



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

**Novos espiro(tio)barbituratos:
Síntese, caracterização estrutural e avaliação biológica.**

João Paulo Lourenço Serrano

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

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

Covilhã, outubro de 2016

“I have tried 99 times and have failed, but on the 100th time came success.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Paulo Almeida, e ao meu co-orientador, o Professor Doutor Samuel Silvestre. Foi um privilégio poder partilhar o tempo deste trabalho de dissertação com pessoas que conseguem conciliar a sabedoria com a transmissão da mesma. Em especial ao “chefe” pela paciência para ouvir todas as minhas propostas descabidas, pela compreensão, confiança e especialmente pela dedicação e amizade.

Um grande obrigado à Doutora Susana Ferreira por todo o tempo disponibilizado, tanto na elaboração dos ensaios antibacterianos como nas explicações dos mesmos.

Apesar de não ter estado presente durante o tempo em que decorreu este trabalho de dissertação, um obrigado muito especial à Doutora Susana Ramos pela ajuda na minha integração no laboratório de síntese orgânica, por toda a sua boa disposição, pela compreensão e pelo conhecimento transmitido.

Ao Professor Doutor Renato Boto um obrigado pela boa disposição, pelo conhecimento por ele transmitido e por toda a ajuda, principalmente na ressonância magnética.

Às Professoras Doutoradas Maria João Nunes e Sílvia Nunes pelo apoio no laboratório.

Ao Doutor Renjith Raveendran Pillai do *TKM College of Arts and Science*, na Índia, por gentilmente ceder alguns parâmetros imprescindíveis à realização dos estudos de Docking molecular.

À D. Dulce, ao Sr. João e ao Eng. João, um obrigado pela paciência e disponibilidade demonstradas no dia-a-dia.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o terminar desta etapa, em particular a todos os que partilharam o laboratório de síntese química e o CICS comigo. Claramente se destacam a Mafalda, o João Marques e mais recentemente a Joana por todos os bons momentos partilhados no laboratório. Todos os momentos de riso faziam esquecer os insucessos, levantando a cabeça para os próximos desafios. Terão, sem dúvida, um lugar especial sempre guardado para vós.

Por último, mas sem dúvida o mais importante, quero agradecer a toda a minha família, em especial à minha mãe e à Daniela por toda a cumplicidade e por todos os “sacrifícios” que fizeram para que tudo isto se pudesse concretizar. Apesar de todas as adversidades, nunca deixaram de me dar força e de me apoiar em todas as decisões difíceis.

Resumo

Ao longo dos anos, o principal foco do desenvolvimento de fármacos tem-se em encontrar moléculas mais seguras e efetivas. Neste panorama, a química medicinal demonstrou ser uma área-chave e fundamental para este desenvolvimento. O aparecimento dos métodos computacionais e de *screening* de alto rendimento permitiram o encurtar do tempo de investigação de novas entidades químico-farmacológicas, sendo o *docking* molecular um dos principais responsáveis.

O ácido (tio)barbitúrico e seus derivados, conhecidos de uma maneira geral por barbituratos, constituem uma estrutura base importante no desenvolvimento de novos fármacos, os quais são principalmente conhecidos como depressores do sistema nervoso central. O seu anel pirimidínico permite diversas substituições em N1, N3, C2 e, principalmente, em C5. Estas últimas têm desempenhado um papel importante no desenvolvimento de fármacos de sucesso na indústria farmacêutica, como é o caso do fenobarbital e mais recentemente do AZD0914, o qual tem vindo a demonstrar elevadas potencialidades ao nível da ação antibacteriana.

No decorrer da investigação deste trabalho de dissertação, em que se pretendia obter novos barbituratos com um segundo anel fundido nas posições 5 e 6 do anel pirimidínico, verificou-se a formação de um produto inesperado durante a redução de 2-nitroarilidenobarbituratos. Desta forma, é aqui proposta e desenvolvida uma nova via sintética para a obtenção de uma nova classe de espiro(tio)barbituratos, nomeadamente espiro-3-hidroxoindóis e espiro-3-oxoindolinas. As estruturas dos novos compostos foram confirmadas após a sua caracterização estrutural tendo como base o mecanismo reacional aqui proposto.

