obtidos na síntese e na tentativa de síntese de 5-acilpirimidinas, também equacionadas como precursores na síntese de hidrazinilpirimidinas.

Para a obtenção de 5-acilpirimidinas **9a-e** (esquema 3.7) utilizou-se anidrido acético (para as acil-pirimidinas **9a-c**) e trifluoroacético (para a acilpirimidina **9e**) para introduzir o substituinte acilo na posição 5 dos ácidos (tio)barbitúricos, de acordo com os métodos descritos por *Jursic et al.*¹⁰⁵ e *Faidallah et al.*¹¹⁰, respetivamente. Para a obtenção da 5-acilpirimidina **9d** utilizou-se o método descrito por *Neuman et al.*¹⁰⁴ A escolha destes métodos deveu-se ao facto de serem rápidos e fáceis, permitindo a obtenção do produto com elevado grau de pureza e rendimentos de moderados a bons (37-83%). Através da análise da tabela 3.7, verifica-se que os grupos R_1 parecem ter alguma influência no rendimento da reação, uma vez que o hidrogénio favorece o aumento do rendimento quando comparado com o grupo metilo. Os grupos R_2 também parecem exercer alguma influência, sendo que o grupo metilo permite melhor rendimento quando comparado com o grupo fenilo. Em relação ao grupo calcogénio não se consegue obter informação sobre a influência que este exerce no rendimento da reação. Na mesma tabela são também apresentadas as bandas características de FTIR e pontos de fusão e rendimentos das 5-acilpirimidinas **9a-e**.



Esquema 3.7 - Síntese das 5-acilpirimidinas **9a-e** a partir de ácidos (tio)barbitúricos. Condições reacionais: a) anidrido acético/ácido sulfúrico; b) anidrido trifluoroacético/THF; c) anidrido benzoico/piridina.

Tabela 3.7 - Bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão e rendimento das 5-acilpirimidinas **9a-e**.

Composto	X	R ₁	R ₂	FTIR (bandas características)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	Rendimento (%)
9a	O	H	CH ₃	3280 (N-H), 3202 (N-H), 1779 (C=O), 1732 (C=O)	305-307	296-300 ¹¹⁷	83
9b	O	CH ₃	CH ₃	1721 (C=O), 1656 (C=O)	91-92	97-99 ¹¹⁸	45
9c	S	Ph	CH ₃	1701 (C=O), 1635 (C=O)	256-257	258-259 ¹¹²	65
9d	O	H	Ph	3296 (N-H), 1774 (C=O), 1745 (C=O), 1704 (C=O), 1629 (C=O)	276-277	275	75
9e	S	H	CF ₃	1679 (C=O), 1642 (C=O), 1155 (CF ₃)	240-241	a)	37

a) Não reportado

Da análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C (tabelas 3.8 e 3.9) pode-se observar que, apesar de se encontrarem os sinais esperados teoricamente, existem algumas exceções, nomeadamente no que diz respeito aos espectros de RMN de ¹³C. Assim nos espectros observa-se que, à exceção da 5-acilpirimidina **9e**, todos os outros apresentam um único desvio químico referente aos carbonilos do anel de pirimidina, no entanto, a fórmula molecular da 5-acilpirimidina **9b** foi confirmada por espectrometria de massa.

É ainda de salientar que a ausência do sinal correspondente ao hidrogénio do carbono 5 do anel de pirimidina nas 5-acilpirimidinas **9a**, **9b** e **9d** está de acordo com a literatura.^{105,119,104} A 5-acilpirimidina **9c**, apesar de se encontrar descrita pela literatura, não se encontra caracterizada espectroscopicamente. Para a 5-acilpirimidina **9e** não foi possível fazer comparação com a literatura, uma vez que não se encontra descrita.

Tabela 3.8 - RMN de ¹H das 5-acilpirimidinas **9a-e**.

Composto	NH J em Hz	ArCH J em Hz	5-CH J em Hz	CH ₃ J em Hz
9a	11,78 (s, 1H), 11,04 (s, 1H)	a)	b)	2,58 (s, 3H)
9b	a)	a)	b)	3,18 (s, 6H) 2,63 (s, 3H)
9c	a)	7,48 (t, 4H, J = 7,4 Hz), 7,39 (t, 2H, J = 7,7 Hz), 7,30 (d, 4H, J = 7,7 Hz)	b)	2,66 (s, 3H)
9d	11,48 (s, 2H)	7,61 - 7,50 (m, 3H), 7,44 (t, 2H, J = 7,6 Hz)	b)	a)
9e	12,18 (s, 2H)	a)	4,90 (s, 1H)	a)

a) Não aplicável

b) Não observado

Tabela 3.9 - RMN de ^{13}C das 5-acilpirimidinas **9a-e**.

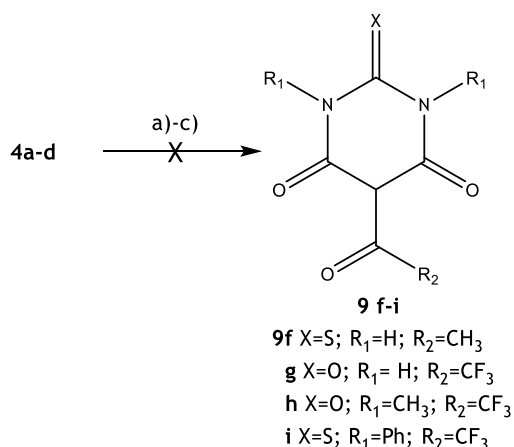
Composto	5-C=O	2-C	4,6-C=O	5-CH	CH ₃	5-CCC	ArC	ArCH
9a	195,35	149,52	b)	95,89	a)	24,29	a)	a)
9b	194,96	150,45	b)	96,38	28,06	24,54	a)	a)
9c	196,90	179,97	b)	98,72	a)	25,06	139,68	129,54 129,32 128,79
9d	190,55	149,75	b)	95,56	a)	a)	135,57	131,95 129,03 127,93
9e	181,28	175,51	166,45 162,49	31,16	a)	82,41	a)	a)

a) Não aplicável

b) Não observado

Tentativas de síntese das 5-acilpirimidinas **9f-i**

Para a obtenção das 5-acilpirimidinas **9f-i** (esquema 3.8), e à semelhança dos derivados acima descritos, utilizou-se anidrido acético (para **9f**) e trifluoroacético (para **9g-i**) para introduzir o substituinte acilo na posição 5 dos ácidos (tio)barbitúricos, de acordo com os métodos anteriormente referidos.



Esquema 3.8 - Tentativa de síntese das 5-acilpirimidinas **9f-i**. Condições reacionais: a) anidrido acético/ácido sulfúrico; b) anidrido trifluoroacético/THF; c) piridina/anidrido trifluoroacético/THF.

Apesar de reportado por *Jursic et al.*,¹⁰⁵ a formação da 5-acetil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (**9f**) a partir do ácido tiobarbitúrico não se verificou. Através de análise por cromatografia em camada fina (ccf) verificou-se a formação de uma mistura complexa, na qual não foi possível identificar o composto pretendido.

Para a obtenção das 5-acilpirimidinas **9g-i** foi utilizado o mesmo método de síntese da 5-acilpirimidina **9e**, embora igualmente sem sucesso. Da análise do espectro de RMN de ^1H dos compostos **9g** e **9h**, verifica-se que a introdução do substituinte trifluoroacetilo na posição 5 do ácido barbitúrico (para o composto **9g**) e 1,3-dimetilbarbiturico (para o composto **9h**) não

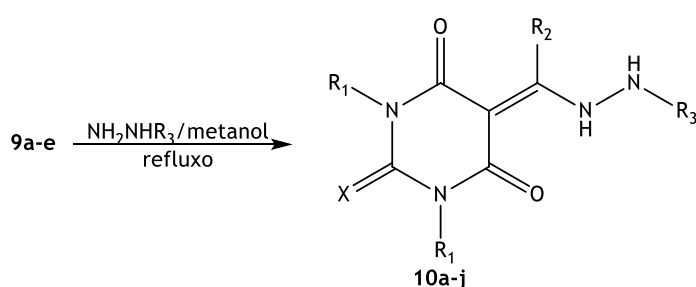
ocorreu, uma vez que os espectros de RMN de ^1H correspondem aos respectivos materiais de partida. Para a 5-acilpirimidina **9i** observou-se, através de análise por ccf, a formação de uma mistura complexa, que se mostrou inconclusiva.

Comprovando-se o insucesso das reações anteriores, planeou-se o uso de piridina (condições reacionais c - esquema 3.8) para a síntese da 5-acilpirimidina **9g**, a partir do ácido barbitúrico. A piridina, sendo uma base, iria retirar o protão ácido do grupo metileno do ácido barbitúrico, facilitando assim o ataque ao anidrido trifluoroacético, no entanto, esta alternativa não se mostrou igualmente bem sucedida.

3.1.5. Hidrazinilpirimidinas 10a-j

Nesta secção são apresentados e discutidos os resultados obtidos na síntese e na tentativa de síntese de hidrazinilpirimidinas derivadas de 5-acilpirimidinas.

A obtenção de hidrazinilpirimidinas envolve uma reação de condensação direta entre as correspondentes 5-acilpirimidinas **9a-e** e as diferentes hidrazinas (esquema 3.9). Esta síntese realizou-se de acordo com o método descrito por Jursic *et al.*¹⁰⁵



- 10a** X=O; R₁=H; R₂=CH₃; R₃=4-NO₂C₆H₄
- b** X=O; R₁=CH₃; R₂=CH₃; R₃=4-NO₂C₆H₄
- c** X=S; R₁=Ph; R₂=CH₃; R₃=4-NO₂C₆H₄
- d** X=O; R₁=H; R₂=CH₃; R₃=2,4-NO₂C₆H₃
- e** X=O; R₁=CH₃; R₂=CH₃; R₃=2,4-NO₂C₆H₃
- f** X=O; R₁=H; R₂=CH₃; R₃=C₆H₅
- g** X=O; R₁=CH₃; R₂=CH₃; R₃=C₆H₅
- h** X=S; R₁=Ph; R₂=CH₃; R₃=C₆H₅
- i** X=O; R₁=H; R₂=CH₃; R₃=H
- j** X=S; R₁=Ph; R₂=CH₃; R₃=H

Esquema 3.9 - Síntese das hidrazinilpirimidinas **10a-j**.

Assim como os processos anteriores, este método permite isolar o produto pretendido de uma forma rápida e fácil. De uma maneira geral, os produtos foram obtidos com bons rendimentos de bons a excelentes (50-92%), verificando-se que os grupos R₁ têm influência no rendimento da reação, uma vez que os derivados substituídos em R₁ por hidrogénios apresentam rendimentos superiores, quando comparados com os seus análogos metilados. Em relação ao

grupo calcogênio, não é possível inferir sobre a sua importância no rendimento da reação, uma vez que os derivados sintetizados com diferentes grupos calcogênicos apresentam também diferentes substituintes, o que torna inconclusiva qualquer comparação direta.

Para nenhum dos derivados sintetizados **10a-j** se encontram descritos na literatura os respectivos pontos de fusão, sendo novas apenas as hidrazinilpirimidinas **10c** e **10f-j**. Com exceção de **10d** e **10i**, todas as restantes hidrazinilpirimidinas apresentam pequenos intervalos de fusão, o que pode indicar um elevado grau de pureza.

Tabela 3.10 - Bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão e rendimento das hidrazinilpirimidinas **10a-j**.

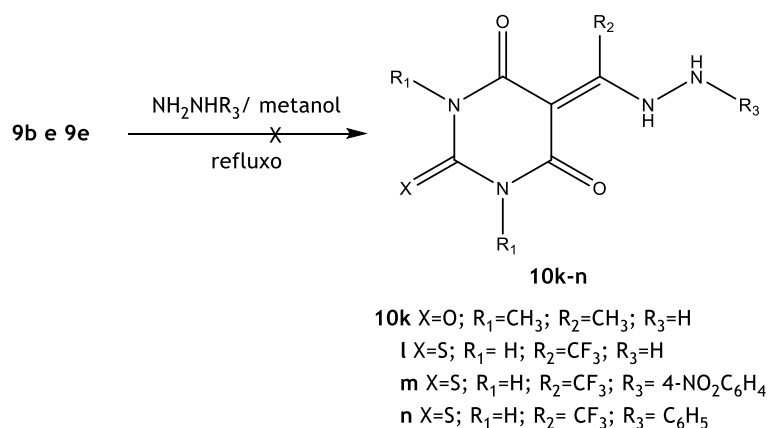
Composto	X	R ₁	R ₂	R ₃	FTIR (bandas características)	Ponto de fusão (°C)	Rendimento (%)
10a	O	H	CH ₃	4-NO ₂ C ₆ H ₄	3282 (N-H), 3207 (N-H), 1715 (C=O), 1625 (C=O), 1335 (NO ₂), 1112 (C-NO ₂)	324-326	71
10b	O	CH ₃	CH ₃	4-NO ₂ C ₆ H ₄	3327 (N-H), 3254 (N-H), 1706 (C=O), 1321 (NO ₂), 1104 (C-NO ₂)	228-232	67
10c	S	Ph	CH ₃	4-NO ₂ C ₆ H ₄	3193 (N-H), 1631 (C=O), 1318 (NO ₂), 1112 (C-NO ₂)	285-288	81
10d	O	H	CH ₃	2,4-NO ₂ C ₆ H ₄	3325 (NH), 3323, 1710 (C=O), 1682 (C=O), 1634 (C=O), 1506 (NO ₂), 1335 (NO ₂), 1313 (NO ₂), 1144 (NO ₂) e 1128 (NO ₂)	Dec. 342	87
10e	O	CH ₃	CH ₃	2,4-NO ₂ C ₆ H ₄	3362 (NH), 1705 (C=O), 1650 (C=O), 1615 (C=O), 1539 (NO ₂), 1509 (NO ₂), 1333 (NO ₂), 1315 (NO ₂), 1157 (NO ₂), 1143 (NO ₂)	245 - 247	83
10f	O	H	CH ₃	C ₆ H ₅	3267 (N-H), 3173 (N-H), 1712 (C=O), 1662 (C=O), 1628 (C=O)	307-310	92
10g	O	CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅	3250 (N-H), 1704 (C=O), 1672 (C=O)	182-184	50
10h	S	Ph	CH ₃	C ₆ H ₅	3243 (N-H), 1651 (C=O), 1620 (C=O)	234-236	72
10i	O	H	CH ₃	H	3344 (NH ₂), 3246 (NH ₂), 1639 (C=O), 1647 (C=O)	Dec. 300	86
10j	S	Ph	CH ₃	H	3331 (NH ₂), 3246 (NH ₂), 1662 (C=O)	242-243	88

Os espectros de RMN de ¹³C e ¹H apresentam os sinais esperados (tabela 3.11 e 3.12). Contudo, no espectro de RMN de ¹³C, é de salientar a ausência dos sinais respectivos aos grupos carbonilos da posição 4 e 6 nas hidrazinilpirimidinas **10a-g**, à semelhança do que se verificou para os seus precursores, descritos na subsecção 3.1.4. Contudo, a fórmula molecular das hidrazinilpirimidinas **10b** e **10i** foi confirmada por espectrometria de massa. De destacar ainda, que os substituintes do anel pirimidínico não têm grande influência nos desvios químicos dos sinais espectroscópicos, o que não acontece para os substituintes em R₃ que, quando alterados,

originam alterações significativas nos mesmos sinais. Isto pode ser verificado por comparação dos sinais das hidrazinilpirimidinas **10a-c** com **10d-j** e estes últimos entre si, nos espectros de RMN de ^{13}C .

Tentativa de síntese das hidrazinilpirimidinas **10k-n**

Para a obtenção das hidrazinilpirimidinas **10k-n** (esquema 3.10) utilizou-se o método de síntese referido na síntese das hidrazinilpirimidinas **10a-j**. No entanto para estes compostos o método escolhido não teve o sucesso desejada. Na análise por ccf, verifica-se a formação de vários produtos, sendo difícil identificar o produto de interesse. Ao contrário destas, a hidrazinilpirimidina **10k** parece nunca se ter formado, uma vez que não se observa um avanço reacional através de análise por ccf.



Esquema 3.10 - Tentativa de síntese das hidrazinilpirimidinas **10k-n**.

Tabela 3.11 - RMN de ¹H das hidrazinilpirimidinas 10a-j.

Composto	1 e 3-NH	5-CCNH	5-CCCH ₃	1'-ArCNH	2'-ArCH	6'-ArCH	4'-ArCH	3'-ArCH	5'-ArCH	Outros Sinais
10a	10,80 (s, 1H) 10,66 (s, 1H)	13,24 (s, 1H)	2,66 (s, 3H)	9,67 (s, 1H)	6,85 (d, 2H, J= 9,1Hz)		a)	8,14 (d, 2H, J= 9,2 Hz)		a)
10b	a)	13,29 (s, 1H)	2,66 (s, 3H)	9,76 (s, 1H)	6,85 (d, 2H, J= 9,8 Hz)		a)	8,16 (d, 2H, J=9,8 Hz)		3,19 (s, 6H, CH ₃)
10c	a)	13,18 (s, 1H)	2,66 (s, 3H)	9,86 (s, 1H)	6,86 (d, 2H, J= 9,2 Hz)		a)	8,15 (d, 2H, J=9,8 Hz)		7,44 (t, 4H, J= 7,8 Hz 3'' e 5'') 7,35 (t, 2H, J= 7,5 Hz 4'') 7,27 (d, 4H, J= 7,2 Hz 2'' e 6'')
10d	10,95 (s, 1H) 10,67 (s, 1H)	13,22 (s, 2H)	2,62 (s, 3H)	10,57 (s, 1H)	a)	7,20 (d, 1H, J= 9,5 Hz)	a)	8,89 (d, 1H, J= 2,6 Hz)	8,38 (dd, 1H, J= 9,5, 2,6 Hz)	a)
10e	a)	13,25 (s, 1H)	2,65 (s, 3H)	10,64 (s, 1H)	a)	7,17 (d, 1H, J= 9,5 Hz)	a)	8,89 (d, 1H, J= 2,7 Hz)	8,38 (dd, 1H, J=9,4, 2,7 Hz)	3,19 (s, 6H, CH ₃)
10f	10,65 (s, 2H)	13,26 (s, 1H)	2,67 (s, 3H)	8,54 (s, 1H)	6,76 (d, 2H, J= 7,4 Hz)		6,89 (t, 1H, J= 7,8 Hz)	7,26 (t, 2H, J=8,0 Hz)		a)
10g	a)	13,36 (s, 1H)	2,70 (s, 3H)	8,63 (s, 1H)	6,76 (d, 2H, J= 7,4 Hz)		6,89 (t, 1H, J= 7,8 Hz)	7,27 (t, 2H, J= 7,8Hz)		3,17 (s, 6H, CH ₃)
10h	a)	13,29 (s, 1H)	2,71 (s, 3H)	8,77 (s, 1H)	6,79 (d, 2H, J= 7,7 Hz)		6,90 (t, 1H, J= 7,4 Hz)	7,43 (t, 4H, J=7,4 Hz 3'' e 5'') 7,35 (t, 2H, J=7,4 4'') 7,29-7,24 (m, 6H, 2'',6'',3' e 5')		
10i	10,34 (s, 2H)	13,29 (s, 1H)	2,61 (s, 1H)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	5,55 (s, 2H, NH ₂)
10j	a)	13,35 (s, 1H)	2,61 (s, 1H)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	7,44-7,20 (m, 12H, ArCH e NH ₂)

a) Não aplicável

Tabela 3.12 - RMN de ^{13}C das hidrazinilpirimidinas 10a-j.