Adicionalmente, os espiro(tio)barbituratos sintetizados foram testados *in vitro* como inibidores da xantina oxidase, e as suas potenciais propriedades antioxidantes e antibacterianas, e ainda antiproliferativas na linha celular do cancro da mama, foram também avaliadas. Dos resultados obtidos, destaca-se uma das espiroindolinas que apresenta algum potencial como inibidor seletivo da xantina oxidase (concentração inibitória para metade da atividade máxima de 8,07 μM), sendo contudo, necessário uma avaliação futura dos seus parâmetros cinéticos e mecanísticos de inibição desta enzima, bem como a preparação de novos análogos para um melhor entendimento da respetiva relação estrutura-atividade.

Palavras-chave

Espiro(tio)barbituratos; 3-hidroxoindóis; 3-oxoindolinas; síntese e caracterização estrutural; xantina oxidase

Abstract

Over the years, the main focus of drug development has been to find safer and more effective drugs. In this scenario, medicinal chemistry proved to be a key area to this development. The appearance of computational methods and high-throughput screening became possible the shortening of research time into new chemical and pharmacological entities, where molecular docking is a major contributor.

The (thio)barbituric acid and his derivatives, generally known for barbiturates, are an important backbone in the development of new drugs, which are mainly known as depressants of the central nervous system. Its pyrimidine ring allows various substitutions in N1, N3, C2, and especially C5. The latter have played an important role in the development of successful drugs in the pharmaceutical industry, such as phenobarbital and more recently AZD0914, which has shown high potential level of antibacterial activity.

During the investigation of this dissertation, which was intended to obtain new barbiturates with a second ring fused in the carbon 5 and 6 positions of the pyrimidine ring, happened the formation of an unexpected product during the reduction of 2-nitroarilidenobarbiturates. Thus, it is here proposed and developed a new synthetic route for obtaining a new class of spiro (thio) barbiturates, including spiro-3-hidroxoindoles and spiro-3-oxoindolines. Structures of novel compounds were confirmed after its structural characterization based on the reaction mechanism proposed here.

Additionally, spiro(thio)barbiturates have been synthesized and tested *in vitro* as xanthine oxidase inhibitors and their potential antioxidant and antibacterial, and still their antiproliferative properties in the breast cancer cell line were also evaluated. From the results, there is one of spiroindolines that has some potential as a selective inhibitor of xanthine oxidase (inhibitory concentration for half maximal activity of 8.07 mM); however is necessary further evaluation of its kinetic parameters and inhibition mechanistic for this enzyme, as well as preparation of new analogues for a better understanding of the respective structure-activity relationship.

Keywords

Spiro(thio)barbiturates; 3-hydroxindoles; 3-oxoindolines; synthesis and structural characterization; xanthine oxidase

Índice

Capítulo 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 de propriedades ADMET	5
1.1.2 Ensaio <i>in vitro</i> da XO e atividade antioxidante	7
1.2 Barbituratos	9
1.3 Funcionalizações em C5.....	11
1.3.1 5,5-Dissubstituídos	12
1.3.2 Espirobarbituratos	13
1.3.2.1 Espirociclopenta[(di)e]nos (espiros com anéis de 5 sem heteroátomos).....	14
1.3.2.2 Espiroindanos, espiroindenos e espirociclopentaquinolinas (espiros com anéis de 5 sem heteroátomos com anéis B ou B e C)	17
1.3.2.3 Espironucleósidos e espirofuranos (espiros com anéis de 5 com oxigénio)	19
1.3.2.4 Espirofuranos fundidos com ácidos (tio)barbitúricos e espirodioxolopiranos derivados da galactopirranose (espiros com anéis de 5 com oxigénio e anel B)	20
1.3.2.5 Espiropirrolidinas e espirotetrahidropirrolotiazóis (espiros com anéis de 5 com azoto, na presença ou não de anel B)	23
1.3.2.6 Espirobenzopirrolotiazóis (espiros com anéis de 5 com azoto e anel B e C) ..	24
1.3.2.7 Espiropirazóis (espiros com anéis de 5 com dois azotos)	24
1.3.3 Ciclizações em C5-C6	25
1.4 Objetivos	27
Capítulo 2 - Resultados e Discussão	28
2.1 Síntese	29
2.1.1 Ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico	30
2.1.2 5-Benzilidenopirimidinas	32
2.1.3 5-Fenilaminometilenopirimidinas.....	33
2.1.4 5-Fenilcianometilpirimidinas	38
2.1.5 Pirimidodiazepinas	43
2.1.6 Pirrolopirimidinas.....	49
2.1.7 Pirimidoxazepinas	50
2.1.8 Pirimidoespiroindóis	51
2.1.9 Pirimidoespiroindolinas.....	55
2.2 Avaliação biológica	58
2.2.1 Atividade antibacteriana	59
2.2.2 Determinação <i>In Vitro</i> da atividade inibitória da XO	59
2.2.3 Atividade antioxidante - ensaio DPPH	62
2.2.4 Atividade antiproliferativa.....	64
2.2.5 REA.....	65