Composto	2- $\underline{\text{C}}$	4 e 6- $\underline{\text{CO}}$	5- $\underline{\text{C}}$	5- $\underline{\text{CC}}$	5- $\underline{\text{CCCH}_3}$	1'- $\underline{\text{ArC}}$	2'- $\underline{\text{ArC}}$	6'- $\underline{\text{ArCH}}$	3'- $\underline{\text{ArCH}}$	5'- $\underline{\text{ArCH}}$	4'- $\underline{\text{ArC}}$	Outros Sinais
10a	150,12	b)	89,63	152,92	16,15	175,67		111,84		126,53	140,07	a)
10b	151,07	b)	89,98	152,80	16,77	175,81		111,82		126,82	140,09	28,03 (2 X $\underline{\text{CH}_3}$)
10c	179,06	b)	91,89	151,95	16,84	175,89		111,54		125,99	140,40	139,72 (1''- $\underline{\text{ArC}}$), 129,18 (2'' e 6''- $\underline{\text{ArCH}}$), 128,79 (3'' e 5''- $\underline{\text{ArCH}}$), 127,73 (4''- $\underline{\text{ArCH}}$)
10d	149,63	b)	89,98	175,82	16,08	147,09	130,89	115,46	122,89	130,42	137,79	a)
10e	150,58	b)	90,30	176,01	16,72	146,98	130,88	115,37	122,87	130,37	137,80	27,64 (2 X $\underline{\text{CH}_3}$)
10f	149,72	b)	88,20	174,87	15,69	146,59		112,75		129,39	120,66	a)
10g	150,66	b)	88,57	174,83	16,28	146,43		112,76		129,39	120,71	27,50 (2 X $\underline{\text{CH}_3}$)
10h	179,00	162,39	91,12	174,86	16,82	145,90		112,98		129,45	121,00	140,50 (1''- $\underline{\text{ArC}}$), 129,23 (2'' e 6''- $\underline{\text{ArCH}}$), 128,83 (3'' e 6''- $\underline{\text{ArCH}}$), 127,73 (4''- $\underline{\text{ArCH}}$)
10i	149,87	165,64	86,07	168,35	15,91	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
10j	178,46	162,03	89,19	166,18	15,91	a)	a)	a)	a)	a)	a)	140,66 (1'' $\underline{\text{ArC}}$), 129,22 (2'' e 6''- $\underline{\text{ArCH}}$), 128,63 (3'' e 5''- $\underline{\text{ArCH}}$), 127,48 (4''- $\underline{\text{ArCH}}$)

a) Não aplicável

b) Não observado

3.2. Avaliação Biológica *in vitro*

3.2.1. Determinação da atividade inibitória da xantina oxidase

A capacidade inibitória da atividade da xantina oxidase por parte da família de compostos sintetizados foi avaliada espectrofotometricamente, utilizando o alopurinol como controlo positivo e medindo os níveis de formação de ácido úrico a um comprimento de onda de 295 nm. De maneira a garantir o intervalo de concentração em que há linearidade de absorvância, foi realizada uma curva de calibração para várias concentrações de ácido úrico a 295 nm, observando-se haver linearidade pelo menos entre 1,5 e 400 μM (gráfico 3.1)

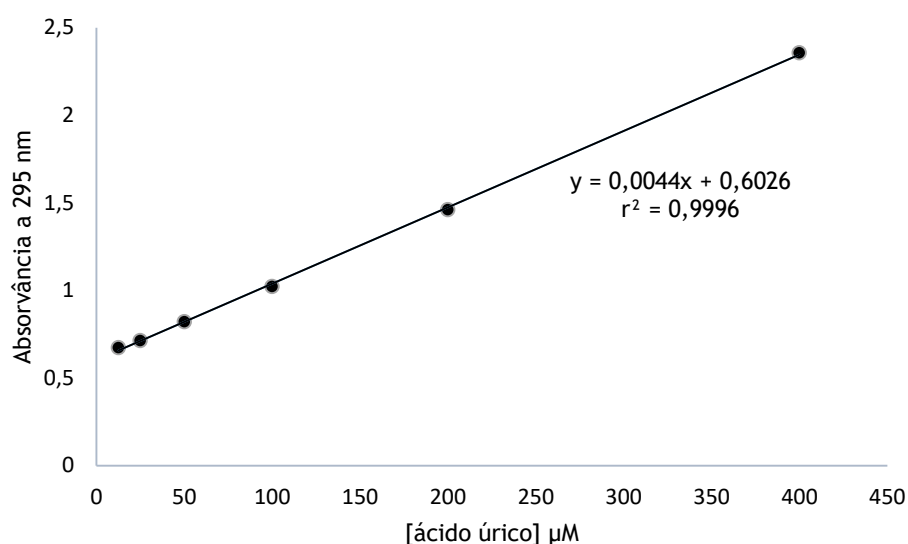


Gráfico 3.1 - Curva de calibração para o ácido úrico a 295 nm, com respetiva equação da reta e r^2 .

Para determinar genericamente o potencial inibitório da atividade enzimática por parte dos compostos em estudo foi realizado um *screening* a uma concentração de 30 μM , seguindo os métodos de Zhao *et al*¹²⁰ e Gupta *et al*⁷¹.

Após análise dos resultados obtidos (gráfico 3.2), verifica-se que as hidrazinilpirimidinas **10b** e **10g** são as que apresentam uma capacidade de inibição da atividade enzimática mais significativa, de 51 e 57 %, respetivamente, embora, inferiores ao alopurinol, utilizado como composto de referência. Para estes derivados verifica-se que substituintes dimetil na posição 1,3 do anel de pirimidina estão associados, de uma forma geral, a maior atividade. Assim como o substituinte fenilo em R_3 .

Entre as 5-benzilidenopirimidinas **6**, é notória uma menor capacidade de inibição da atividade enzimática de **6a** quando comparada com a do seu análogo **6b**, apontando para que a dupla ligação em C-5 prejudique a capacidade de inibição.

Em relação aos derivados 5-acilpirimidinas **9**, observa-se que todos apresentam percentagens inibitórias baixas, à exceção da 5-acetilpirimidina **9a**, que até parece potenciar o aumento da produção de ácido úrico. Para estes derivados verifica-se que a introdução do grupo benzoilo na posição 5 do ácido barbitúrico parece favorecer a inibição da atividade enzimática.

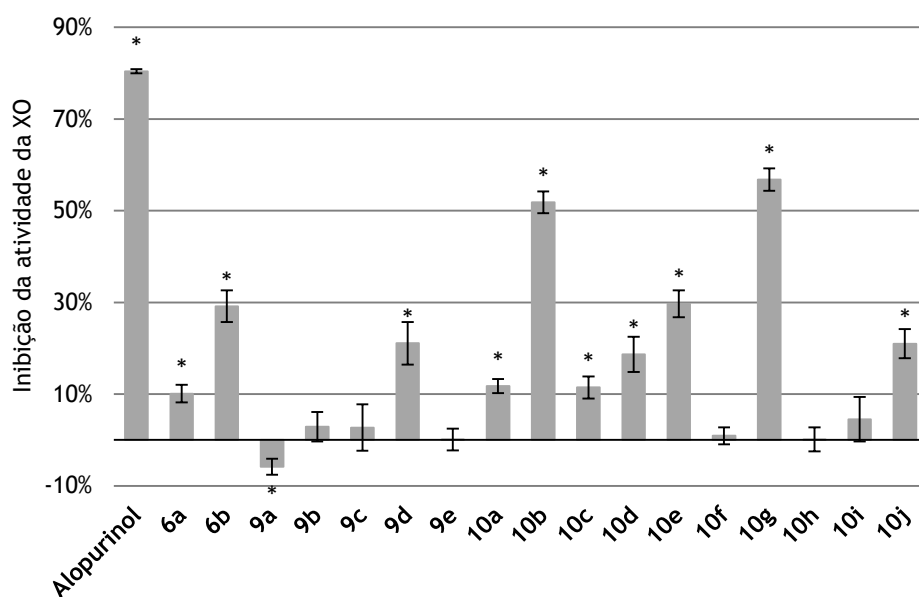


Gráfico 3.2 - Percentagem de inibição da atividade da xantina oxidase por parte dos compostos **6a**, **6b**, **9a-e**, **10a-j** e alopurinol, usado como controlo positivo, a uma concentração de 30 μM . Os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão, representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-t de *student*).

Após a análise dos dados referentes à inibição da atividade enzimática ao longo dos 10 minutos de reação (gráfico 3.3), verifica-se que as hidrazilpirimidinas **10b** e **10g** apresentam um perfil inibitório semelhante ao do alopurinol, o que não se verifica para a hidrazinilpirimidina **10e**. Assim sendo, foram efetuados estudos de concentração-resposta para o alopurinol e, para as hidrazinilpirimidinas **10b** e **10g**.

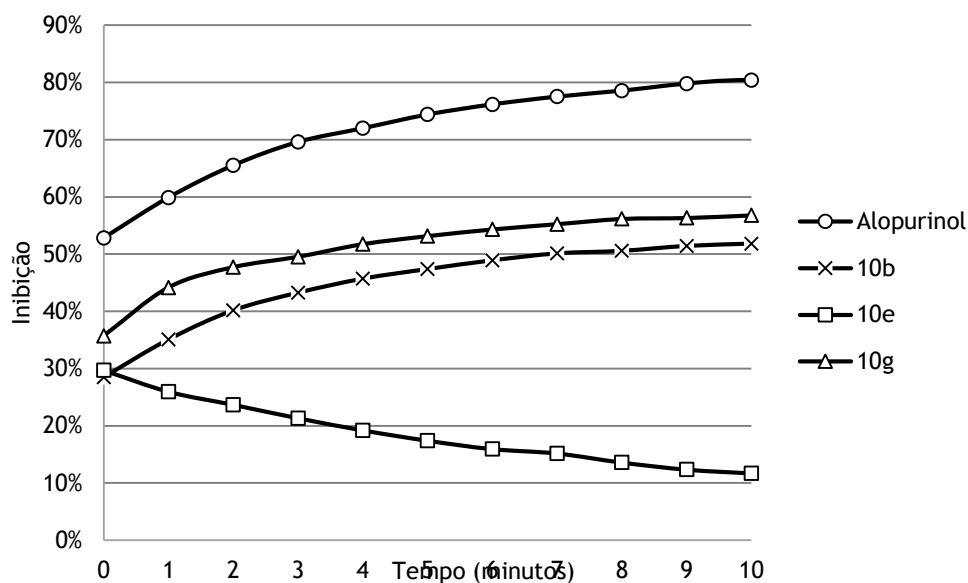


Gráfico 3.3 - Percentagem de inibição da atividade enzimática da XO em função do tempo, para os compostos **10b**, **10e**, **10g** e alopurinol a uma concentração de $30\mu\text{M}$.

Após a realização do estudo de concentração-resposta, foi possível estimar os valores de concentração inibitória para metade da atividade máxima (IC_{50} - do inglês, half maximal inhibitory concentration) para os compostos em estudo (tabela 3.13). O alopurinol apresenta um IC_{50} calculado de $2,83\ \mu\text{M}$, próximo do resultado descrito na literatura de $4,75\ \mu\text{M}$.¹²⁰ Quando comparadas com o alopurinol, as hidrazinilpirimidinas **10b** e **10g** apresentam valores de IC_{50} bem mais elevados. Desta forma devem ser feitos mais estudos, nomeadamente a realização de gráficos de Lineweaver-Burk, para uma melhor compreensão do tipo de inibição em causa assim como a cinética de reação.

Tabela 3.13 - Valores de IC_{50} estimados para a inibição da atividade da XO dos compostos alopurinol, **10b** e **10g**.

Composto	IC_{50} (μM)	r^2
Alopurinol	2,83	0,9944
10b	27,85	0,8606
10g	24,26	0,8999

3.2.2. Determinação da atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos compostos sintetizados foi avaliado através do ensaio de DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazil), um método rápido e frequentemente usado neste tipo de análise.¹²¹

O DPPH é caracterizado como sendo um radical livre relativamente estável, devendo-se esta estabilidade ao facto de possuir um eletrão desemparelhado que sofre deslocalização por toda a molécula.¹²² Na presença de um “*radical scavenger*” o DPPH (de cor violeta intensa) é convertido em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina, com perda gradual de coloração.¹²³ Com a redução do DPPH é de esperar uma coloração residual amarela pálida, característica do grupo picrilo, ainda presente na molécula reduzida. Esta alteração permite quantificar a extensão de redução do DPPH através de uma análise espectrofotométrica a um comprimento de onda de 515 ou 517nm^{124, 125}.

O ensaio de DPPH foi realizado segundo o método descrito por Zhao *et al*¹²⁰. De modo a determinar o comprimento de onda a utilizar foram feitas duas curvas de calibração, aos diferentes comprimentos de onda com várias concentrações de DPPH (tabela 3.14). Após análise dos resultados, optou-se pelo comprimento de onda de 517nm, uma vez que apresentou uma melhor correlação linear. É ainda de salientar que a concentração de DPPH escolhida para a realização do ensaio (100µM) se encontra dentro do intervalo de linearidade.

Tabela 3.14 - Curvas de calibração para o radical DPPH aos comprimentos de onda de 515 e 517 nm.

Comprimento de onda (nm)	Equação da curva	r ²
515	$y = 0,0011x + 0,5410$	0,9971
517	$y = 0,0011x + 0,5760$	0,9989

Para determinar genericamente o potencial captador de radicais dos compostos sintetizados foi realizado um *screening*, a uma concentração de 30 µM, com leitura da absorvância aos 20 e 60 minutos após o início da reação. Os compostos em estudo foram comparados com o trolox, utilizado como composto de referência.

Após análise dos resultados (gráfico 3.4) verificou-se um potencial de redução muito significativo das hidrazinilpiridinas **10a-d** e **10g-i**, em alguns casos superior ao do trolox.

É ainda de salientar que os compostos **6b**, **9e** e **10j** apresentam um potencial de redução muito baixo e que o alopurinol e 5-acilpirimidinas **9a-d** apresentam percentagens negativas. De notar ainda, que a percentagem de redução é geralmente superior aos 60 minutos.

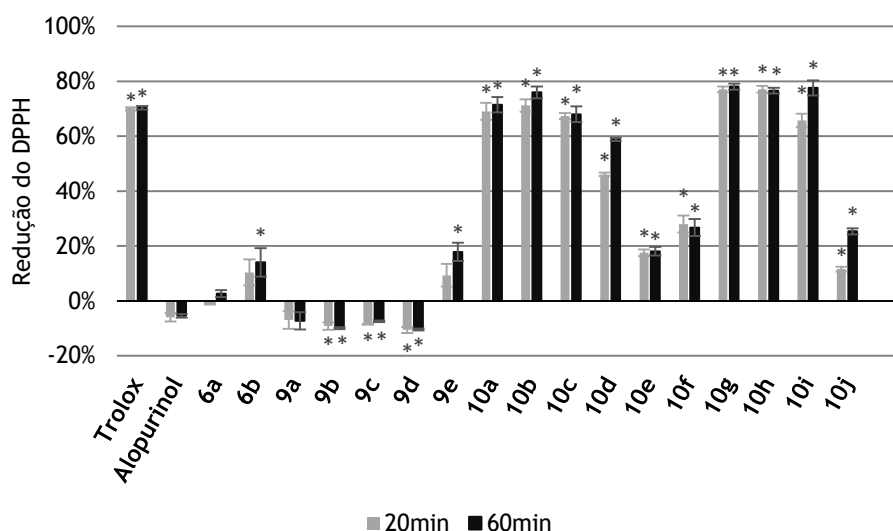


Gráfico 3.4 - Percentagem de redução do radical DPPH em relação ao controlo por parte dos compostos trolox, alopurinol, **6a-b**, **9a-e**, **10a-j** a uma concentração de 30 μ M, aos 20 e 60 minutos de exposição. Os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-t de *student*).

Após o *screening* inicial a 30 μ M, foram realizados estudos para a determinação de curvas concentração-resposta de todos os compostos que apresentavam um potencial de redução superior a 50%, com o objetivo de se estabelecer relação entre o efeito do composto e as concentrações testadas. Para este cálculo foi utilizada a extensão linear de cada curva de concentração-resposta, mostrando-se o resultado obtido para o composto de referência (34,31 μ M) semelhante ao valor descrito na literatura (37,19 μ M).¹²⁶

Com base na observação dos valores de IC₅₀ (tabela 3.15), todos os compostos mostraram um potencial de redução superior ao do trolox, o que à partida revelam ser resultados bastantes promissores.

Por fim, é de salientar que as hidrazinilpirimidinas **10b** e **10g** que têm uma capacidade anti-oxidante significativa, têm também algum potencial de inibição da atividade da XO, o que pode ser um resultado promissor tendo em conta o mecanismo de ação desta enzima e os objetivos no desenvolvimento de novos fármacos nesta área.

Tabela 3.15 - Valores de IC₅₀ para a atividade antioxidante pelo método de DPPH dos compostos trolox, 10a-d e 10g-i.

Composto	IC ₅₀	R ²
10a	24,68	0,99
10b	23,97	0,99
10c	31,68	0,99
10d	24,39	0,99
10g	20,97	0,99
10h	20,10	0,96
10i	12,72	0,96
Trolox	34,31	0,99

3.2.3. Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana não foi realizada no âmbito desta dissertação, sendo os resultados obtidos e gentilmente cedidos pela Doutora Susana Ferreira do centro de investigação em ciências da saúde.

Todos os compostos sintetizados foram testados, *in vitro*, quanto à sua atividade antibacteriana em duas bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e cinco bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* e *Acineobacter baumannii*) e comparados com a tetraciclina, o agente antibacteriano de referência (tabela 3.16).

Como se pode verificar, nenhum dos compostos exerceu uma atividade inibitória significativa contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium*, apresentando valores de MIC (MIC-do inglês Minimum Inibitory Concentration) superiores a 200 µM. O mesmo não aconteceu em relação à *Acineobacter baumannii*, observando-se que as hidrazinilpirimidinas **10a-c** e **10f-h** mostraram exercer uma atividade inibitória significativa, sendo que **10a** apresenta uma atividade inibitória (com MIC de 6,25 µM) superior à da tetraciclina. É ainda de salientar que as hidrazinilpirimidinas sintetizadas mostraram uma enorme seletividade para a *Acineobacter baumannii*, o que as torna numa gama de compostos muito promissores.

Tabela 3.16 - Atividade antibacteriana dos compostos tetraciclina, **6a-b**, **9a-e**, **10a-j** contra a) *Bacillus cereus*, b) *Staphylococcus aureus*, c) *Escherichia coli*, d) *Klebsiella pneumoniae*, e) *Pseudomonas aeruginosa*, f) *Salmonella Typhimurium*, g) *Acinetobacter baumani* (MIC, μM).

Compostos	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)
6a-b, 9a-e, 10d-e, 10i-j	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
10a	>200	>200	>200	>200	>200	>200	6,25
10b	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5
10c	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5
10f	>200	>200	>200	>200	>200	>200	25
10g	>200	>200	>200	>200	>200	>200	25
10h	>200	>200	>200	>200	>200	>200	25
Tetraciclina	0,14	2,25	4,50	9,00	36,00	9,00	9,00

3.2.4. Determinação dos efeitos na proliferação celular

A avaliação do efeito dos compostos na proliferação celular foi realizada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), após 72h de exposição aos mesmos. Este é um método colorimétrico no qual a molécula de MTT é reduzida pelas succinato desidrogenases, em células viáveis, ao seu derivado formazano. Esta redução é quantificada espectrofotometricamente a uma absorvância de 570 nm e é considerada equivalente ao número de células viáveis.^{127,128}

Os efeitos citotóxicos dos compostos sintetizados foram comparados com o controlo positivo 5-fluorouracilo (5-FU), em células NHDF e MCF-7.