2.3	Estudos <i>In Silico</i>	67
2.4	Conclusões e perspectivas futuras.....	73
Capítulo 3 - Parte experimental		74
3.1	Síntese	75
3.1.1	Precusores	76
3.1.1.1	5-Benzilidenopirimidinas	77
3.1.1.2	5-Fenilaminometilenopirimidinas	79
3.1.1.3	5-Fenilcianometilpirimidinas	84
3.1.2	Pirimidodiazepinas	85
3.1.3	Pirrolopirimidinas.....	89
3.1.4	Pirimidoxazepinas	89
3.1.5	Pirimidoespiroindóis	90
3.1.6	Pirimidoespiroindolinas.....	92
3.2	Avaliação biológica	94
3.2.1	Tratamento estatístico	94
3.2.2	Atividade antibacteriana	94
3.2.3	Determinação <i>In Vitro</i> da atividade inibitória da XO	94
3.2.3.1	Preparação das soluções dos compostos.....	94
3.2.3.2	Procedimento experimental	94
3.2.4	Atividade antioxidante - ensaio DPPH	95
3.2.4.1	Preparação das soluções dos compostos.....	95
3.2.4.2	Procedimento experimental	95
3.2.5	Atividade anti-proliferativa.....	96
3.2.5.1	Culturas celulares.....	96
3.2.5.2	Preparação das soluções dos compostos.....	96
3.2.5.3	Ensaio de viabilidade celular (ensaio de MTT)	96
3.3	Estudos <i>in-silico</i>	97
3.3.1	Docking molecular.....	97
3.3.2	Predição das atividade biológicas por PASS.....	98
3.3.3	Predição das propriedades farmacocinéticas.....	98
Capítulo 4 - Referências		99
Capítulo 5 - Publicações		113
	Comunicações orais no âmbito desta dissertação	114
	Comunicações orais fora do âmbito desta dissertação	114
	Comunicações em painel fora do âmbito desta dissertação	114
Capítulo 6 - Anexos		115
	Anexo 1 - Auxiliar de estruturas dos compostos 1-9	116
	Anexo 2 - Auxiliar de estruturas dos compostos 10-15	117
	Anexo 3 - Auxiliar de estruturas dos compostos 16-19	118
	Anexo 4 - Ficheiro "AD4_Parameters.dat"	119

Anexo 5 - Dados de Raio-X para a espiroindolina 18a	122
Anexo 6 - Dados complementares relativos aos ensaios biológicos	128
Anexo 7 - Resumo da comunicação oral apresentada no âmbito desta dissertação	129
Anexo 8 - Resumo da comunicação oral apresentada fora do âmbito desta dissertação ...	130
Anexo 9 - Resumo da comunicação em painel apresentada fora do âmbito desta dissertação	131
Anexo 10 - Resumo da comunicação em painel apresentada fora do âmbito desta dissertação	132

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Morfina, papaverina, cocaína, ácido barbitúrico e ácido acetilsalicílico. Da esquerda para a direita e de cima para baixo, respetivamente.....	3
Figura 1.2 - Talidomida.	4
Figura 1.3 - Resumo do método de encaixe molecular (docking). Adaptado de de Ruyck <i>et al.</i> ¹⁵	6
Figura 1.4 - Alopurinol e febuxostat.	8
Figura 1.5 - Mefobarbital, fenobarbital, amobarbital, butobarbital, talbutal, pentobarbital, secobarbital, metohexital e tiopental. Da esquerda para a direita e de cima para baixo, respetivamente.	10
Figura 1.6 - Barbituratos espirocíclicos com atividades biológicas anticonvulsivantes ⁵⁹ e antibacterianos, ^{60, 61} da esquerda para a direita, respetivamente.	13
Figura 1.7 - Divisão dos anéis para os espiro barbituratos.	14
Figura 1.8 - Espirofurano com trímero de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico. ⁷⁷	21
Figura 1.9 - Espiropirrolidina inibidora seletiva da MMP-13. ⁹¹	23
Figura 1.10 - AR-C155858 e AR-C117977 descritos e patenteados como inibidores da MCT4. ¹⁰⁴	27
Figura 2.1 - A - Proposta de Teimouri <i>et al.</i> ¹¹⁴ para pontes de hidrogénio intramoleculares em 5-fenilaminometilenopirimidinas; B - Simulação da distância entre o hidrogénio amino e o oxigénio do carbonilo da 5-fenilaminometilenopirimidina 8a , através do <i>software</i> ChemBioDraw 3D da Cambridge Software.	37
Figura 2.2 - Pirimidodiazepina 10c . Identificação do grupo substituinte volumoso a tracejado.	48
Figura 2.3 - Estrutura da pirimidoespiroindolina 18a por Raio-X. A - <i>Orted plot</i> , B - Distribuição das moléculas na rede cristalina e respetivas pontes de hidrogénio estabilizadoras.....	58
Figura 2.4 - REA das 5-fenilaminometilenopirimidinas para a atividade inibitória da XO e atividade antiproliferativa.	66
Figura 2.5 - REA dos pirimidoespiroindóis e pirimidoespiroindolinas para a atividade inibitória da XO e atividade antiproliferativa.	66
Figura 2.6 - Interações por pontes de hidrogénio dos vários ligandos com a enzima XO. A - Y-700, B - alopurinol, C - pirimidoespiroindolina 18a	68
Figura 2.7 - Localização a três dimensões dos vários ligandos no sítio ativo da enzima XO. A - Y-700, B - alopurinol, C - pirimidoespiroindolina 18a	69

Lista de Esquemas

Esquema 1.1 - Processo catalisado pela XO. Adaptado de Kostic <i>et al.</i> ²²	7
Esquema 1.2 - Radical DPPH (difencilpicril-hidrazilo) e respetiva forma reduzida (difencilpicril-hidrazina).	9
Esquema 1.3 - Formação do ácido barbitúrico a partir do ácido malónico e ureia.	9
Esquema 1.4 - Formação do ácido barbitúrico a partir do malonato de dietilo e ureia.	9
Esquema 1.5 - Síntese geral para os barbituratos 5,5-dissubstituídos patentes na figura 1.5, a partir do derivado de malonato de dietilo e (tio)ureia.	13
Esquema 1.6 - Síntese de espirociclopentanos pelas diferentes vias sintéticas descritas na literatura a partir do éster de ciclopentano-1,1-dicarboxílico, ^{62, 66} ácido barbitúrico ^{64, 65} ou barbitúrico 5,5-dialilo. ⁶⁷	15
Esquema 1.7 - Síntese de espirociclopentenos por uma RCM do barbitúrico 5,5-dialilo. ⁶⁸	16
Esquema 1.8 - Síntese dos espirociclopentadienos por adição <i>in situ</i> do diacilacetileno à 5-benzilidenopirimidina intermediária, na presença de trifenilfosfina. ⁷⁰	17
Esquema 1.9 - Síntese de pirimidoespiroindanos pelas diferentes vias sintéticas descritas na literatura a partir do 1,2-bis(bromometil)benzeno ⁶⁴ ou do barbiturato 5,5-diino com o 2-butino-1,4-diol. ⁷¹	17
Esquema 1.10 - Síntese de pirimidoespiroindenos pelas diferentes vias sintéticas descritas na literatura a partir da reação do 5-fenilbarbiturato com o acetato de non-2-en-4-in-1-ilo, ⁷² ou do ácido barbitúrico com os ésteres derivados do ácido cafeico. ⁷³	18
Esquema 1.11 - Síntese de pirimidoespirociclopentaquinolinas por reação da 1,7-enamina. ⁷⁴	19
Esquema 1.12 - Síntese do pirimidoespiro nucleósido por bromação do triálcool. ⁶⁶	20
Esquema 1.13 - Síntese de pirimidoespirofuranos a partir do ácido barbitúrico, uma amina e um acetileno dicarboxilato em meio básico e diclorometano ⁷⁵ ou água. ⁷⁶	20
Esquema 1.14 - Síntese geral dos espirofuranos com dímeros de ácido barbitúrico a partir de aldeídos ou cetonas.	21
Esquema 1.15 - Síntese de dioxolopiranos derivados da galactopiranose a partir da reação desta com o ácido barbitúrico 5,5 dibromado. ⁸⁸	22
Esquema 1.16 - Síntese de espiropirrolidinas a partir de uma ureia monossubstituída e do derivado de malonato de dietilo. ⁹¹	23
Esquema 1.17 - Síntese de espiropirrolidinas a partir de um 5-arilideno, uma 1,2-dicetona e sarcosina.	24
Esquema 1.18 - Síntese de espirobenzopirrolotiazóis por uma MCR, a partir do ácido barbitúrico, um éster acetilénico e o 2-metilbenzotiazole. ⁹⁵	24
Esquema 1.19 - Síntese dos espiros 2,3 e 3,4-diaza a partir do 5-benzilideno e das nitriliminas.	25