Para determinar genericamente o potencial citotóxico dos compostos sintetizados foi realizado um *screening*, a uma concentração de 30 μM . Através da análise dos resultados (gráfico 3.5) pode-se concluir que existe um potencial citotóxico relevante por parte de alguns compostos sintetizados, nomeadamente da hidrazinilpirimidinas **10f-h**, que levam a uma percentagem de proliferação celular inferior à observada com o 5-FU. Estes resultados permitem concluir sobre a importância da introdução do grupo fenilo, uma vez que análogos substituídos com o grupo 4-nitrofenilo (**10a-c**), 2,4-dinitrofenilo (**10d-e**) e hidrogénio (**10i-j**) não apresentam citotoxicidade significativa.

Em relação aos derivados de 5-acilpirimidinas observa-se que todos levam a uma percentagem de proliferação celular elevada, parecendo até haver um estímulo de proliferação por parte de **9a**.

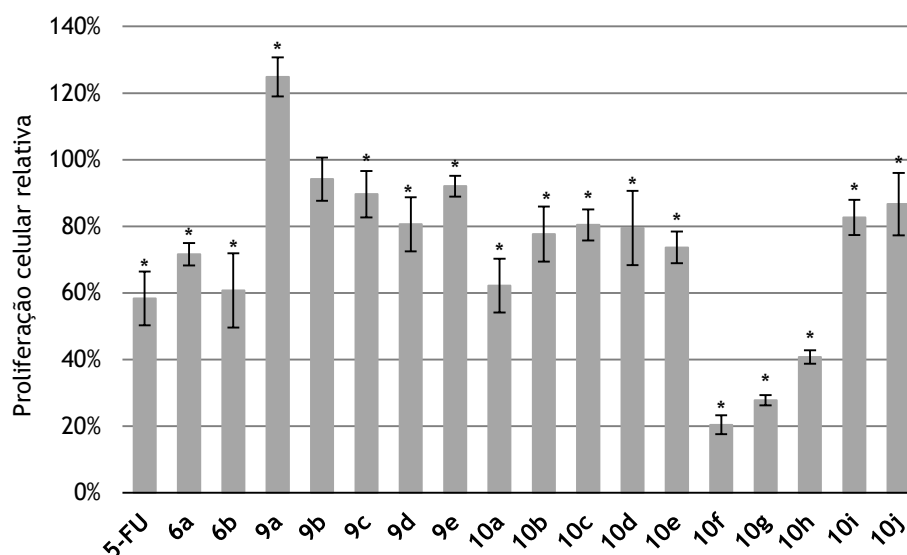


Gráfico 3.5 - Percentagem relativa de proliferação celular em células NHDF após 72 horas de exposição aos compostos 5-FU, 6a-b, 9a-e e 10a-j a uma concentração de 30 μ M. Os dados são apresentados com os respectivos desvios padrão e são representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-t de *student*).

Após o *screening* inicial, foram realizados estudos de concentração-resposta para os compostos mais citotóxicos (10a, 10f, 10g e 10h) e para o 5-FU. Neste estudo, as células foram tratadas e expostas a concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 50 e 100 μ M dos compostos selecionados, durante 72 h. Além disso os valores de IC₅₀ foram determinados por ajuste sigmoidal.

Através da análise dos resultados (tabela 3.17), verifica-se que, apesar da citotoxicidade observada no *screening* inicial, nenhuma das hidrazilpirimidinas 10a e 10f-h mostrou uma potência superior à do 5-FU, apresentando valores de IC₅₀ bastantes superiores.

Tabela 3.17 - Valores de IC₅₀ estimados para a inibição da atividade anti-proliferativa nas células NHDF dos compostos 5-FU, 10a, 10f, 10g e 10h.

Composto	IC ₅₀ (μ M)	r ²
5-FU	8,734	0,8563
10a	109,8	0,6737
10f	77,72	0,9136
10g	81,79	0,9148
10h	147,9	0,7176

Após a realização do ensaio de atividade anti-proliferativa em células NHDF, que demonstrou alguma citotoxicidade por parte de alguns compostos, determinou-se a atividade anti-proliferativa numa linha celular cancerígena. Neste contexto, todos os compostos sintetizados foram sujeitos a um *screening*, a uma concentração de 30 μ M, na linha celular MCF-7, para assim se determinar o potencial citotóxico destes compostos nesta linha celular.

Através da análise dos resultados obtidos (gráfico 3.6), verifica-se que nenhum dos compostos sintetizados apresenta uma percentagem de proliferação celular inferior à observada com o 5-FU.

As 5-acilpirimidinas **9**, em geral, não levam a alterações significativas na proliferação celular. No caso da 5-acilpirimidina **9a**, que estimula a proliferação celular na linha NHDF, observou-se uma percentagem de proliferação de cerca de 80% para a linha MCF-7.

Para as hidrazinilpirimidinas **10** verifica-se que, regra geral, os compostos conduzem a uma diminuição na proliferação celular em NHDF, apresentam também alguma citotoxicidade em MCF-7, no entanto, nunca inferior à do 5-FU. Para a hidrazinilpirimidina **10c** o mesmo não se verifica, visto que apresenta uma diminuição da proliferação significativa das células MCF-7 e uma percentagem de proliferação, em cerca de 80%, para as NHDF.

Apos a realização do *screening* inicial, e tendo em conta que a hidrazinilpirimidina **10g** leva a uma percentagem de proliferação celular de 40%, é pertinente a realização de um estudo de concentração-resposta, a realizar futuramente.

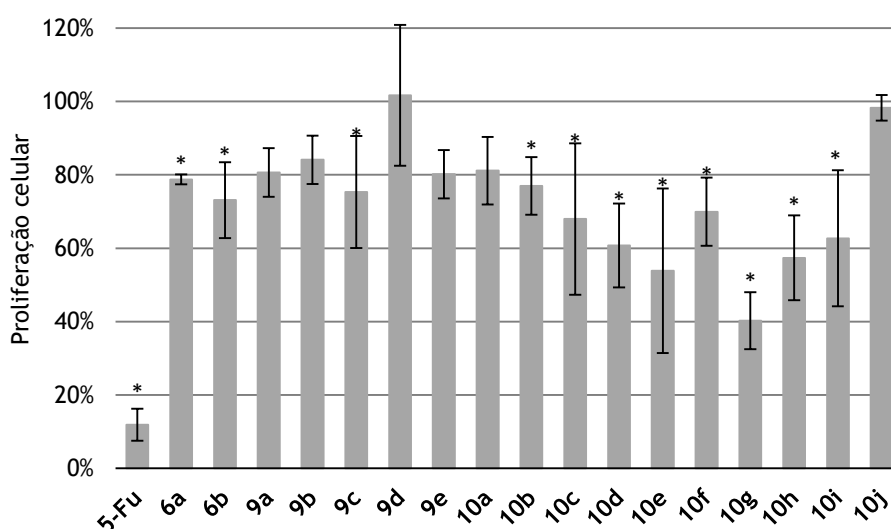


Gráfico 3.6 - Percentagem relativa de proliferação celular em células MCF-7 após 72 horas de exposição aos compostos 5-FU, **6a-b**, **9a-e** e **10a-j** a uma concentração de 30 μ M. Os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-t de *student*).

3.3. Estudos *in silico*

3.3.1. Docking molecular

Tendo como ponto de partida os resultados experimentais obtidos para a inibição da atividade da XO, foi realizado um estudo de *docking* molecular para o alopurinol e para as hidrazinilpirimidinas **10b** e **10g**, com o objetivo de obter mais informações sobre a energia e o local de ligação destas.

De maneira a efetuar a validação do método, foi realizado o *re-docking* entre o ligando original co-cristalizado (Y-700), os ligandos descritos na literatura e a XO.¹²⁹ O estudo de *re-docking* molecular de ligandos da literatura mostraram ser semelhantes ao descrito (dados não apresentados). Para o *re-docking* do ligando Y-700 com a proteína, no seu sítio ativo, foi obtido um valor de desvio da raiz quadrada média (RMSD - do inglês, root mean square deviation) de 0,7 Å, valor abaixo do padrão de 2 Å, tendo-se o método como validado.

As simulações de quantificação de energia foram realizadas entre os ligandos Y-700, alopurinol, **10b** e **10g** e encontram-se na tabela 3.18. Estes resultados não se encontram de acordo com os ensaios *in vitro* para a inibição da atividade da XO, uma vez que o alopurinol foi o que apresentou melhores resultados nos ensaios experimentais realizados. Na tentativa de compreender o resultado da inibição *in vitro* da atividade enzimática, uma vez que a energia de ligação obtida é mais favorável para **10b** e **10g**, foram estudadas as interações das hidrazinilpirimidinas **10b** e **10g**, do ligando Y-700 e do alopurinol com o sítio ativo da proteína (tabela 3.18), verificando-se que o Y-700 e o alopurinol apresentam as interações esperadas.^{130,131} De acordo com a literatura, têm-se como importantes as interações por pontes de hidrogénio entre os ligandos e os resíduos de glutamina 802 (GLU802), arginina 880 (ARG880) e tirosina 1010 (THR1010).¹³¹ Neste contexto observa-se que as hidrazinilpirimidinas **10b** e **10g** não estabelecem todas as interações acima referidas, uma vez que interagem por pontes de hidrogénios com os resíduos SER876 e GLU802. Estes dados permitem inferir que as interações entre os ligandos e o sítio ativo da proteína podem desempenhar um papel preponderante na inibição enzimática, uma vez que apesar das energias de ligação de **10b** e **10g** serem relevantes, no ensaio *in vitro* não ocorreu inibição enzimática superior à observada com o alopurinol. No entanto, os dados apresentados não são suficientes para explicar esta atividade e mais estudos teriam de ser realizados, nomeadamente a possibilidade de **10b** e **10g** sofrerem de metabolização enzimática e originarem metabolitos com capacidade de inibição da atividade enzimática.

Tabela 3.18 - Energias de ligação e interações por pontes de hidrogénio dos compostos Y-700, alopurinol, 10b e 10g no sítio ativo da XO.

Ligandos	Energia de ligação (Kcal/mol)	Resíduos presentes nas interações por pontes de hidrogénio
Y-700	-8,76	SER1008, ARG880, GLU802, ASN768
Alopurinol	-6,24	THR1010, ARG880, GLU802, ALA1079
10b	-9,7	SER876, GLU802
10g	-8,07	SER876, GLU802

3.3.2. Predição das propriedades farmacocinéticas

Tendo como ponto de partida os resultados obtidos na determinação *in vitro* da atividade inibitória da XO e da atividade antibacteriana, uma vez que mostraram ser resultados promissores, foram realizados estudos *in silico* para a predição das propriedades farmacocinéticas com o objetivo de obter um maior número de informação sobre estes compostos. Neste contexto, foram calculados os descritores das regras de Lipinski, parâmetros de Veber e propriedades ADMET para as hidrazinilpirimidinas 10a-c e 10f-h pelo *software* pkSCM *on-line*.

Através da análise da tabela 3.19 pode-se concluir que à exceção da 10c e 10h, todos os outros derivados se encontram dentro dos parâmetros definidos por Veber¹³² e Lipinski,^{133,134} o que indica que apresentam uma probabilidade mais elevada de terem absorção oral.

Tabela 3.19 - Dados computacionais para os descritores das regras de Lipinski e parâmetros de Veber, calculados através do *software* pkSCM *on-line* para 10a-c e 10f-h.

Descritor	10a	10b	10c	10f	10g	10h
Peso molecular (g/mol)	305,25	333,304	473,514	260,253	288,307	428,517
Lipofilia (Log P)	0,1513	0,8357	4,1502	0,2431	0,9275	4,242
Ligações rotáveis	4	4	6	3	3	5
Dadores de pontes de hidrogénio	7	7	7	5	5	5
Aceitadores de pontes de hidrogénio	4	2	2	4	2	2
Área superficial (Å ²)	123,233	136,383	199,964	108,580	121,730	185,311

Em relação à predição das principais propriedades ADMET (tabela 3.21), no caso da absorção, as hidrazilpirimidinas em estudo parecem demonstrar solubilidades em água idênticas entre elas, com potencial de absorção intestinal mais elevado para 10c e 10h. Em relação à permeabilidade na pele, não é verificada uma permeabilidade elevada. O facto de todas as hidrazinilpirimidinas se apresentarem como substratos da Glicoproteína-P pode ser benéfico,

uma vez que se trata de uma proteína de efluxo. No entanto, a sua capacidade de inibição da mesma por parte de 10f e 10h torna-se num ponto negativo uma vez que poderão afetar a absorção de outros fármacos.

Tabela 3.20 - Dados computacionais calculados para as propriedades ADMET com base nos modelos do software pkSCM on-line para os compostos 10a-c e 10f-h.

Propriedades	Nome do modelo	Unidades	10a	10b	10c	10f	10g	10h
Absorção	Solubilidade em água	a) (mol/L)	0,0002	0,0001	0,00005	0,0006	0,0004	0,00004
	Absorção intestinal (humana)	a) (%)	62,601	64,039	88,539	65,803	60,118	91,509
	Permeabilidade da pele	a) (log Kp)	-2,757	-2,758	-2,739	-2,751	-2,753	-2,765
	Substrato da glicoproteína-P	b)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Inibidor da glicoproteína-P I	b)	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
	Inibidor da glicoproteína-P II	b)	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
Distribuição	Permeabilidade da BHE	a) (log BHE)	-1,333	-1,335	-0,304	-1,124	-1,126	0,132
	Permeabilidade do SNC	a) (log PS)	-3,166	-2,987	-2,093	-2,956	-2,777	-1,883
Metabolismo	Substrato da CYP2D6	b)	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
	Substrato da CYP3A4	b)	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	Inibidor da CYP1A2	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
	Inibidor da CYP2C19	b)	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
	Inibidor da CYP2C9	b)	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
	Inibidor da CYP2D6	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Inibidor da CYP3A4	b)	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
Excreção	Clearance total	a) (ml/min/kg)	2,57	2,96	0,43	1,22	1,83	0,411
	Substrato da OCT2 renal	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade	Teste de AMES	b)	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
	Dose máxima tolerada (humanos)	a) (mg/kg/dia)	0,83	0,60	1,81	3,07	2,12	4,07

Toxicidade oral aguda em ratos (DL50)	a) (mol/kg)	2,606	2,65	2,331	2,315	2,399	2,687
Toxicidade oral cronica em ratos (LOAL)	a) (mg/kg/dia)	398	234	109	144	84	34
Hepatotoxicidade	b)	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
Sensibilidade na pele	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não

Em relação à distribuição, é de notar que nenhuma das hidrazinilpirimidinas apresenta elevada capacidade de travessia da BHE e de entrada no SNC. Este facto torna-se importante, uma vez que os barbituratos se encontram descritos como potentes depressores do SNC.⁸⁴

No que diz respeito ao metabolismo, todas as hidrazinilpirimidinas, à exceção da **10f**, mostraram ser substratos da CYP3A4, enquanto que **10f-h** se apresentaram como substratos da CYP2D6. A hidrazinilpirimidina **10c** mostrou ser inibidor da CYP2C19, 2C9 e 3A4, assim como **10h** que, para além destas, inibe também a CYP1A2. Este facto pode aumentar a probabilidade de interações medicamentosas.

Em relação à toxicidade, à exceção da **10c**, que apresenta potencial genotoxicidade e hepatotoxicidade e da **10h** que apresenta hepatotoxicidade, nenhuma das restantes hidrazilpirimidinas demonstra problemas, uma vez que apresentam bons níveis de dose máxima tolerada e toxicidade oral.

Neste contexto, e em comparação com os resultados obtidos na atividade inibitória da XO e atividade anti-bacteriana dos compostos, pode-se concluir que à exceção de **10c** e **10h**, todas as restantes hidrazinilpirimidinas aqui em estudo apresentam propriedades ADMET satisfatórias, tornando estes resultados ainda mais promissores.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Com este trabalho de dissertação foi possível a síntese e caracterização estrutural de 17 derivados de ácidos (tio)barbitúricos, dos quais duas 5-benzilidenopirimidinas, cinco 5-acilpirimidinas (uma nova) e dez hidrazinilpirimidinas (6 novas). No entanto, e apesar de várias tentativas, a síntese de derivados de ácidos (tio)barbitúricos com ciclização em C5-C6 para a obtenção de anéis fundidos de cinco membros não foi possível. Será ainda importante a síntese de análogos aos compostos já sintetizados, de maneira a conseguir estabelecer uma melhor relação estrutura atividade.

Para a avaliação biológica de inibição de atividade da XO verifica-se alguma capacidade de inibição enzimática por parte das hidrazinilpirimidinas **10b** e **10g** com IC_{50} calculado de 27,8 e 24,26 μ M, respetivamente. No entanto, os estudos de *docking* molecular destes ligandos com o sítio ativo da XO não são capazes de explicar o resultado do IC_{50} calculado. Assim, mais estudos deveriam ser realizados, nomeadamente a realização de gráficos de Lineweaver-Burk, para uma melhor compreensão do tipo de inibição em causa assim como a cinética de reação.

Na avaliação da atividade antioxidante verifica-se um potencial de redução do DPPH interessante para os derivados **10a-d** e **10g-h** destacando-se **10g-i** com IC_{50} calculado 20,97, 20,10 e 12,72 μ M, respetivamente.

No que respeita à atividade anti-bacteriana foram observados resultados bastantes promissores, uma vez que **10a-c** e **10f-h** mostraram elevada seletividade para a *Acineobacter baumannii*, com atividade inibitória significativa, em especial a **10a** com MIC calculado de 6,25 μ M. No entanto, mais testes terão de ser realizados, de maneira a compreender o mecanismo de ação aqui envolvido.

Para os ensaios de proliferação celular (MTT), os compostos sintetizados não originaram percentagens de proliferação baixas em MCF-7, no entanto, seria pertinente um estudo de concentração resposta para o composto **10g**. O mesmo não acontece nas células NHDF, onde é notória uma diminuição na proliferação por parte de **10f-h**, com IC_{50} calculado de 77,72, 81,72 e 147,9 μ M, respetivamente.

5. Secção Experimental

5.1. Síntese e caracterização estrutural

Todos os solventes e reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente, tendo o grau de pureza analiticamente caracterizado e, sempre que necessário, os solventes foram secos sobre peneiros moleculares 4 Å.

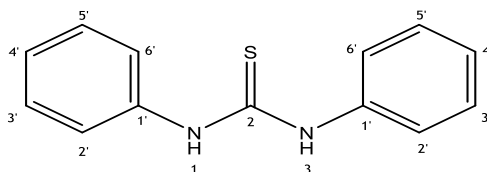
Todas as reações foram seguidas por ccf utilizando placas de alumínio de 0,2 mm revestidas com sílica-gel (Macherey-Nagel 60 G/UV254). O eluente é referido em cada caso, mencionando-se a proporção volumétrica dos vários componentes dos eluentes mistos. Após eluição, as placas foram visualizadas por luz UV ao comprimento de onda de 254 e/ou 365 nm.

Os pontos de fusão (pf) foram determinados para os produtos que se encontravam sob a forma de cristal ou sólido com tubos capilares abertos, num aparelho de pontos de fusão Büchi B-540 e não foram corrigidos.

Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR, obtidos por refletância total atenuada (ATR - do inglês, Attenuated Total Reflectance) e *software* Omnic 8.2, segundo as principais definições de: background com 64 scans; amostra com 32 scans; resolução de 4 cm⁻¹, entre 4000 e 600 cm⁻¹. Na descrição dos compostos, os dados obtidos são indicados pela seguinte ordem: frequência máxima da banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm⁻¹) e atribuição a um grupo de átomos na molécula, no caso das bandas características.

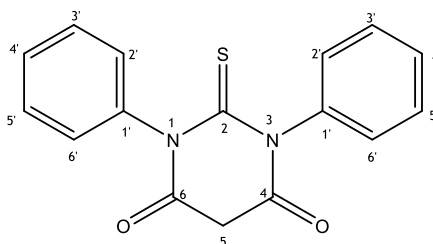
Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram efetuados num espectrómetro Brüker Avance III 400 MegaHertz (MHz) (400,13 e 100,62 MHz, respectivamente), sendo processados no software Topspin 3.1. Foi utilizado como solvente o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆), ou clorofórmio deuterado (CDCl₃), sendo ainda utilizados como padrão interno (DMSO-*d*₆, δ = 2,50 ppm e 39,52 ppm em RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente). Para alguns dos compostos foram realizados espectros de correlação heteronuclear a uma ligação (HSQC - do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC - do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Na descrição dos compostos, os dados obtidos são indicados pela seguinte ordem: para RMN de ¹H - solvente; desvio químico (δ , em ppm); multiplicidade do sinal [s (singleto), sl (singleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), dt, t (tripleto), dt (duplo tripleto) ou m (multiplete)]; intensidade relativa (nH, como número de prótons); constante de acoplamento [*J*, em Hertz (Hz)]; atribuição do próton na molécula; para RMN de ¹³C - solvente; desvio químico (δ , em ppm); atribuição do carbono na molécula.

5.1.1. 1,3-Difeniltioureia (3)



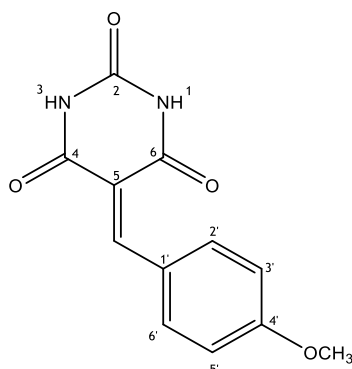
A solução de anilina (1 mmol, 93 mg) em diclorometano (0,5 mL) foi adicionada gota-a-gota a uma solução de fenilisotiocianato (1 mmol, 135 mg) em diclorometano (0,5 mL), sob agitação e à temperatura ambiente durante 3 horas. O sólido formado foi filtrado e lavado com éter dietílico seco. Rendimento: 95%; Cristais brancos; pf: 142-144°C (pf lit.¹¹³ 140-142°C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3202 (N-H), 3053, 1598 (C=C), 1526, 1491, 1449, 1342, 1313, 1288, 1242, 1171, 1069, 1021, 1003, 933, 756, 694, 642, 629, 610; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 9,79 (s, 2H, 2 x NH), 7,48 (d, 4H, $J = 7,4$ Hz, 2 x 2'-ArCH e 2 x 6'-ArCH), 7,33 (t, 4H, $J = 8,2, 7,6$ Hz, 2 x 3'-ArCH e 2 x 5'-ArCH), 7,12 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, 2 x 4'-ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 179,63 (CS), 139,46 (2 x 1'-ArC), 128,45 (4 x ArCH), 124,44 (2 x 4'-ArCH), 123,66 (4 x ArCH);

5.1.2. 1,3-Difenil-2-tioxopirimidina-4,6-diona (4a)



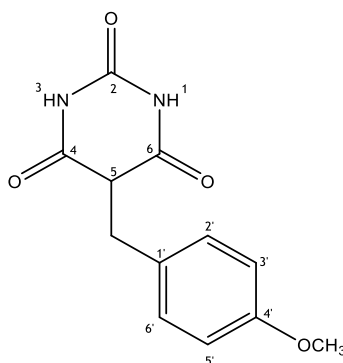
A mistura de 1,3-difeniltioureia (228mg; 1 mmol), ácido malónico (135mg, 1,3 mmol) e 3 cloreto de acetilo (235mg 3 mmol) foi colocada a 60°C durante 30 minutos. O sólido obtido foi finamente dividido, filtrado, lavado com água e recristalizado de ácido acético. Rendimento: 95%; Cristais em agulha amarelos claro; pf: 252-253°C (pf lit.^{112, 135} 258-259°C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3053, 2895, 1727 (C=O), 1707 (C=O), 1594 (C=C), 1490, 1454, 1381, 1338, 1260, 1212, 1165, 1169, 1037, 1003, 927, 747, 696, 687, 667; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,55 - 7,41 (m, 6H, ArCH), 7,21 (d, 4H, $J = 7,3$ Hz, 2 x 6' e 2'-ArCH), 4,10 (s, 2H, 5-CH₂); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 181,64 (2-CS), 163,32 (4 e 5-CO), 138,75 (2 x ArC), 129,68 (ArCH), 129,20 (ArCH), 128,64 (ArCH), 41,23 (5-CH₂).

5.1.3. 5-(4-Metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (6a)



A mistura de ácido barbitúrico (1 mmol) e 4-metoxi-benzaldeído (1 mmol) em água (7mL) foi colocada em refluxo durante 1h. O sólido formado foi separado por filtração e lavado com água fria e éter dietílico. A reação foi seguida por ccf (eluente: acetato de etilo). Rendimento: 92%; sólido amarelo; pf: 286-289 °C (pf lit.¹¹⁵ 297-300 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3046 (C-H), 2838 (C-H), 1745 (C=O), 1698 (C=O), 1651 (C=O), 1601, 1567, 1532, 1509, 1444, 1431, 1393, 1355, 1316, 1266 (C-O), 1215, 1179 (C-O), 1117, 1041, 1001, 834, 790, 752, 691, 631; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 11,29 (s, 1H, NH), 11,16 (s, 1H, NH), 8,37 (d, 2H, *J* = 8,9 Hz, 2' e 6' -ArCH), 8,25 (s, 1H, 5-CH), 7,06 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz, 3' e 5' -ArCH), 3,87 (s, 3H, CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 163,91 (C=O), 163,44 (C=O), 162,18 (4' -ArCOCH₃), 154,94 (5 -CCH), 150,20 (2 -C=O), 137,48 (2' e 6' -ArCH), 125,17 (1' -ArC), 115,56 (5 -CCH), 113,95 (3' e 5' -ArCH), 55,70 (OCH₃).

5.1.4. 5-(4-Metoxibenzil)pirimidina-2,4,6-triona (6b)



À solução de 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (1,5 mmol) em etanol (30 mL) foi adicionado NaBH₄ (3,5 mmol) em três vezes. A solução permaneceu à temperatura ambiente durante 4h. O solvente foi evaporado a pressão reduzida, foi adicionada água (20 mL) e acidificou-se com HCl concentrado (pH= 5). O sólido formado foi filtrado, seco e recristalizado de metanol. A reação foi seguida por ccf (eluente: acetato de etilo). Rendimento: 41%; Sólido branco; pf: 194-195 °C (pf lit.¹¹⁶ 205-210 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3224 (N-H), 2966 (C-H), 2929 (C-H), 2835 (C-H), 1743 (C=O), 1669 (C=O), 1608, 1566, 1504, 1421, 1390, 1324, 1299, 1273, 1249

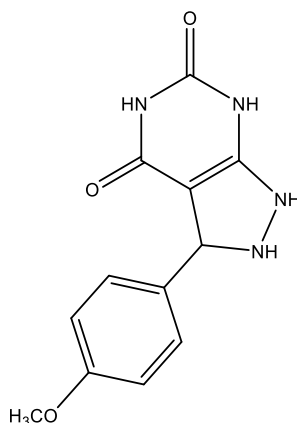
(C-O), 1175 (C-O), 1113, 1093, 1033, 835, 797, 779, 751, 688, 668; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 11,15 (s, 2H, NH), 6,99 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, 2' e 6' -ArCH), 6,81 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, 3' e 5' -ArCH), 3,82 (t, 1H, $J = 4,8$ Hz, 5 -CH), 3,70 (s, 3H, CH₃), 3,19 (d, 2H, $J = 4,8$ Hz, 5 -CCH₂); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 170,04 (4 e 6 -CO), 158,05 (4' -ArCOCH₃), 150,55 (2 -CO), 130,03 (1' -ArC), 128,93 (2' e 6' -ArCH), 113,71 (4' e 6' -ArCH), 54,94 (OCH₃), 49,57 (5 -CH), 32,83 (5 -CCH₂).

5.1.5. Pirazolopirimidinas 7a-c

Condições reacionais A: A mistura de 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (1 mmol), hidrazina correspondente (2 mmol), etanol (3 mL) e ácido acético (1 mL) foi colocada em refluxo durante 48h.

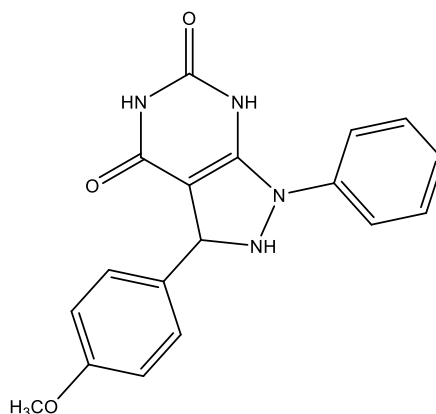
Condições reacionais B: A mistura de 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (1 mmol), hidrazina correspondente (2mmol), triflato de bismuto (0,1mmol) em isopropanol foi colocada em refluxo durante 24h.

3-(4-Metoxifenil)-1,2,3,7-tetrahidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diona (7a)



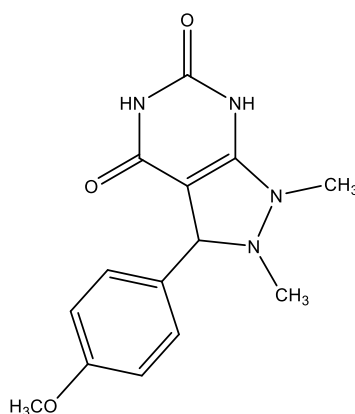
Preparada de acordo com o método A ou B, partindo de 5-(4-metoxibenzilideno) pirimidina-2,4,6- triona com hidrato de hidrazina. Após o tempo reacional verificou-se por ccf a formação de uma mistura complexa na qual não foi possível isolar o produto pretendido.

3-(4-metoxifenil)-1-fenil-1,2,3,7-tetrahydro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina-4,6-diona (7b)



Preparado de acordo com o método A, partindo de 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona com fenilhidrazina. Após o tempo reacional verificou-se por ccf a formação de uma mistura complexa na qual não foi possível isolar o produto pretendido.

3-(4-Metoxifenil)-1,2-dimetil-1,2,3,7-tetrahydro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina-4,6-diona (7c)



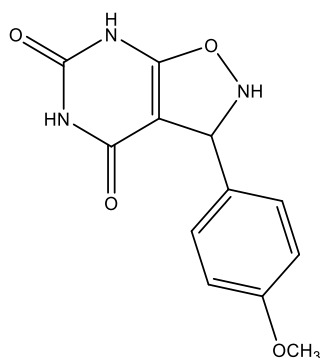
Preparado de acordo com as condições reacionais B, partindo de 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona com *N,N'*-dimetilhidrazina dicloridrato. Após o tempo reacional verificou-se por ccf a formação de uma mistura complexa na qual não foi possível isolar o produto pretendido.

5.1.6. Isoxazolopirimidina 7d

Condições reacionais A: A mistura de 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (1 mmol) e cloridrato de hidroxilamina (2 mmol) em etanol absoluto (5mL) e ácido acético (1mL) foi colocada em refluxo durante 72h. A reação foi seguida por ccf (acetato de etilo/éter de petróleo 1:1).

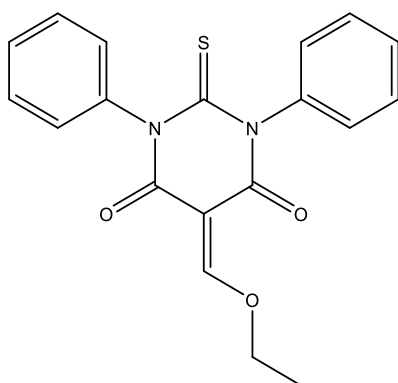
Condições reacionais B: A mistura de 5-(4-metoxibenzilideno)pirimidina-2,4,6-triona (1 mmol) e cloridrato de hidroxilamina (2 mmol) em etanol absoluto (5mL) foi colocada em refluxo durante 48h. Passadas as 48h foi adicionado cloridrato de hidroxilamina (0,5 mmol) e etanol (2 mL) e permanecendo em refluxo durante mais 24h. A reação foi seguida por ccf (acetato etilo/éter de petróleo 1:1).

3-(4-Metoxifenil)-3,7-dihidroisoxazolo[5,4-d]pirimidina-4,6-diona (7d)



Preparada de acordo com os métodos A e B, durante o tempo reacional, verificou-se por ccf não ter havido evolução da reação.

5.1.7. (Etoximetileno)-1,3-difenil-2-tioxi-2,6-dihidropirimidina-4,6-diona (8a)



A mistura de ácido 1,3-difeniltioarbiturico (1 mmol), e trietilortoformiato (1 mL) em 1-butanol (10 mL) foi colocada a refluxo durante 3 horas, verificando-se uma mudança de coloração para vermelho com conseqüente formação de precipitado. Este foi isolado por filtração a quente e lavado com etanol a quente. Através de análise por ccf o precipitado mostrou ser uma mistura de vários produtos, não sendo possível identificar e isolar o produto de interesse.

5.1.8. 5-Acilpirimidinas 9a-e

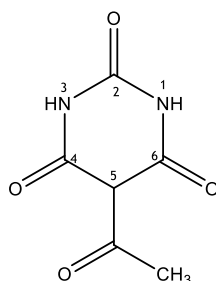
Condições reacionais A: A mistura de ácido (tio)barbitúrico correspondente (1mmol) em anidrido acético (1mmol) e ácido sulfúrico (0,1mmol) foi colocada em refluxo durante 1h. A mistura reacional foi concentrada até atingir metade do volume inicial e vertida sobre gelo. O sólido formado foi separado por filtração e lavado com água quente. A reação foi seguida por ccf (eluente: diclorometano/5% metanol).

Condições reacionais B: A mistura de ácido (tio)barbitúrico correspondente (1mmol) em THF (2,5mL) com anidrido trifluoroacético (1mmol) foi colocada em refluxo durante 24h. A mistura reacional foi concentrada até atingir metade do volume inicial. Depois de arrefecida num banho de gelo foi adicionada água fria. O sólido formado foi separado por filtração. A reação foi seguida por ccf (eluente: diclorometano/5% metanol).

Condições reacionais C: A mistura de ácido barbitúrico (1mmol) em THF (2,5mL) foi colocada em refluxo com piridina (1,1mmol) e anidrido trifluoroacético (1 mmol) durante 24h. A mistura reacional foi concentrada até atingir metade do volume inicial. Depois de arrefecida num banho de gelo foi adicionada água fria. O sólido formado foi separado por filtração. A reação foi seguida por ccf (eluente: diclorometano/5% metanol).

Condições reacionais D: A mistura de ácido barbitúrico (1 mmol) em piridina (5 mL) foi aquecida a 70 °C até dissolver. De seguida adicionou-se lentamente anidrido benzóico (1 mmol) e a solução permaneceu a 70 °C durante 2h e foi deixada à temperatura ambiente durante 12h. O solvente foi evaporado a pressão reduzida. O sólido foi dissolvido em água quente (30 mL) e acidificado com HCl concentrado (pH = 1), permanecendo à temperatura ambiente durante 2h. O sólido foi separado por filtração e lavado com água (5 x 10 ml). A reação foi seguida por c.c.f. (diclorometano/metanol 5%).

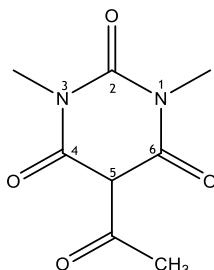
5-Acetilpirimidina-2,4,6-triona (9a)



Condições reacionais A, a partir do ácido barbitúrico; depois de filtrado e seco, o sólido foi cristalizado de etanol/água (2:1) Rendimento: 83%; sólido castanho; pf: 305-307 °C (pf lit.¹¹⁷ 296-300 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3280 (N-H), 3202 (N-H), 3115, 3029, 2776, 1779 (C=O), 1732 (C=O), 1688 (C=O), 1625, 1515, 1463, 1380, 1249, 1207, 1114, 1061, 1028, 966, 800, 741, 650; RMN de

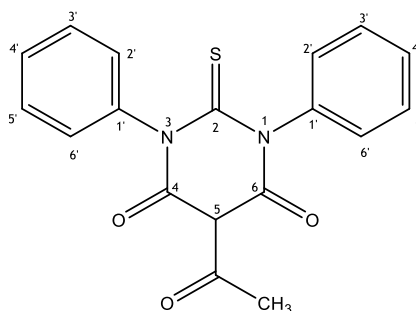
^1H (400 MHz DMSO- d_6) δ (ppm) 11,78 (s, 1H, NH), 11,04 (s, 1H, NH), 2,58 (s, 3H, 5- CCCH_3); RMN de ^{13}C (101 MHz DMSO- d_6) δ (ppm) 195,35 (5- CC), 149,52 (2- C), 95,89 (5- CH), 24,29 (5- CCCH_3).

5-Acetil-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6-triona (9b)



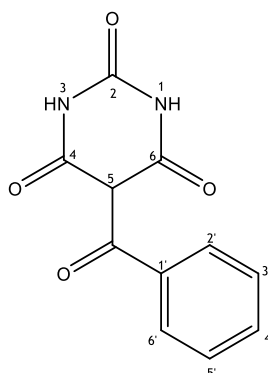
Condições reacionais A, a partir do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico; depois de filtrado e seco o sólido foi cristalizado de etanol/água (2:1); Rendimento: 45%; sólido dourado; pf: 91-92 °C (pf lit.¹¹⁸ 96,5-98,5 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3011, 2963, 1721 (C=O), 1656 (C=O), 1557, 1494, 1455, 1364, 1337, 1274, 1221, 1164, 1017, 988, 876, 787, 754, 676; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 3,18 (s, 6H, 1 e 3- NCH_3), 2,63 (s, 3H, 5- CCCH_3); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 194,96 (5- CCC), 150,45 (2- C), 96,38 (5- CH), 28,06 (CH_3), 24,54 (5- CCCH_3); HRMS (ESI-TOF): m/z [$\text{M}^+ + \text{H}$] calculado para $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4$: 199,0713; encontrado: 199,0726; [$\text{M}^+ + \text{Na}$] calculado para $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{NaO}_4$: 221,0533; encontrado: 221,0551

5-Acetil-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (9c)



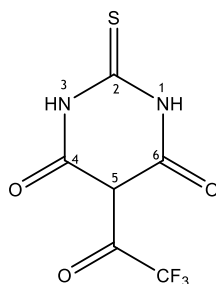
Obtido a partir de acordo com o método A, a partir do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico; depois de filtrado e seco o sólido foi cristalizado de etanol/água (2:1); Rendimento: 65%; cristais em agulha castanhos; pf: 256-257 °C (pf lit.¹¹² 258-259 °C). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3051, 3014, 1701 (C=O), 1635 (C=O), 1595, 1557, 1488, 1452, 1414, 1364, 1320, 1271, 1240, 1187, 1161, 1094, 1004, 967, 914, 828, 781, 746, 730, 639, 652, 612; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7,48 (t, 4H, $J = 7,4$ Hz, 3' e 5' - ArCH), 7,39 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz, 2' - ArCH), 7,30 (d, 4H, $J = 7,7$ Hz, 2' e 6' - ArCH), 2,66 (s, 3H, 5- CCCH_3); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 196,90 (5- CC), 179,97 (2- C), 139,68 (1' - ArC), 129,54 (2' e 6' - ArCH), 129,32 (3' e 5' - ArCH), 128,79 (4' - ArCH), 98,72 (5- CH), 25,06 (5- CCCH_3).