Esquema 1.20 - Síntese de pirimidopirimidinas, pirazolopirimidinas ou isoxasolopirimidinas a partir de 5-metilidenopirimidinas e respetiva diamina ou hidroxilamina.	26
Esquema 1.21 - Síntese de piridinopirimidinas a partir da reação com um 2-oxoaldeído. ¹⁰³ .	26
Esquema 2.1 - Síntese do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a).	30
Esquema 2.2 - Síntese das 5-benzilidenopirimidinas 6	32
Esquema 2.3 - Síntese das 5-fenilaminometilenopirimidinas 8a-b e respetiva representação dos intermediários sintéticos 7a-b	35
Esquema 2.4 - Síntese das 5-fenilaminometilenopirimidinas 8c-k por MCR dos ácidos (tio)barbitúricos 4a-d , as anilinas 2c-g e <i>o</i> -formiato de trietilo em butan-1-ol	36
Esquema 2.5 - Síntese das 5-fenilcianometilenopirimidinas 9a-b	42
Esquema 2.6 - Tentativa de síntese da pirimidodiazepina 10a , a partir da 5-benzilidenopirimidina 6a e da <i>o</i> -fenilenodiamina (2b), de acordo com as condições reacionais a) ou b). a) ácido acético/etanol; b) ácido acético/ <i>Downtherm A</i>	45
Esquema 2.7 - Mecanismo reacional proposto por Zoorob <i>et al.</i> explicativo do insucesso reacional na formação de pirimidodiazepinas a partir de 5-arilidenopirimidinas (6) e da <i>o</i> -fenilenodiamina (2b). ^{Adaptado de 121}	46
Esquema 2.8 - Tentativa de síntese da pirimidodiazepina 10b , a partir da 5-benzilidenopirimidina 6a e da etilenodiamina (13), de acordo com as condições reacionais a) ou b). a) AcOH/etanol; b) AcOH/ <i>Downtherm A</i>	47
Esquema 2.9 - Tentativa de síntese da pirimidodiazepina 10c por MRC, a partir do ácido tiobarbitúrico (4b), da <i>o</i> -fenilenodiamina (2b) e do benzaldeído 5c	47
Esquema 2.10 - Tentativa de síntese das pirimidodiazepinas 10d-e por ciclização das 5-fenilaminometilenopirimidinas 8a-b , de acordo com as condições reacionais a) - j). a) AcOH/butan-1-ol; b) AcOH (10% mol/mol)/butan-1-ol; c) HCl (10% mol/mol)/butan-1-ol; d) TsOH (10% mol/mol)/butan-1-ol; e) DCC/butan-1-ol; f) AcOH/DMF; g) AcOH (10% mol/mol)/DMF; h) HCl (10% mol/mol)/DMF; i) TsOH (10% mol/mol)/DMF; j) DCC/DMF; k) AcOH/ <i>Downtherm A</i> ; l) AcOH (10% mol/mol)/ <i>Downtherm A</i> ; m) HCl (10% mol/mol)/ <i>Downtherm A</i> ; n) TsOH (10% mol/mol)/ <i>Downtherm A</i> ; o) DCC/ <i>Downtherm A</i>	48
Esquema 2.11 - Tentativa de síntese das pirimidodiazepinas 10f-g , a partir das 5-fenilcianometilpirimidinas 9a-b e da ureia (14), de acordo com as condições reacionais a) a c). a) Trietilamina (10% mol/mol)/etanol; b) TsOH (10% mol/mol)/etanol; c) Fe(NO ₃) ₃ ·H ₂ O (10% mol/mol)/etanol.	49
Esquema 2.12 - Tentativa de síntese da pirrolopirimidina 15 , por redução da 5-fenilcianometilpirimidina 9b	50
Esquema 2.13 - Tentativa de síntese das pirimidoxazepinas 16a-b , por aquecimento das 5-fenilaminometilenopirimidinas 9c-d em <i>Downtherm A</i>	50
Esquema 2.14 - Síntese dos pirimidoespiroindóis 17a-d por redução de cloreto de estanho em ácido clorídrico e metanol das 5-benzilidenopirimidinas 6b-e . Não se verificou a formação de pirimidoquinolinas.	51
Esquema 2.15 - Síntese das pirimidoespiroindolina 18a	55
Esquema 2.16 - Síntese da pirimidoespiroindolina 18a	55

Esquema 2.17 - Mecanismo reacional proposto para a formação dos pirimidoespiroindóis **17** e da pirimidoespiroindolina **18a**. Não se verificou a formação da quinolina esperada. 56

Esquema 2.18 - Redução do MTT a formazano pela redutase mitocondrial. 64

Lista de gráficos

Gráfico 2.1 - Curva de calibração para o ácido úrico a 295 nm com respetiva equação da reta e erro quadrado. 60

Gráfico 2.2 - Percentagem de inibição da enzima XO em relação ao controlo por parte dos compostos alopurinol, **8a**, **8c-k**, **9a-b**, **17a-d**, **18a-b** a uma concentração de 30µM. Para os compostos em que é especificada a percentagem de redução, foram realizadas curvas de concentração-resposta. 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). 60

Gráfico 2.3 - Percentagem de inibição da enzima XO em função do tempo de reação decorrido para os compostos alopurinol, **17b-d** e **18a** a uma concentração de 30µM. 61

Gráfico 2.4 - Percentagem de redução do radical DPPH em relação ao controlo por parte dos compostos trolox, alopurinol, **8a**, **8c-k**, **10a-b**, **18a-d**, **19a-b** a uma concentração de 30µM, aos 20 e 60 minutos de exposição. Para os compostos em que é especificada a percentagem de redução, foram realizadas curvas de concentração-resposta. 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). 63

Gráfico 2.5 - Percentagem relativa de proliferação celular em células MCF-7 após 72 horas de exposição aos compostos 5-Fu, **8a**, **8c-k**, **9a-b**, **17a-d**, **18a-b** a uma concentração de 30µM. 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). 65