5-Benzoilpirimidina-2,4,6-triona (9d)



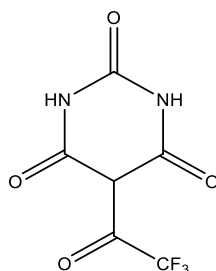
Condições reacionais D; Rendimento: 75%; sólido azul escuro; pf: 276-277 (pf lit. 275 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3296 (N-H), 3113, 3020, 2816, 1774 (C=O), 1745 (C=O), 1704 (C=O), 1629 (C=O), 1600, 1583, 1537, 1458, 1441, 1397, 1378, 1346, 1288, 1241, 1165, 1103, 1076, 1026, 959, 928, 771, 757, 727, 706, 692; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 11,48 (s, 2H, 1 e 3 -NH), 7,61 - 7,50 (m, 3H, 2', 4' e 6' -ArCH), 7,44 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, 3' e 5' -ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 190,55 (5-C $\underline{\text{C}}$), 149,75 (2-C $\underline{\text{C}}$), 135,57 (1'-Ar $\underline{\text{C}}$), 131,95 (4'-Ar $\underline{\text{C}}$), 129,03 (2' e 6'-Ar $\underline{\text{C}}$), 127,93 (3' e 5'-Ar $\underline{\text{C}}$), 95,56 (5-C $\underline{\text{H}}$).

2-Tioxo-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)di-hidropirimidina-4,6-diona (9e)



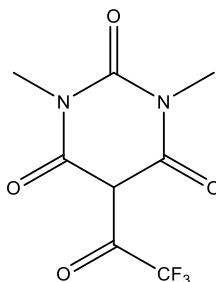
Condições reacionais B, a partir do ácido tiobarbitúrico; Rendimento: 37%; sólido branco; pf: 240-241 °C FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3094, 2941, 2870, 2595, 1679 (C=O), 1642 (C=O), 1558, 1525, 1434, 1402, 1380, 1347, 1293, 1270, 1239, 1155 (CF_3), 924, 793; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 12,18 (s, 2H, 1 e 3 NH), 4,90 (s, 1H, 5 -CH); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 181,28 (5-C $\underline{\text{C}}$), 175,51 (2-C $\underline{\text{C}}$), 166,45 (C $\underline{\text{O}}$), 162,49 (C $\underline{\text{O}}$), 82,41 (5-CCC $\underline{\text{F}}$), 31,16 (5-C $\underline{\text{H}}$).

5-(2,2,2-Trifluoroacetil)pirimidina-2,4,6-triona (9f)



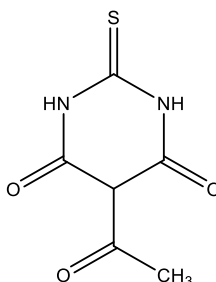
Condições reacionais B e C, partindo do ácido barbitúrico. Após o tempo reacional, a ccf mostrou-se inconclusiva. O solvente foi evaporado a pressão reduzida, foi adicionada água fria, o sólido foi filtrado e lavado com água. Após análise por RMN de ^1H , verificou-se que não tinha ocorrido reação, apresentando os sinais característicos do ácido barbitúrico. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 11.11 (s, 2H), 3.46 (s, 2H).

1,3-Dimetil-5-(2,2,2-trifluoroacetil)pirimidina-2,4,6-triona (9g)



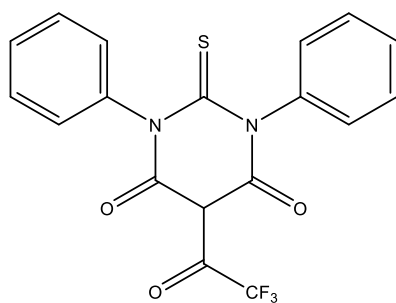
Preparado de acordo com o método B, partindo do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico. Após o tempo reacional a ccf mostrou-se inconclusiva. O solvente foi evaporado a pressão reduzida, foi adicionada água fria, o sólido foi filtrado e lavado com água. Após análise por RMN de ^1H , verificou-se que não tinha ocorrido reação, apresentando os sinais característicos do ácido barbitúrico. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 3,70 (s, 2H), 3,11 (s, 6H).

5-Acetil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (9h)



Preparado de acordo com o método A. Após o tempo reacional, verificou-se por ccf a formação de uma mistura complexa da qual não foi possível isolar o produto pretendido.

1,3-difenil-2-tioxo-5-(2,2,2-trifluoroacetil)dihi-dropirimidina-4,6-diona (9i)

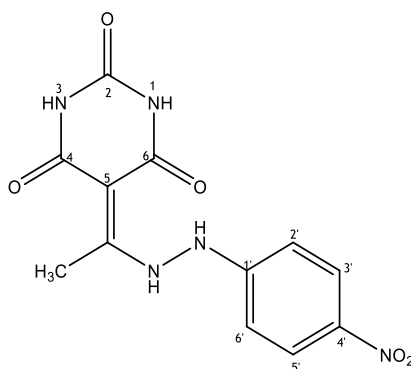


Preparado de acordo com o método B, partindo do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico. Após o tempo reacional, verificou-se por ccf a formação de uma mistura complexa da qual não foi possível isolar o produto pretendido.

5.1.9. Hidrazinilpirimidinas 10a-n

A suspensão de 5-acil-pirimidina correspondente (1mmol) em metanol (20mL) foi colocada em refluxo durante a noite com a respectiva hidrazina (1mmol). A mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e o sólido formado foi filtrado com água quente e lavado com metanol. A reação foi seguida por ccf (eluente: diclorometano /5% metanol).

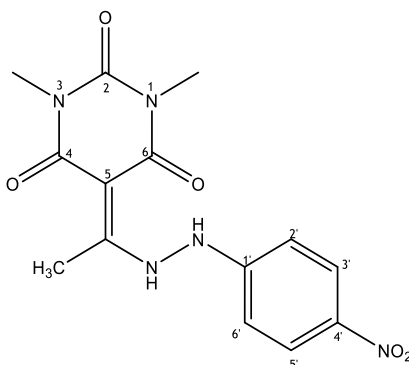
5-(1-(2-(4-Nitrofenil)hidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona (10a)



Obtido a partir da 5-acetil-pirimidina-2,4,6-triona e 4-nitrofenilhidrazina; Rendimento: 71%; Sólido beije; pf: 324-326 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3282 (N-H), 3207 (N-H), 3087, 3011, 2818, 2159, 2034, 1715 (C=O), 1625 (C=O), 1602, 1572, 1501, 1461, 1376, 1335 (NO₂), 1269, 1237, 1184, 1112 (C-NO₂), 1077, 1038, 833, 786, 766, 749, 685, 618; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 13,24 (s, 1H, 5-CCNH), 10,80 (s, 1H, NH), 10,66 (s, 1H, NH), 9,67 (s, 1H, 1'-ArCNH), 8,14 (d, 2H, J = 9,2 Hz, 3' e 5'-ArCH), 6,85 (d, 2H, J = 9,1 Hz, 2' e 6'-ArCH), 2,62 (s, 3H, CH₃); RMN de

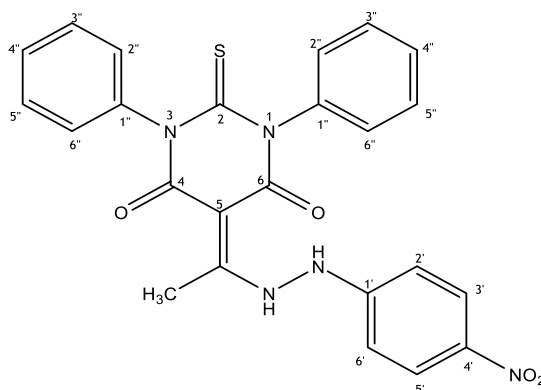
^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 175,67 (1'-ArC), 152,92 (5-CC), 150,12 (2-CO), 140,07 (4'-ArC), 126,53 (3' e 5'-ArCH), 111,84 (2' e 6'-ArCH), 89,63 (5-C), 16,15 (CH₃).

1,3-Dimetil-5-(1-(2-(4-nitrofenil)hidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona (10b)



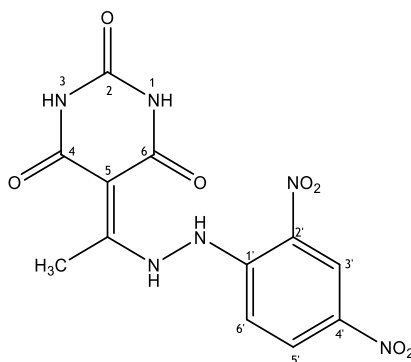
Obtido a partir da 5-acetil-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6-triona e 4-nitrofenilhidrazina; Rendimento: 67%; sólido cor de tijolo; pf: 228-232 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3327 (N-H), 3254 (N-H), 2948, 2602, 2432, 2160, 1706 (C=O), 1612, 1524 (NO₂), 1498, 1455, 1416, 1376, 1357, 1321 (NO₂), 1299, 1270, 1202, 1176, 1104 (C-NO₂), 971, 836, 797, 794, 690, 658; RMN de ¹H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 13,29 (s, 1H, 5-CCNH), 9,76 (s, 1H, 1'-ArCNH), 8,16 (d, 2H, $J = 9,8$ Hz, 3' e 5'-ArCH), 6,85 (d, 2H, $J = 9,1$ Hz, 2' e 6'-ArCH), 3,19 (s, 6H, CH₃), 2,66 (s, 3H, 5-CCCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 175,81 (1'-ArC), 152,80 (5-CC), 151,07 (CO), 140,09 (4'-ArC), 126,51 (3' e 5'-ArCH), 111,82 (2' e 6'-ArCH), 89,98 (5-C), 28,03 (CH₃), 16,77 (5-CCCH₃); HMRS (ESI-TOF): m/z [$M^{++} + H$] calculado para C₁₄H₁₆N₅O₅: 334,1146; encontrado: 334,1148; [$M^+ + Na$] calculado para C₁₄H₁₅NaO₅: 356,0965; encontrado: 356,0968

5-(1-(2-(4-nitrofenil)hidrazinil)etilideno)-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (10c)



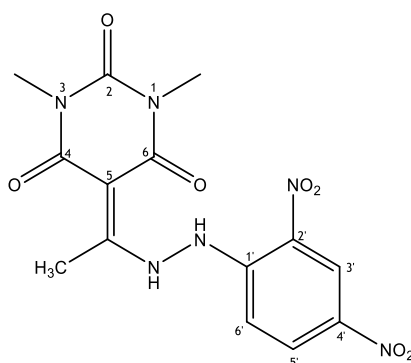
Obtido a partir da 5-acetil-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona e 4-nitrofenilhidrazina. Rendimento: 81%; sólido beije; pf: 285-288 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3193 (N-H), 3127, 3037, 2999, 2939, 1631 (C=O), 1590, 1573, 1522 (NO₂), 1487, 1454, 1403, 1355, 1318 (NO₂), 1274, 1235, 1165, 1112 (C-NO₂), 1069, 1024, 1002, 967, 907, 838, 824, 788, 748, 690, 637, 624; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13,18 (s, 1H, 5-CCNH), 9,86 (s, 1H, 1'-ArCNH), 8,15 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz, 3' e 5'-ArCH), 7,44 (t, 4H, *J* = 7,8 Hz, 3'' e 5''-ArCH), 7,35 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, 4''-ArCH), 7,27 (d, 4H, *J* = 7,2 Hz, 2'' e 6''-ArCH), 6,86 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz, 2' e 6'-ArCH), 2,66 (s, 3H, 5-CCCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 179,06 (C_S), 175,89 (1'-ArC), (4 e 6-CO) 151,95 (5-CC), 140,40 (4'-ArC), 139,72 (1''-ArC), 129,18 (2'' e 6''-ArCH), 128,79 (3'' e 5''-ArCH), 127,73 (4''-ArCH), 125,99 (3' e 5'-ArCH), 111,54 (2'-ArCH), 91,89 (5-CC), 16,84 (CH₃).

5-(1-(2-(2,4-dinitrofenil)hidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona (10d)



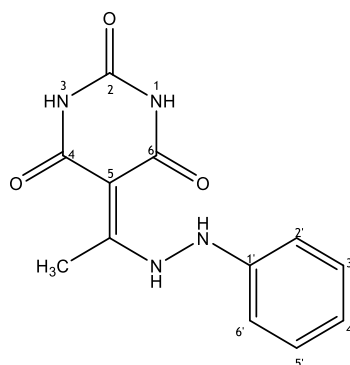
Obtido a partir da 5-acetilpirimidina-2,4,6-triona e 2,4-dinitrofenilhidrazina; Rendimento: 87%; sólido laranja; pf: decompõe a 342 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3325 (N-H), 3231 (N-H), 3094, 3033, 2797, 1710 (C=O), 1682 (C=O), 1634 (C=O), 1616, 1591, 1505 (NO₂), 1455, 1334 (NO₂), 1313 (NO₂), 1272, 1234, 1175, 1143 (NO₂), 1127 (NO₂), 1059, 1035, 925, 912, 805, 765, 740, 714, 661, 634; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13,22 (s, 1H, 5-CCNH), 10,95 (s, 1H, NH), 10,67 (s, 1H, NH), 10,57 (s, 1H, 1'-ArCNH), 8,89 (d, 1H, *J* = 2,6 Hz, 3'-ArCH), 8,38 (dd, 1H, *J* = 9,5, 2,6 Hz, 5'-ArCH), 7,20 (d, 1H, *J* = 9,5 Hz, 6'-ArCH), 2,62 (s, 3H, 5-CCCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 175,82 (5-CC), 149,63 (2-CO), 147,09 (1'-ArC), 137,79 (4'-ArC), 130,89 (2'-ArC), 130,42 (5'-ArC), 122,89 (3'-ArCH), 115,44 (6'-ArCH), 89,98 (5-C), 16,08 (5-CCCH₃).

5-(1-(2-(2,4-Dinitrofenil)hidrazinil)etilideno)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6-triona (10e)



Obtido a partir da 5-acetil-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6-triona e 2,4-dinitrofenilhidrazina; Rendimento: 83%; sólido amarelo; pf: 245-247 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 245-247 °C 3362 (N-H), 3093, 2952, 1705 (C=O), 1650 (C=O), 1615 (C=O), 1594, 1558, 1538 (NO₂), 1509 (NO₂), 1455, 1360, 1332 (NO₂), 1315 (NO₂), 1275, 1237, 1207, 1157 (NO₂), 1142 (NO₂), 1114, 1060, 972, 923, 850, 817, 754, 744, 715, 651, 620; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13,25 (s, 1H, 5-CCNH), 10,64 (s, 1H, 1'-ArCNH), 8,89 (d, 1H, *J* = 2,7 Hz, 3'-ArCH), 8,38 (dd, 1H, *J* = 9,4, 2,7 Hz, 5'-ArCH), 7,17 (d, 1H, *J* = 9,5 Hz, 6'-ArCH), 3,19 (s, 6H, CH₃), 2,65 (s, 3H, CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 176,01 (5-CC), 150,58 (2-CO), 146,98 (1'-ArC), 137,80 (4'-ArC), 130,88 (2'-ArC), 130,37 (5'-ArCH), 122,87 (3'-ArCH), 115,37 (6'-ArCH), 90,30 (5-C), 27,64 (CH₃), 16,72 (5-CCCH₃).

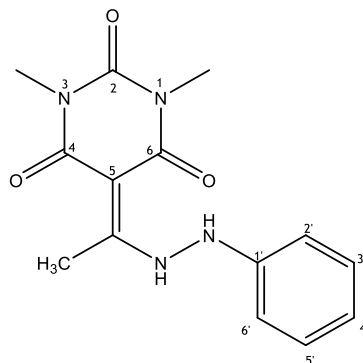
5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona (10f)



Obtido a partir de 5-acetil- pirimidina- 2,4,6-triona e fenilhidrazina; Rendimento: 92%; Sólido beije; p.f: 307-310 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3267 (N-H), 3173 (N-H), 3108, 3064, 3010, 2828, 1712 (C=O), 1662 (C=O), 1628 (C=O), 1601, 1567, 1498, 1458, 1429, 1407, 1376, 1359, 1306, 1255, 1241, 1181, 1152, 1048, 832, 799, 772, 746, 691, 651; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13,26 (s, 1H, 5-CCNH), 10,65 (s, 2H, NH), 8,54 (s, 1H, 1'-ArCNH), 7,26 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, 3' e 5'-ArCH), 6,89 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, 4'-ArCH), 6,76 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz, 2' e 6'-ArCH), 2,67 (s, 3H,

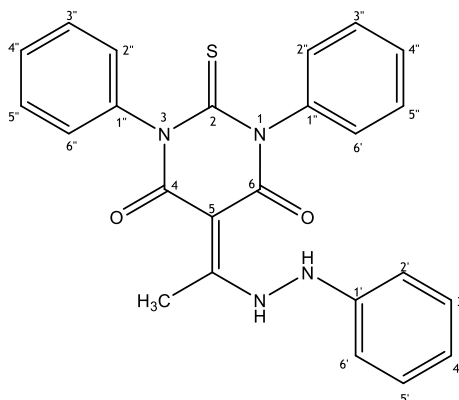
CH_3); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 174,87 (5- $\text{C}\underline{\text{C}}$), 149,72 (2- $\text{C}\underline{\text{O}}$), 146,59 (1'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}$), 129,39 (3' e 5'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 120,66 (4'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 112,75 (2' e 6'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 88,20 (5- $\underline{\text{C}}$), 15,69 (5- $\text{CC}\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

1,3-Dimetil-5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona (10g)



Obtido a partir de 5-acetil-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6-triona e fenilhidrazina; Rendimento: 50%; Cristais em agulha brancos; pf: 182-184 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3250 (N-H), 3111, 2997, 2950, 1704 (C=O), 1672 (C=O), 1600, 1561, 1459, 1415, 1374, 1355, 1306, 1252, 1214, 1157, 1123, 1053, 1026, 971, 816, 736, 749, 690, 641; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 13,36 (s, 1H, 5- $\text{CC}\underline{\text{N}}\text{H}$), 8,63 (s, 1H, 1'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{NH}$), 7,27 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, 3' e 5' - $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 6,89 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz, 4'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 6,77 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, 2' e 6'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 3,17 (s, 6H, CH_3), 2,70 (s, 3H, 5- $\text{CC}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 174,83 (5- $\text{C}\underline{\text{C}}$) 150,66 (2- $\text{C}\underline{\text{O}}$), 146,43 (1'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}$), 129,39(3' e 5'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 120,71 (4'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 112,76 (2' e 6'- $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}$), 88,57 (5- $\underline{\text{C}}$), 27,50 (CH_3), 16,28 (5- $\text{CC}\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

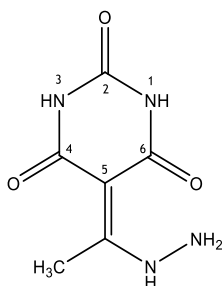
1,3-Difenil-5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)-6-tioxodi-hidropirimidina-2,4-diona (10h)



Obtido a partir de 5-acetil-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona e fenilhidrazina; Rendimento: 72%; Cristais em agulha castanhos; p.f: 234-236 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3243 (N-H), 3057, 2993, 2929, 2159, 1651 (C=O), 1620 (C=O), 1600, 1579, 1491, 1462, 1408, 1354, 1316, 1306, 1293, 1282, 1236, 1192, 1155, 1074, 1002, 821, 774, 743, 692, 613; RMN de ^1H (400 MHz,

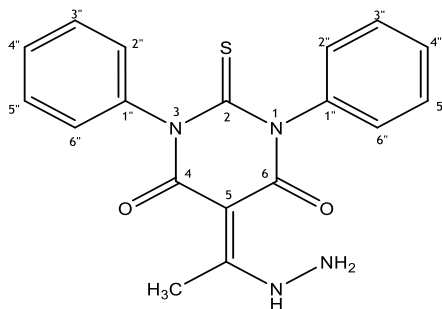
DMSO- d_6) δ (ppm) 13,29 (s, 1H, 5-CCNH), 8,77 (s, 1H, 1'-ArCNH), 7,43 (t, 4H, $J = 7,4$ Hz, 3'' e 5''-ArCH), 7,35 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, 4''-ArCH), 7,29 - 7,24 (m, 6H, 2'', 6'' 3' e 5'-ArCH), 6,90 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz, 4'-ArCH), 6,79 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz, 2' e 6'-ArCH), 2,71 (s, 3H, 5-CCCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 179,00 (2-CS), 174,86 (5-CC), 162,39 (4 e 6-CO), 145,90 (1'-ArC), 140,50 (1''-ArC), 129,45 (3' e 5'-ArCH), 129,23 (2'' e 6''-ArCH), 128,83 (3'' e 6''-ArCH), 127,73 (4''-ArCH), 121,01 (4'-ArCH), 112,98(2' e 6'-ArCH), 91,12 (5-C), 16,82 (5-CCCH₃).

5-(1-Hidraziniletilideno)pirimidina-2,4,6-triona (10i)



Obtido a partir de 5-acetilpirimidina- 2,4,6-triona e hidrato de hidrazina; Rendimento: 86%; sólido amarelo; pf: decompõe a 300 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3344 (NH₂), 3246 (NH₂), 3004, 1639 (C=O), 1647 (C=O), 1609, 1573, 1435, 1374, 1346, 1262, 1242, 1144, 1093, 1037, 977, 923, 872, 797, 781, 755, 672; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 13,19 (s, 1H, 5-CCNH), 10,34 (s, 2H, NH), 5,55 (s, 2H, NH₂), 2,61 (s, 3H, CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 168,35 (5-CC), 165,64 (4 e 6-CO), 149,87 (2-CO), 86,07(5-C), 15,19 (5-CCCH₃).

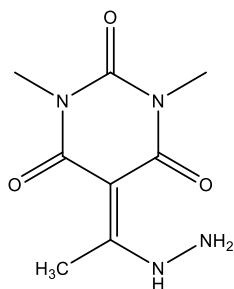
5-(1-Hidraziniletilideno)-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona (10j)



Obtido a partir de 5-acetil-1,3-difenil-2-tioxodi-hidropirimidina e hidrato de hidrazina; Rendimento: 88%; sólido castanho; pf: 242-243 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3331 (NH₂), 3246 (NH₂), 3047, 1662 (C=O), 1620, 1593, 1552, 1489, 1454, 1410, 1363, 1355, 1311, 1298, 1284, 1175, 1122, 1066, 1021, 977, 817, 800, 772, 752, 720, 692, 607; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 13,35 (s, 1H, 5-CCNH), 7,44 - 7,20 (m, 12H, ArCH e NH₂), 2,61 (s, 3H, 5-CCCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 178,46 (2-CS), 166,18 (5-CC), 162,03 (4 e 5-CO), 140,66 (1''-

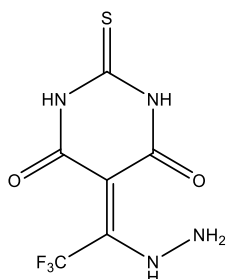
ArC), 129,22 (2'' e 6''-ArCH), 128,63 (3'' e 5''-ArCH), 127,48 (4''-ArCH), 89,19 (5 -C), 15,91 (5-CCCH₃); HRMS (ESI-TOF): *m/z* [M⁺ + H] calculado para C₁₈H₁₇NaO₂S: 353,1067; encontrado: 353,1069; [M⁺ + Na] calculado para C₁₈H₁₆N₄NaO₂S: 375,0886; encontrado: 375,0866.

5-(1-Hidraziniletilideno)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6-triona (10k)



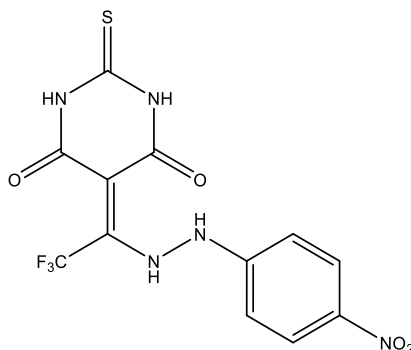
Preparado a partir de 5-acetil-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6-triona com hidrato de hidrazina. Após o tempo reacional verificou-se por ccf não ter havido evolução reacional

2-Tioxo-5-(2,2,2-trifluoro-1-hidraziniletilideno)di-hidropirimidina-4,6-diona (10l)



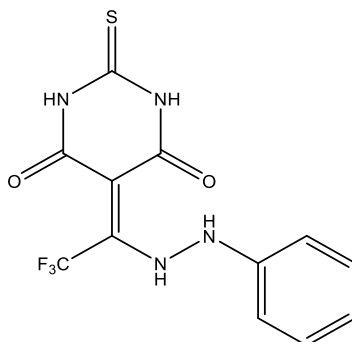
Preparado a partir da 2-tioxo-5-(2,2,2-trifluoroacetil)di-hidropirimidina-4,6-diona com hidrato de hidrazina. Após o tempo reacional verificou-se por ccf a formação de uma mistura complexa na qual não foi possível isolar o produto pretendido.

2-Tioxo-5-(2,2,2-trifluoro-1-(2-(4-nitrofenil)hidrazinil)etilideno)di-hidropirimidina-4,6-diona (10m)



Preparado a partir de 2-tioxo-5-(2,2,2-trifluoroacetil)di-hidropirimidina-4,6-diona com 4-nitrofenilhidrazina, através de análise por ccf verificou-se a formação de uma mistura complexa da qual não foi possível identificar o produto pretendido.

2-Tioxo-5-(2,2,2-trifluoro-1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)di-hidropirimidina-4,6-diona (10n)



Preparado a partir de ácido tiobarbitúrico com fenilhidrazina. Após o tempo reacional verificou-se por ccf a formação de uma mistura complexa na qual não foi possível isolar o produto pretendido.

5.2 Avaliação biológica

Para a avaliação das atividades biológicas dos compostos sintetizados, apenas foram analisados aqueles que se encontravam devidamente caracterizados e que não apresentavam por espectroscopia de ^1H e ^{13}C impurezas significantes.

Nos estudos de proliferação celular, foram usadas placas de cultura de 96 poços (Nunc, Apogent, Denmark) e as linhas celulares foram adquiridas à *American Type Culture Collection*

(ATCC), enquanto que os meios de cultura, reagentes e suplementos foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

Nos estudos enzimáticos e na avaliação da atividade antioxidante foram usadas placa de ELISA de 96 poços. Utilizou-se Xantina Oxidase de leite de bovino, adquirida à Sigma Aldrich, assim como todos os outros reagentes.

As leituras das absorvâncias foram registadas num espectrofotómetro de microplacas Bio-Rad xMark™.

5.2.1 Determinação *in Vitro* da atividade inibitória da Xantina Oxidase

5.2.1.1. Preparação das soluções

Os compostos em estudo foram dissolvidos em dimetilsulfóxido a uma concentração de 10 mM para o *screening* a 30 µM e a uma concentração de 50 mM para a realização de curvas concentração-resposta e armazenados a 4 °C. As soluções de xantina e ácido úrico a 10 mM foram preparadas numa solução aquosa de NaOH (25 mM) e armazenadas nas mesmas condições das soluções anteriores. A partir destas soluções-mãe, as várias soluções dos compostos foram preparadas por diluições adequadas em tampão dihidrogenofosfato de sódio (50mM), pH 7,4 antes de cada experiência, de modo a garantir uma concentração em cada poço de 30 µM no *screening* inicial e de 0,1, 1, 7,5, 15, 30, 50 e 100 µM para as curvas concentração-resposta. A concentração máxima de DMSO nos estudos foi de 1% (v/v), que não interfere com a atividade enzimática (dados não apresentados).

5.2.1.2. Procedimento geral

A atividade inibitória da xantina oxidase foi determinada espectralmente, medindo a formação de ácido úrico a partir da xantina, com adaptações aos métodos de *Zhao et al.*¹²⁰ e *Gupta et al.*^{120,71} A mistura reacional que continha, em cada poço, 50 µL de XO (0,1 U/mL) e 50 µL de solução teste foi pré-incubada a 37 °C durante 5 minutos. A reação começou com a adição de 150 µL de xantina (0,42 mM) sendo a mistura resultante incubada a 37 °C durante 10 min, com leituras da absorvância a 295 nm durante 10 minutos em intervalos de 1 minuto. Cada estudo correspondeu a três experiências, realizadas em triplicado. O allopurinol foi usado como controlo positivo e como controlo negativo utilizou-se tampão dihidrogenofosfato de sódio. Para descontar a absorvância de cada composto, foi realizado um ensaio em branco de cada amostra contendo a solução teste (50 µL) e tampão (200 µL). A percentagem de inibição da atividade da XO foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução} = [1 - (\text{Absorvância}_{\text{amostra}} - \text{Absorvância}_{\text{branco}}) / \text{Absorvância}_{\text{controlo negativo}}] \times 100$$

A atividade inibitória da enzima foi inicialmente testada através de um *screening* de todos os compostos a 30 µM. Para os compostos que apresentaram uma diminuição da atividade enzimática superior a 50 % foi calculado o seu valor de IC₅₀.

5.2.2. Determinação da atividade antioxidante - Ensaio DPPH

5.2.2.1. Preparação das soluções

Os compostos em estudo foram dissolvidos em dimetilsulfóxido numa concentração de 10 mM e armazenados a 4 °C. A partir desta solução-mãe, as várias soluções dos compostos foram preparadas por diluições adequadas em etanol antes de cada experiência, de modo a garantir uma concentração em cada poço de 30 µM para o *screening* inicial e de 1, 7,5, 15, 30, 50 e 100 µM para as curvas de concentração-resposta.

5.2.2.1. Procedimento geral

A atividade antioxidante foi determinada espectralmente, medindo a extensão de redução do DPPH de acordo com *Zhao et al.*¹²⁰ A mistura reacional contendo, em cada poço, 100 µL da solução teste e 100 µL da solução de DPPH (0,2 mM). A capacidade de redução do DPPH foi seguida medindo a absorvância a 517 nm aos 20 e 60 minutos, tendo a solução permanecido em repouso e na ausência de luz entre as medições. A absorvância do controlo negativo foi determinada pela substituição da solução teste por etanol, enquanto que o Trolox foi usado como controlo positivo. Para descontar a absorvância de cada composto, foi realizado um ensaio em branco de cada amostra, substituindo o DPPH por etanol. Cada estudo corresponde a três experiências, cada uma realizada em triplicado. A capacidade de redução do DPPH foi calculada segundo a expressão:

$$\% \text{ Redução} = [1 - (\text{Absorvância}_{\text{amostra}} - \text{Absorvância}_{\text{branco}}) / \text{Absorvância}_{\text{controlo negativo}}] \times 100$$

Após o *screening* inicial a 30 µM de cada composto, calcularam-se os valores de IC₅₀ para os compostos que apresentaram uma capacidade de redução do DPPH superior a 50%.

5.2.3. Estudos celulares

Para a avaliação dos efeitos na proliferação celular, os compostos sintetizados foram comparados com o controlo positivo 5-FU, em linhas celulares MCF-7 e NHDF.

5.2.3.1 Culturas celulares

As linhas celulares foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² e mantidas a 37 °C numa incubadora de atmosfera húmida com 5% de CO₂. A linha celular MCF-7 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico (AB - solução com 10,000 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina-B). Estas células foram usadas nas experiências nas passagens 26, 27 e 28. As células NHDF foram cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio e 1% de AB. Estas células foram utilizadas nas passagens p+6, p+7 e p+8.

5.2.3.2 Preparação das soluções

Os compostos estudados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido numa concentração de 10 mM e armazenados a 4 °C. A partir desta solução-mãe, as várias soluções dos compostos foram preparadas por diluição adequada em meio de cultura completo antes de cada experiência. A concentração máxima de DMSO nos estudos foi 1% (v/v), uma concentração sem efeito significativo na viabilidade das células (dados não apresentados).

5.2.3.3 Determinação *In Vitro* da proliferação celular

5.2.3.3.1 Tratamento das células com os compostos

Depois da tripsinização e contagem, 100 µL de uma suspensão de células no meio com densidade inicial de 2x10⁴ células/ mL foi semeada em cada poço das placas de cultura de 96 poços, deixando-se aderir por 48h. Depois do tempo de adesão, o meio foi removido e substituído pelas várias soluções de compostos em estudo, a uma concentração de 30 µM, no meio apropriado, incubando-se por aproximadamente 72h, e as células não tratadas foram usadas como controlo negativo. Cada experiência foi realizada em quadruplicado e repetida independentemente duas vezes, à exceção do estudo com células NHDF, que só foi realizado uma vez.

5.2.3.3.2 Ensaio MTT

A viabilidade celular foi avaliada quantificando a extensão de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Após o período de incubação de 72h o meio foi removido, foram adicionados 100 µL de solução de tampão fosfato salino (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 1.8 mM KH₂PO₄ em água destilada, pH 7,4) para lavar as células e, em seguida, 100 µL de solução de MTT (5mg/mL), preparada no meio adequado isento de soro, foram adicionados a cada poço, seguindo-se um período de incubação de 4h a 37 °C. Em seguida, o meio contendo MTT foi removido e os cristais de formazano foram dissolvidos em

DMSO. A absorvância foi medida a 570 nm. A extensão da morte celular foi expressa como percentagem de viabilidade celular relativamente às células utilizadas como controlo negativo.

5.2.4. Estatística

Os resultados de todos os ensaios foram expressos como valores médios±desvio padrão. O tratamento dos resultados, assim como estudos estatísticos foram realizados no *software* Microsoft Excel 2013. Para determinar a significância estatística ($p < 0,05$) foi aplicado o teste *t-Student*. Os valores de IC_{50} para os ensaios de proliferação celular foram calculados a partir da curva de concentração-resposta por ajuste sigmoide (intervalo de confiança de 95%).

5.3 Estudos *in silico*

5.3.1. *Docking molecular*

O estudo de *docking* molecular foi realizado entre os compostos sintetizados, o alopurinol, o composto para a validação do método e a enzima XOR, no seu sítio ativo.

O desenho das estruturas bidimensionais e a minimização de energias em 3D realizaram-se utilizando o *software ChemOffice* versão 13.0. da CamBridgeSoft.

A estrutura cristalizada da XOR foi obtida através do *PDB database* com o código 1VDV (1.98 Å de resolução). A proteína e o ligando foram isolados utilizando o *software Chimera* 1.9rc. Para preparar as moléculas para o *docking*, definir parâmetros e analisar resultados utilizou-se o *software AutoDock Tools* 1.5.6. Todos os cálculos de *docking* foram efetuados usando o *software AutoDock* 4.0. As interações entre o ligando e o sítio ativo da proteína foram visualizadas através do *software Discovery Studio Visualizer* v16.1.

A proteína foi preparada removendo as moléculas de água, adicionando cargas *Gasteiger* e removendo os hidrogénios não polares. Os parâmetros do ligando foram mantidos inalterados.

A validação da função de *score* foi realizada com a estrutura cristalizada da enzima XDH com o inibidor: 1VDV (inibidor Y-700) e recorrendo ao re-*docking* do respetivo ligando (dados não apresentados). O local para o *docking* foi definido recorrendo a uma *grid box* de dimensões 30 x 36 x 50 Å com espaçamento de 0.375 Å à volta do centro do ligando co-cristalizado, com espaçamento de 0,300 Å à volta do centro do ligando co-cristalizado, garantido assim que os ligandos estudados ocupam o espaço a eles confinado. Para a execução da *grid* foi adicionado o *parameter library filename* "AD4_Parameters.dat" (anexo 3). O método de pesquisa de

docking utilizado foi o algoritmo *Lamarckian genetic*, e para cada ligando foram geradas 10 conformações diferentes.

5.3.2. Predição das propriedades farmacocinéticas

As predições das propriedades farmacocinéticas foram realizadas para os compostos que apresentaram uma atividade antibacteriana significativa, pelo *software* pkSCM *on-line*, em <http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/pkscm/prediction>, de modo a prever o perfil ADMET destas moléculas.²⁰

6. Referências

1. Rick, Ng., *History of Drug Discovery and Development, Drugs: From Discovery to Approval, John Wiley & Sons, second Edition, 391-397 (2009)*
2. Dias, D. A., Urban, S., Roessner, U., A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites*, **2**, 303-336 (2012).
3. Beutler, J. A., Natural products as a foundation for drug discovery, *Current Protocols in Pharmacology*, 1-21 (2009).
4. Drews, J. Drug Discovery: A Historical Perspective, *Science*, **287**, 1960-1964 (2000).
5. Pina, A. S., Hussain, A., Roque, A. C. A., *An Historical Overview of Drug Discovery. Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **572**, 3-12 (2009).
6. Lombardino, J. G., Lowe, J. A., The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now, *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 853-862 (2004).
7. Bayo, J., Martinez, E., Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems, *The Practice of Medicinal Chemistry*, Elsevier Ltd, 3-12 (2015).
8. Gershell, L. J., Atkins, J. H., A brief history of novel drug discovery technologies, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 321-327 (2003).
9. Triggle, D. J., Drug discovery and delivery in the 21st century, *Med. Princ. Pract.*, **16**, 1-14 (2006).
10. Bleicher, K. H., Böhm, H.-J., Müller, K., Alanine, A. I., Hit and lead generation: beyond high-throughput screening, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 369-378 (2003).
11. Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B., Philpott, K. L., Principles of early drug discovery, *Br. J. Pharmacol.*, **162**, 1239-1249 (2011).
12. Ou-Yang, S.-S., Lu, J.-Y., Kong, X.-Q., Liang, Z.-J., Luo, C., Jiang, H. Computational drug discovery, *Acta Pharmacol. Sin.*, **33**, 1131-1140 (2012).
13. Fischer, P. M., Computational chemistry approaches to drug discovery in signal transduction., *Biotechnol. J.*, **3**, 452-470 (2008).
14. Minie, M., Chopra, G., Sethi, G., Horst, J., White, G., Roy, A., Hatti, K., Samudrala, R., CANDOR and the infinite drug discovery frontier, *Drug Discov. Today*, **19**, 1353-1363 (2014).

15. Vilar, S., Cozza, G., Moro, S., Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery, *Curr. Top. Med. Chem.*, **8**, 1555-1572 (2008).
16. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., Andricopulo, A. D., *Molecular docking and structure-based drug design strategies*, *Molecules*, **20**, 13384-13421 (2015).
17. Rangaraju, A., Rao, A. V., A Review On Molecular Docking - Novel tool in drug design and analysis Avinash, *J. Harmon. Res.*, **2**, 215-221 (2013).
18. de Ruyck, J., Brysbaert, G., Blossey, R., Lensink, M. F., Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel, *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.*, **9**, 1-11 (2016).
19. Wang, J., Urban, L., The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy, *Drug Discov. World*, 73-86 (2004).
20. Pires, D. E. V., Blundell, T. L., Ascher, D. B., pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures, *J. Med. Chem.*, **58**, 4066-4072 (2015).
21. Whitebread, S., Hamon, J., Bojanic, D., Urban, L., In vitro safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development, *Drug Discov. Today*, **10**, 1421-1433 (2005).
22. Schardinger, F., Ueber das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekoehter und gekoehter Milch, *Untersuchung der HaSrungs- und Genussmittel*, **22**, 1114-1121 (1902).
23. Morgan, E. J., Stewart, C. P., Hopkins, F. G., On the Anaerobic and Aerobic Oxidation of Xanthin and Hypoxanthine by Tissues and by Milk, *Proceedings of the Royal Society of London*, **94**, 109-131 (1992).
24. Lee, C., H., Nam, D., H., Huh, K., An Active Monomeric Form of Bovine Milk Xanthine Oxidase, *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 318-322 (1994).
25. Kumar, R., Sharma, D., S., Singh, R., Xanthine oxidase inhibitors: a patent survey, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **21**, 1071-1108 (2011).
26. Borges, F., Fernandes E., Roleira, F., Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, **9**, 195-217 (2002).
27. Harrison, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase., *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 774-797 (2002).

28. Kurosaki, M., Zanotta, S., Li Calzi, M., Garattini, E., Terao, M. Expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy and lactation: regulation of gene expression by glucocorticoids and prolactin, *Biochem. J.*, **319**, 801-810 (1996).
29. Asai, R., Nishino, T., Matsumura, T., Okamoto, K., Igarashi, K., Pai, E., Nishino, T. Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-productive xanthine oxidase, *J. Biochem.*, **141**, 525-534 (2007).
30. Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, t., Nishino, t.,. Pai, E. F., Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 10723-10728 (2000).
31. Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F., Nishino, T, Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, *FEBS J.*, **275**, 3278-3289 (2008).
32. Chung, H. Y., Baek, B. S., Song, S. H., Kim, M. S., Huh, J. I., Shim, K. H., Kim, K. W., Lee, K. H., xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress, *Age*, **20**, 127-140 (1997).
33. Hunt, J., Massey, V, Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase, *J Biol Chem* **267**, 21479-21485 (1992).
34. Amaya, Y., K., Yamazaki, M., Sato, K., Noda, N., Tomoko, T., Nishino, Proteolytic Conversion of Xanthine Dehydrogenase from the NAD⁺ dependent Type to the O²-dependent Type, *J. Biol. Chem.*, **265**, 14170-14175 (1990).
35. Nishino, T., Okamoto, K., Kawaguchi, Y., Hori, H., Matsumura, T., Eger, B. T., Pai, E. F., Nishino, T., Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: Identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant, *J. Biol. Chem.*, **280**, 24888-24894 (2005).
36. Tamta, H., Kalra, S., Mukhopadhyay, A. K., Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidine-based inhibitors of xanthine oxidase, *Biochemistry. (Mosc).*, **71**, S49-S54 (2006).
37. Ryan, M. G., Ratnam, K., Hille, R., The Molybdenum Centers of Xanthine Oxidase and Xanthine Dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 19209-19212 (1995).
38. Xia, M., Dempski, R., Hille, R., The reductive half-reaction of xanthine oxidase. Reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen, *J. Biol.*

- Chem.*, **274**, 3323-3330 (1999).
39. Choi, E.-Y., Stockert, A. L., Leimkühler, S., Hille, R., Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 841-848 (2004).
 40. Harrison, R., Physiological roles of xanthine oxidoreductase, *Drug Metab. Rev.*, **36**, 363-75 (2004).
 41. Hille, R., Massey, V., Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **256**, 9090-9095 (1981).
 42. Kostić, D. A., Dimitrijevic, D. S., Stojanovic, G. S., Palic, I. R., Dordevic, A. S., Ickovski, J. D., Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition, *J. Chem.*, **2015**, (2015).
 43. Parks, D.A., Granger, D.N., Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology, *Acta Physiol Scand Suppl*, **548**, 87-89 (1986).
 44. Al-Khalida, U. A. S., Chaglassian, T. H., Species distribution of xanthine oxidase, *Biochem. J.*, **97**, 318-320 (1965).
 45. Jarasch, E. D. Grund, C., Bruder, G., Heid, H. W., Keenan, T. W., Franke, W., Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium, *Cell*, **25**, 67-82 (1981).
 46. Bruder, G., Jarasch, E., Heid, H. W., High Concentrations of Antibodies to Xanthine Oxidase in Human and Animal Sera, *J. Clin. Invest.*, **74**, 783-794 (1984).
 47. Radi, R., Rubbo, H., Bush, K., Freeman, B. A., Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: Kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **339**, 125-135 (1997).
 48. Rouquette, M., Page, S., Bryant, R., Benboubetra, M., Stevens, C. R., Blake, D. R., Whish, W. D., Harrison, R., Tosh, D., Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and endothelial cells in culture, *Febs Lett*, **426**, 397-401 (1998).
 49. Ichikawa, M., Nishino, T., Ichikawa, Subcellular localization of xanthine oxidase in rat hepatocytes: high-resolution immunoelectron microscopic study combined with biochemical analysis, *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 1097-103 (1992).
 50. Frederiks, W. M., Vreeling-Sindelárová, H., Ultrastructural localization of xanthine oxidoreductase activity in isolated rat liver cells, *Acta Histochem.*, **104**, 29-37 (2002).

51. Dent, C., Philpot, G. R., Xantinuria, an inborn error (or deviation) of metabolism, *Lancet*, **23**, 182-185 (1954).
52. Harkness, R. A., McCreanor, G. M., Simpson, D., MacFadyen, I. R., Pregnancy in and incidence of xanthine oxidase deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **9**, 407-408 (1986).
53. Hancock, J. T., Salisbury, V., Cristina, M., Cherry, R., Hoare, C., Harrison, R., Ovejero-boglione, M. C., Eisenthal, R., Antimicrobial Properties of Milk: Dependence on Presence of Xanthine Oxidase and Nitrite, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **46**, 3308-3310 (2002).
54. Stevens, C. R., Millar, T. M., Clinch, J. G., Kanczler, J. M., Bodamyali, T., Blake, D. R., Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk, *The Lancet*, **356**, 829-830 (2000).
55. Martin, H. M., Hancock, J. T., Salisbury, V., Harrison, R., Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent, *Infection and Immunity*, **72**, 4933-4939 (2004).
56. Berry, C. E., Hare, J. M., Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* **555**, 589-606 (2004).
57. Kehrer, J. P., The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*, **149**, 43-50 (2000).
58. Bolann, B. J., Ulvik, R. J., Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical, *Biochem. J.* **243**, 55-59 (1987).
59. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* **312**, 159-163 (1985).
60. Saugstad, O. D., Hypoxanthine as a measurement of hypoxia, *Pediatr Res.*, **9**, 158-161 (1975).
61. Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabo, C. T Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol, *Pharmacol Ver*, **58**, 87-114 (2006).
62. Chaudhary, K., Malhotra, K., Sowers, J., Aroor, A., Uric acid-key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome, *CardioRenal Med.*, **3**, 208-220 (2013).
63. Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., Mollace, V., Regulation of uric acid metabolism and excretion, *Int. J. Cardiol.*, **213**, 8-14 (2016).

64. Jin, M., Yang, F., Yang, I., Yin, Y. Luo, J. J., Wang, H., Yang, X-F., Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases, *Front. Biosci*, **17**, 656-669 (2012).
65. Jalal, D. I., Chonchol, M., Chen, W., Targher, G., Uric acid as a target of therapy in CKD, *Am. J. Kidney Dis.*, **61**, 134-146 (2013).
66. Wu, X. H., Zhang, J., Wang, S. Q., Yang, V. C., Anderson, S., Zhang, Y. W., Riparoside B and timosaponin J, two steroidal glycosides from *Smilax riparia*, resist to hyperuricemia based on URAT1 in hyperuricemic mice. *Phytomedicine*, **21**, 1196-1201 (2014).
67. Wortmann, R. L., Gout and hyperuricemia, *Journal of pharmacy practice*, **12**, 326-334 (1999).
68. Priestx, D. G., Hynes, J. B., Jones, C. W., Ashton, W. T., Quinazolines as Inhibitors of Xanthine Oxidase, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1158-1160 (1974)
69. Oettl, K., Reibnegger, G., Pteridines as inhibitors of xanthine oxidase: Structural requirements, *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**, 387-395 (1999).
70. Ali, B., Dwivedi, C., Parmar, S. S, Selective Inhibition of Xanthine Oxidase by 3-Hydroxy-1-nitrophenyl-1*H*-pyrazolo[4,3-*c*]pyridines, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 179-182 (1972).
71. Gupta, S., Rodrigues, L. M., Esteves, A. P., Oliveira-Campos, A. M. F., Nascimento, M. S. J., Nazareth, N., Cidade, H., Neves, M. P., Fernandes, E., Pinto, M., Cerqueira, N. M. F. S. A., Brás, N., Synthesis of N-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem*, **43**, 771-780 (2008).
72. Yu, K.-H., Febuxostat: a novel non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase for the treatment of hyperuricemia in gout, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, **1**, 69-75 (2007).
73. Galbusera, C., Orth, P., Fedida, D., Spector, T., Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase, *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 1747-1752 (2006).
74. Ishibuchi, S., Morimoto, H., Oe, T., Ikebe, T., Inoue, H., Fukunari, A., Kamezawa, M., Yamada, I., Naka, Y., Synthesis and structure-activity relationships of 1-phenylpyrazoles as xanthine oxidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 879-882 (2001).
75. Fukunari, A., Okamoto, K., Nishino, T., Eger, B. T., Pai, E. F., Kamezawa, M., Yamada, I., Kato, N., Y-700 [1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1*H*-pyrazole-4-carboxylic acid]: a potent xanthine oxidoreductase inhibitor with hepatic excretion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 519-528 (2004).

76. Nepali, K. *et al.* N-(1,3-Diaryl-3-oxopropyl)amides as a new template for xanthine oxidase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **19**, 5569-5576 (2011).
77. Nepali, K., Singh, G., Turan, A., Agarwal, A., Sapra, S., Kumar, R., Banerjee, U. C., Verma, P. K., Satti, N. K., Gupta, M. K., Suri, O. P., Dhar, K. L., A rational approach for the design and synthesis of 1-acetyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro(1*H*)pyrazoles as a new class of potential non-purine xanthine oxidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 1950-1958 (2011).
78. Sato, T., Ashizawa, N., Matsumoto, K., Iwanaga, T., Nakamura, H., Inoue, T., Nagata, O., Discovery of 3-(3-cyano-4-pyridyl)-5-(4-pyridyl)-1,2,4-triazole, FYX-051-a xanthine oxidoreductase inhibitor for the treatment of hyperuricemia, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **19**, 6225-6229 (2009).
79. Shi, D.-H., Huang, W., Li, C., Liu, Y.-W., Wang, S.-F. Design, synthesis and molecular modeling of aloe-emodin derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **75**, 289-296 (2014).
80. Lin C. M., Chen C. S., Chen C. T., Liang Y. C., Lin, J. K., Molecular modelling of flavonoids that inhibits xanthin oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **294**, 167-172 (2002).
81. Ferrari, A. M., Sgobba, M., Gamberini, M. C., Rastelli, G., Relationship between quantum-chemical descriptors of proton dissociation and experimental acidity constants of various hydroxylated coumarins. Identification of the biologically active species for xanthine oxidase inhibition, *Eur. J. Med. Chem.*, **42**, 1028-1031 (2007).
82. Changa, Y.-C., Leec, F.-W., Chene, C.-S., Huangf, S.-T., Tsaic, S.-H., Huangg, S.-H., Linc, C.-M., Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 1541-1551 (2007).
83. Dundee, J. W., McIlroy, P. D. A., The history of the barbiturates, *Anaesthesia*, **37**, 726-734 (1982).
84. Mahmudov, K. T., Kopylovich, M. N., Maharramov, A. M., Kurbanova, M. M., Gurbanov, A. V., Pombeiro, A. J. L., Barbituric acids as a useful tool for the construction of coordination and supramolecular compounds, *Coord. Chem. Rev.*, **265**, 1-37 (2014).
85. López-Muñoz, F., Ucha-Udabe, R., Alamo, C., The history of barbiturates a century after their clinical introduction, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **1**, 329-343 (2005).
86. Lemke, T. L., Williams, D. A., Sedative-hypnotics, *Foy's Principles of Medicinal*

Chemistry, Wolters Kluwer Helth, 485-507 (2012)

87. Kubinyi, H., A History of Drug Discovery, General Aspects of Medicinal Chemistry, Elsevier Ltd, 3-62 (2008).
88. Moussier, N., Bruché, L., Viani, F., Zanda, M., Fluorinated barbituric acid derivatives: Synthesis and bio-activity, *Curr. Org. Chem.*, **7**, 1071-1080 (2003).
89. Wang, J., Radomski, M. W., Medina, C., Gilmer, J. F., MMP inhibition by barbiturate homodimers, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **23**, 444-447 (2013).
90. Brandstetter, H., Grams, F., Glitz, D., Lang, A., Huber, R., Bode, W., Krell, H. W., Engh, R. A., The 1.8-Å Crystal Structure of a Matrix Metalloproteinase 8-Barbiturate Inhibitor Complex Reveals a Previously Unobserved Mechanism for Collagenase Substrate Recognition, *J. Biol. Chem.*, **276**, 17405-17412 (2001).
91. Balas, V. I., Verginadis, I. I., Geromichalos, G. D., Kourkoumelis, N., Male, L., Hursthouse, M. B., Repana, K. H., Yiannaki, E., Charalabopoulos, K., Bakas, T., Hadjikakou, S. K., Synthesis, structural characterization and biological studies of the triphenyltin(IV) complex with 2-thiobarbituric acid, *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 2835-2844 (2011).
92. Kohlhoff, S. A., Hub, M. D., Hammerschlag, M. R., In vitro activity of AZD0914, a novel DNA gyrase inhibitor, against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 7595-7596 (2014).
93. Kidwai, M., Thakur, R., Mohan, R., Ecofriendly Synthesis of Novel Antifungal (Thio)Barbituric Acid Derivatives, *Synthesis (Stuttg.)*, **52**, 88-92 (2005).
94. Lee, J.-H., Lee, S., Park, M. Y., Myung, H., Characterization of thiobarbituric acid derivatives as inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase, *Virology*, **8**, 1-4 (2011).
95. Biradar, J. S., Sasidhar, B. S., Parveen, R., Synthesis, antioxidant and DNA cleavage activities of novel indole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 4074-4078 (2010).
96. Dhorajjiya, B. D., Dholakiya, B. Z., Green chemistry multi-component approach for *N*-formylation and Knoevenagel condensation for synthesis of thiobarbiturates in aqueous system, *Res. Chem. Intermed.*, **41**, 277-289 (2015).
97. Jursic, B. S., A Simple Method for Knoevenagel Condensation of α,β -Conjugated and Aromatic Aldehydes with Barbituric Acid, *J. Heterocyclic Chem.*, **38**, 655-657 (2001)
98. Deb, M. L., Bhuyan, P. J., Uncatalysed Knoevenagel condensation in aqueous medium at room temperature, *Tetrahedron Lett.*, **46**, 6453-6456 (2005).

99. Figueroa-Villar, J. D., Vieira, A. A., Nuclear magnetic resonance and molecular modeling study of exocyclic carbon-carbon double bond polarization in benzylidene barbiturates, *J. Mol. Struct.*, **1034**, 310-317 (2013).
100. Chen, Z., Cai, D., Mou, D., Yan, Q., Sun, Y., Pan, W., Wan, Y., Song, H., Yi, W., Design, synthesis and biological evaluation of hydroxy- or methoxy-substituted 5-benzylidene(thio) barbiturates as novel tyrosinase inhibitors, *Bioorganic Med. Chem.*, **22**, 3279-3284 (2014).
101. Naguib, F., Levesque, D., 5-Benzylbarbituric acid derivatives, potent and specific inhibitors of uridine phosphorylase, *Biochem. Pharm.*, **46**, 1273-1283 (1993).
102. Tomašić, T., Zidar, N., Mueller-Premru, M., Kikelj, D., Mašič, L. P., Synthesis and antibacterial activity of 5-ylidenethiazolidin-4-ones and 5-benzylidene-4,6-pyrimidinediones, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 1667-1672 (2010).
103. Khan, K. M., Khan, M., Karim, A., Taha, M., Ambreen, N., Gojayev, A., Perveen, S., Choudhary, M. I., Xanthine Oxidase Inhibition by 5-aryledene *N,N'*-dimethylbarbituric Acid Derivatives, *J. Chem. Soc. Pak.*, **35**, 495-498 (2013).
104. Neumann, D. M., Cammarata, A., Backes, G., Palmer, G. E., Jursic, B. S., Synthesis and antifungal activity of substituted 2,4,6-pyrimidinetrione carbaldehyde hydrazones, *Bioorganic Med. Chem.*, **22**, 813-826 (2014).
105. Jursic, B. S., Neumann, D. M., Preparation of 5-formyl- and 5-acetylbarbituric acids, including the corresponding Schiff bases and phenylhydrazones, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 8435-8439 (2001).
106. Sakai, K., Satoh, Y., Barbituric Acid Derivative And Preventive And Therapeutic Agent For Bone And Cartilage Containing The Same, *United States Patent* (2002).
107. Grosscort, A. C., Terpstra, J. W., Barbituric Acid Derivatives Having Insecticidal Activity, *United States Patent* (1992).
108. Kay, I. T., Finchampstead, Peach-cock, F. C., Ascot, Waring, W. S., 5-Acyl Barbituric Acid Derivatives, United States Patent Office (1974).
109. Thokchom, H. S., Nongmeikapam, A. D., Laitonjam, W. S., Synthesis of fused pyrazolo-, isoxazolo-, pyrimido-, and pyridopyrimidines, *Can. J. Chem.*, **83**, 1056-1062 (2005).
110. Faidallah, H. M., Khan, K. A., Synthesis and biological evaluation of new barbituric and thiobarbituric acid fluoro analogs of benzenesulfonamides as antidiabetic and antibacterial agents, *J. Fluor. Chem.*, **142**, 96-104 (2012).

111. Lu, A., Wang, Z., Zhou, Z., Chen, J., Wang, Q., Application of "hydrogen bonding interaction" in new drug development: Design, synthesis, antiviral activity, and sars of thiourea derivatives, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 1378-1384 (2015).
112. Schulte, H., Über die Kondensation des *N,N'*-diphenyl-thioharnstoffes mit Malonylchlorid, *Eur. Journ. Inorg. Chem.*, **87**, 820-824 (1962).
113. Wang, F., Zhao, P., Xi, C., Copper-catalyzed one-pot synthesis of 2-thioxo-2,3-dihydroquinazolin-4(1*H*)-ones from ortho-bromobenzamides and isothiocyanates, *Tetrahedron Lett.*, **52**, 231-235 (2011).
114. Yan, Q., Cao, R., Yi, W., Chen, Z., Wen, H., Ma, L., Song, H., Inhibitory effects of 5-benzylidene barbiturate derivatives on mushroom tyrosinase and their antibacterial activities, *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 4235-4243 (2009).
115. Seyyedi, N., Shirini, F., Nikoo Langarudi, M. S., DABCO-based ionic liquids: green and recyclable catalysts for the synthesis of barbituric and thiobarbituric acid derivatives in aqueous media, *RSC Adv.*, **6**, 44630-44640 (2016).
116. Broschard, W., Meyer, W. E., Williams, R. P., Wolf, C. F., Pidacks, C., Lancaster, J. E., Analgesics. 1. Selected 5-Substituted 5-Propionoxybarbituric Acids, *J. Med. Chem.*, **17**, 732-736 (1974).
117. Biltz, H., Wittek, H., Über alkylierte und acylierte Barbitursäure, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **54**, 1035-1058 (1921).
118. Scarborough, C. H., Pyrano[2,3-*d*]- and Pyrido[2,3-*d*]pyrimidines, *JOC*, **29**, 219-221 (1964).
119. Jursic, B. S., Stevens, E. D., Mono C-alkylation and mono C-benylation of barbituric acids through zinc/acid reduction of acyl, benzylidene, and alkylidene barbiturate intermediates, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2203-2210 (2003).
120. Zhao, M. Zhu, D., Sun-waterhouse, D., Su, G., Lin, L., Wang, X., In Vitro and In Vivo Studies on Adlay-Derived Seed Extracts: Phenolic Profiles, Antioxidant Activities, Serum Uric Acid Suppression, and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects, *J. Agr. Food Chem.*, **62**, 7771-7778 (2014).
121. Hadjipavlou-Litina, D., Samadi, A., Unzeta, M., Marco-Contelles, J., Analysis of the antioxidant properties of differently substituted 2- and 3-indolyl carbohydrazides and related derivatives, *Eur. J. Med., Chem.* **63**, 670-674 (2013).
122. Molyneux, P., The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Technol.*, **26**, 211-219 (2004).

123. Ionita, P., Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?, *Chem. Pap.*, **59**, 11-16 (2005).
124. Beedkar, S. D., Khobragade, C. N., Chobe, S. S., Dawane, B. S., Yemul, O. S., Novel thiazolo-pyrazolyl derivatives as xanthine oxidase inhibitors and free radical scavengers., *Int. J. Biol. Macromol.*, **50**, 947-956 (2012).
125. Nicolaidis, D. N., Gautam, D. R., Litinas, K. E., Hadjipavlou-Litina, D. J., Fylaktakidou, K. C., Synthesis and evaluation of the antioxidant and antiinflammatory activities of some benzo[l]khellactone derivatives and analogues, *Eur. J. Med. Chem.*, **39**, 323-332 (2004).
126. Dzoyem, J. P., McGaw, L. J., Eloff, J. N., In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity, *BMC Complement. Altern. Med.*, **14**, 147 (2014).
127. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., Schubert, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *J. Neurochem.*, **69**, 581-93 (1997).
128. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
129. B-Rao, C. Kulkarni-Almeida, A., Katkar, K. V., Khanna, S., Ghosh, U., Keche, A., Shah, P., Srivastava, A., Korde, V., Nemmani, K. V. S., Deshmukh, N. J., Dixit, A., Brahma, M. K., Bahirat, U., Doshi, L., Sharma, R., Sivaramakrishnan, H., Identification of novel isocytosine derivatives as xanthine oxidase inhibitors from a set of virtual screening hits, *Bioorganic Med. Chem.*, **20**, 2930-2939 (2012).
130. Ali, H. I., Fujita, T., Akaho, E., Nagamatsu, T., A comparative study of AutoDock and PMF scoring performances, and SAR of 2-substituted pyrazolotriazolopyrimidines and 4-substituted pyrazolopyrimidines as potent xanthine oxidase inhibitors, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **24**, 57-75 (2010).
131. Kikuchi, H., Fujisaki, H., Furuta, T., Okamoto, K., Leimkühler, S., Nishino, T., Different inhibitory potency of febuxostat towards mammalian and bacterial xanthine oxidoreductases: insight from molecular dynamics, *Sci. Rep.*, **2**, 331 (2012).
132. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D., Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates, *J. Med. Chem.*, **45**, 2615-2623 (2002).

133. Lipinski, C. A., Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution, *Drug Discov. Today Technol.*, **1**, 337-341 (2004).
134. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **23**, 3-25 (1997).
135. Botsi, S., Tsolomitis, A., One or Two Step Acid Mediated Cyclocondensation Process for the Preparation of 5-Carboxy-2-thiouracils from Diethyl Ethoxymethylenemalonate and thioureas, *Heterocyclic Communications*, **13**, 229-234 (2007)

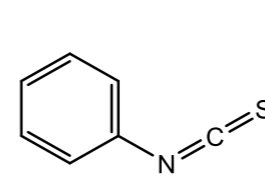
7. Publicações

Comunicação, na forma de poster, no âmbito desta dissertação

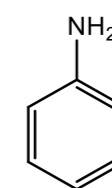
Figueiredo J., Almeida P., Silvestre S., Development of 5-functionalized (thio)barbiturate derivatives as potential xanthine oxidase inhibitors, Abstracts book do XI Annual CICS-UBI Symposium (2016) 123 (anexo 4)

8. Anexos

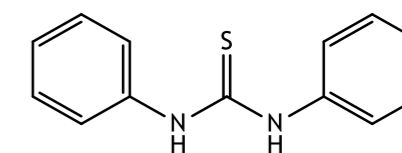
Anexo 1 - Auxiliar de estruturas dos compostos 1-7c.



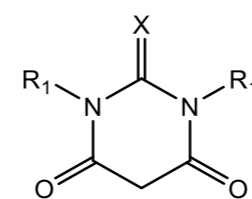
1



2



3



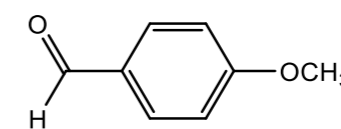
4 a-d

4a X=S; R₁=Ph

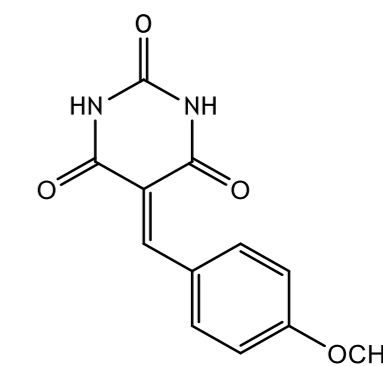
b X=O; R₁=H

c X=O; R₁=CH₃

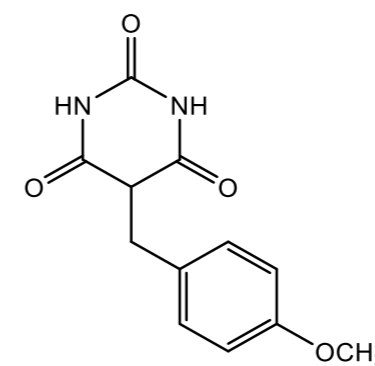
d X=S; R₁=H



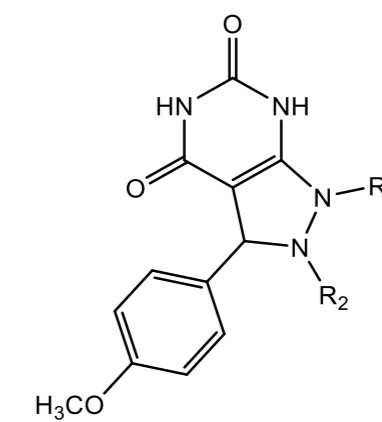
5



6a



6b



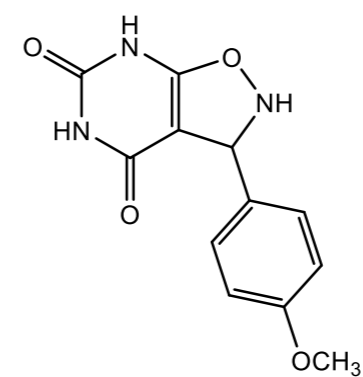
7a-c

7a R₁ = R₂ = H

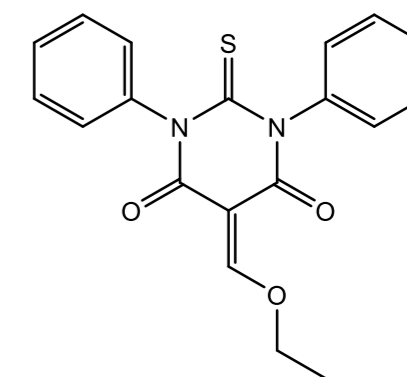
b R₁ = Ph; R₂ = H

c R₁ = R₂ = CH₃

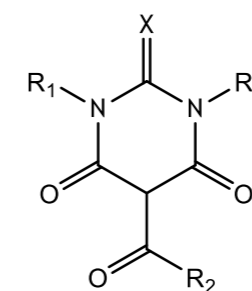
Anexo 2 - Auxiliar de estruturas dos compostos 7d-10n.



7d

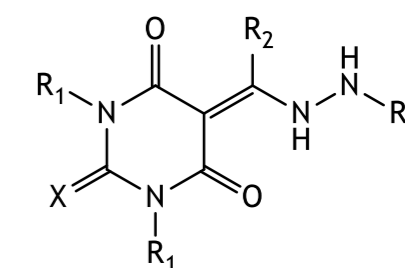


8a



9 a-i

- 9a X=O; R₁=H; R₂=CH₃
 b X=O; R₁=CH₃; R₂=CH₃
 c X=S; R₁=Ph; R₂=CH₃
 d X=O; R₁=H; R₂=Ph
 e X=S; R₁=H; R₂=CF₃
 f X=S; R₁=H; R₂=CH₃
 g X=O; R₁=H; R₂=CF₃
 h X=O; R₁=CH₃; R₂=CF₃
 i X=S; R₁=Ph; R₂=CF₃



10a-n

- 10a X=O; R₁=H; R₂=CH₃; R₃=4-NO₂C₆H₄
 b X=O; R₁=CH₃; R₂=CH₃; R₃=4-NO₂C₆H₄
 c X=S; R₁=Ph; R₂=CH₃; R₃=4-NO₂C₆H₄
 d X=O; R₁=H; R₂=CH₃; R₃=2,4-NO₂C₆H₃
 e X=O; R₁=CH₃; R₂=CH₃; R₃=2,4-NO₂C₆H₃
 f X=O; R₁=H; R₂=CH₃; R₃=C₆H₅
 g X=O; R₁=CH₃; R₂=CH₃; R₃=C₆H₅
 h X=S; R₁=Ph; R₂=CH₃; R₃=C₆H₅
 i X=O; R₁=H; R₂=CH₃; R₃=H
 j X=S; R₁=Ph; R₂=CH₃; R₃=H
 k X=O; R₁=CH₃; R₂=CH₃; R₃=H
 l X=S; R₁=H; R₂=CF₃; R₃=H
 m X=S; R₁=H; R₂=CF₃; R₃=4-NO₂C₆H₄
 n X=S; R₁=H; R₂=CF₃; R₃=C₆H₅

Anexo 3 - Ficheiro "AD4_Parameters.dat"

(cedido pelo Dr. Renjith Raveendran Pillai do *TKM College of Arts and Science*, India)

```
# $Id: AD4_parameters.dat,v 1.4 2005/10/31 18:36:45 rhuey Exp $
# AutoDock Parameters - Version 1.0

#
# AutoDock 4 coefficient with respect to original (AD2) parameters
#

FE_coeff_vdW 0.1560
FE_coeff_hbond 0.0974
FE_coeff_estat 0.1465
FE_coeff_desolv 0.1159
FE_coeff_tors 0.2744

# - Unweighted vdW and Unweighted hbond Well Depths
#
# - To obtain the Rij value for non H-bonding atoms, calculate the
# arithmetic mean of the Rii values for the two atom types.
#
# - To obtain the epsij value for non H-bonding atoms, calculate the
# geometric mean of the epsii values for the two atom types.
#
# - Note that the Rij_hb value is non-zero for heteroatoms only, and
# zero for H atoms;
# to obtain the Rij_hb for an H-bond, look up for the heteroatom only;
# do not combine Rij_hb values between heteroatoms and hydrogens;
# Similarly, for epsij_hb values.
#
# For example, the Rij_hb for OA-HD H-bonds will be 1.9 Angstrom,
# and epsij_hb will be 5.0 kcal/mol.
#
# Rii Rij_hb rec_index
# Atom epsii solpar epsij_hb map_index
# Type vol hbond bond_index
# - - - - -
atom_par C 4.00 0.150 33.5103 -0.00143 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
atom_par A 4.00 0.150 33.5103 -0.00052 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
atom_par N 3.50 0.160 22.4493 -0.00162 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par NA 3.50 0.160 22.4493 -0.00162 1.9 5.0 4 -1 -1 1 # Acceptor 1 H-bond
atom_par NS 3.50 0.160 22.4493 -0.00162 1.9 5.0 3 -1 -1 1 # Acceptor S Spherical
atom_par OA 3.20 0.200 17.1573 -0.00251 1.9 5.0 3 -1 -1 2 # Acceptor 2 H-bonds
atom_par OS 3.20 0.200 17.1573 -0.00251 1.9 5.0 3 -1 -1 2 # Acceptor S Spherical
atom_par SA 4.00 0.200 33.5103 -0.00214 2.5 1.0 5 -1 -1 6 # Acceptor 2 H-bonds
atom_par S 4.00 0.200 33.5103 -0.00214 0.0 0.0 0 -1 -1 6 # Non H-bonding
atom_par H 2.00 0.020 0.0000 0.00051 0.0 0.0 0 -1 -1 3 # Non H-bonding
atom_par HD 2.00 0.020 0.0000 0.00051 0.0 0.0 2 -1 -1 3 # Donor 1 H-bond
atom_par HS 2.00 0.020 0.0000 0.00051 0.0 0.0 1 -1 -1 3 # Donor S Spherical
atom_par P 4.20 0.200 38.7924 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 5 # Non H-bonding
atom_par Br 4.33 0.389 42.5661 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par BR 4.33 0.389 42.5661 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par Ca 1.98 0.550 2.7700 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par CA 1.98 0.550 2.7700 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par Cl 4.09 0.276 35.8235 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par CL 4.09 0.276 35.8235 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par F 3.09 0.080 15.4480 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par Fe 1.30 0.010 1.8400 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par FE 1.30 0.010 1.8400 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par I 4.72 0.550 55.0585 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par Mg 1.30 0.875 1.5600 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
```

atom_par MG 1.30 0.875 1.5600 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
 atom_par Mn 1.30 0.875 2.1400 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
 atom_par MN 1.30 0.875 2.1400 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
 atom_par Zn 1.48 0.550 1.7000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
 atom_par ZN 1.48 0.550 1.7000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
 atom_par He 2.36 0.056 15.240 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
 atom_par Li 2.45 0.025 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Be 2.76 0.085 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par B 4.08 0.180 12.052 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
 atom_par Ne 3.24 0.042 15.440 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
 atom_par Na 3.98 0.030 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Al 4.49 0.505 11.278 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Si 4.30 0.402 12.175 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par K 3.81 0.035 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Sc 3.30 0.019 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ti 3.18 0.017 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par V 3.14 0.016 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Co 2.87 0.014 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ni 2.83 0.015 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Cu 3.50 0.005 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ga 4.38 0.415 11.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ge 4.28 0.379 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par As 4.23 0.309 13.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Se 4.21 0.291 14.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Kr 4.14 0.220 16.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Rb 4.11 0.040 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
 atom_par Sr 3.64 0.235 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
 atom_par Y 3.35 0.072 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Zr 3.12 0.069 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Nb 3.17 0.059 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Mo 3.05 0.056 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Tc 3.00 0.048 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ru 2.96 0.056 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Rh 2.93 0.053 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Pd 1.34 0.048 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ag 3.15 0.036 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Cd 2.85 0.228 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par In 4.46 0.599 11.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Sn 4.39 0.567 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Sb 4.42 0.449 13.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Te 4.47 0.398 14.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Xe 4.40 0.332 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Cs 4.52 0.045 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
 atom_par Ba 3.70 0.364 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
 atom_par La 3.52 0.017 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ce 3.56 0.013 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Pr 3.61 0.010 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Nd 3.58 0.010 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Pm 3.55 0.009 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Sm 3.52 0.008 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Eu 3.49 0.008 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Gd 3.37 0.009 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Tb 3.45 0.007 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Dy 3.43 0.007 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ho 3.41 0.007 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Er 3.39 0.007 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Tm 3.37 0.006 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Yb 3.36 0.228 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Lu 3.64 0.041 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Hf 3.41 0.072 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ta 3.71 0.081 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par W 3.07 0.067 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Re 2.95 0.066 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Os 3.12 0.120 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Ir 2.84 0.073 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
 atom_par Pt 2.75 0.080 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding

atom_par Au 3.29 0.039 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Hg 2.71 0.385 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Tl 4.35 0.680 11.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pb 4.30 0.663 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Bi 4.37 0.518 13.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Po 4.71 0.325 14.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par At 4.75 0.284 15.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Rn 4.77 0.248 16.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Fr 4.90 0.050 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
atom_par Ra 3.68 0.404 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
atom_par Ac 3.48 0.033 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Th 3.40 0.026 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pa 3.42 0.022 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par U 3.40 0.022 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Np 3.42 0.019 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pu 3.42 0.016 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Am 3.38 0.014 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Cm 3.33 0.014 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Bk 3.34 0.013 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Cf 3.31 0.013 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par E 3.30 0.012 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Fm 3.29 0.012 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding

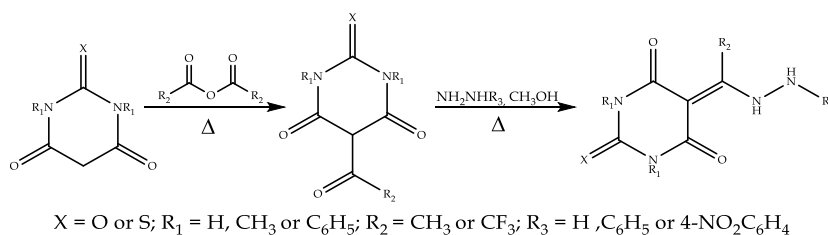
Anexo 4 - Comunicação na forma de poster no âmbito desta dissertação

Development of 5-functionalized (thio)barbiturate derivatives as potential xanthine oxidase inhibitors

Figueiredo J. ¹, Almeida P. ¹, Silvestre S. ¹

¹ CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal;

Xanthine oxidase (XO) is an important and versatile molybdoflavoprotein, acting mainly in the liver and in the intestine. This enzyme is involved in the purines metabolism, catalyzing the transformation of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid, with concomitant production of reactive oxygen species (ROS), which are involved in different pathologies [1]. In addition, high levels of uric acid can lead to gout, a disease usually controlled using the drug allopurinol, which is considered the prototype XO inhibitor. However, the use of this clinical drug is associated with relevant adverse effects and to the inability to prevent the formation of free radicals by XO, which has led to the search of new inhibitors of this enzyme [2]. Thus, in the present work, several 5-hydrazinylmethylenepyrimidine derivatives and analogues were prepared and characterized from (thio)barbituric acid derivatives as potential XO inhibitors and molecular docking studies were effected.



The XO inhibitory activity and the antioxidant and cell proliferation effects of the synthesized compounds will also be evaluated.

Keywords: Xanthine Oxidase, Allopurinol analogues, 5-Hydrazinylmethylenepyrimidines, Molecular docking

References:[1] Kumar R. et al. *Expert Opin. Ther. Patents* 2011, 21, 1071-1108. [2] Pacher P. et al. *Pharmacol Rev* 2006, 58, 87-114.

Acknowledgements: This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalisation in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project No. 007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709).