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para a tiourea 3 e ácido tiobarbitúrico 4a	30
Tabela 2.2 - RMN de ¹ H da tiourea 3 e ácido tiobarbitúrico 4a	31
Tabela 2.3 -RMN de ¹³ C da tiourea 3 e ácido tiobarbitúrico 4a	31
Tabela 2.4 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para as 5-benzilidenopirimidinas 6a-e	33
Tabela 2.5 - RMN de ¹ H das 5-benzilidenopirimidinas 6a-e	34
Tabela 2.6 -RMN de ¹³ C das 5-benzilidenopirimidinas 6a-e	34
Tabela 2.7 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para as 5-fenilaminometilenopirimidinas 8a-k	37
Tabela 2.8 - RMN de ¹ H das 5-fenilaminometilenopirimidinas 8a-e	39
Tabela 2.9 - RMN de ¹³ C das 5-fenilaminometilenopirimidinas 8a-b	39
Tabela 2.10 - RMN de ¹³ C das 5-fenilaminometilenopirimidinas 8c-k	40
Tabela 2.11 - RMN de ¹ H das 5-fenilaminometilenopirimidinas 8f-k	41
Tabela 2.12 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para as 5-fenilcianometilpirimidinas 9a-b	42
Tabela 2.13 -RMN de ¹ H das 5-fenilcianometilpirimidinas 9a-b	43
Tabela 2.14 -RMN de ¹³ C das 5-fenilcianometilpirimidinas 9a-b	43
Tabela 2.15 - Resumo das tentativas efetuadas para a síntese das pirimidodiazepinas 10a-g , demonstrando os reagentes, condições reacionais e o resultante obtido da mistura reacional.	44
Tabela 2.16 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os compostos 17a-d	52
Tabela 2.17 - RMN de ¹ H das pirimidoespiroindolinas 17a-e	54
Tabela 2.18 - RMN de ¹³ C das pirimidoespiroindolinas 18a-e	54
Tabela 2.19 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para as pirimidoespiroindolinas 18a-d e seus precursores 17b-c	57
Tabela 2.20 - Valores de MIC (em µM) estimados para os compostos tetraciclina, 8a , 8c-k , 9a-b , 17a-d , 18a-b	59
Tabela 2.21 - Valores de IC ₅₀ estimados para a inibição da atividade da enzima XO dos compostos alopurinol, 17d e 18a	62

Tabela 2.22 - Curvas de calibração para o radical livre DPPH a 515 e 517 nm.	62
Tabela 2.23 - Valores de IC ₅₀ estimados para a atividade antioxidante pelo método de DPPH dos compostos trolox, 17a e 17b	64
Tabela 2.24 - Dados computacionais de probabilidade (Pa-Pi) calculados através do <i>software</i> PASS <i>on-line</i> para os (tio)barbituratos sintetizados e alopurinol para o modelo da atividade antibacteriana, inibidor e substrato da XO, tratamento da gota e estimulação da excreção do ácido úrico.	70
Tabela 2.25 - Dados computacionais para os descritores das regras de Lipinsky e parâmetros de Veber, calculados através do <i>software</i> pkSCM <i>on-line</i> para a espiroindolina 18a	70
Tabela 2.26 - Dados computacionais calculados para as propriedades ADMET com base nos vários modelos do <i>software</i> pkSCM <i>on-line</i> para a espiroindolina 18a	72
Tabela 6.1 - Dados do refinamento da estrutura cristalizada de 18a	122
Tabela 6.2 - Coordenadas atômica ($\times 10^4$) e parâmetros de desvio isotrópico equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para 18a . U(eq) é definido por um terço do o traço do tensor U ^{ij} ortogonalizados. ...	123
Tabela 6.3 - Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para 18a	123
Tabela 6.4 - Ângulos de torção (°) para 18a	126
Tabela 6.5 - Resultados de screening (em $\mu\text{M} \pm$ desvio padrão) para os ensaios de inibição da XO, DPPH e atividade antiproliferativa em células MCF-7.....	128

Lista de Acrónimos, abreviaturas e símbolos

AB	antibiótico/antimicótico
Ac	Acetato
ADMET	absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
Ar	Aromático
ARG	Arginina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	refletância total atenuada - do inglês, <i>Attenued Total Reflectance</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
ccf	cromatografia em camada fina
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
cm ⁻¹	número(s) de onda
d	duplete
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
dd	duplo duplete
ddd	duplo duplo duplete
dec.	decomposição
dt	duplo tripleto
DEPT	intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização - do inglês, <i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DL ₅₀	dose letal em 50% da população
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido hexadeuterado
DPPH	2,2-difenilo-1-picrilhidrazilo
EMA	Agência Europeia dos Medicamentos - 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>
FTIR	infravermelho por transformada de Fourier - do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GLU	Glutamina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanesulfônico
HMBC	correlação heteronuclear a múltiplas ligações - do inglês, <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
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>
IC ₅₀	concentração inibitória para metade da atividade máxima - do inglês, <i>half maximal inhibitory concentration</i>
Lit.	Literatura
logP	logaritmo do coeficiente de partilha
m	múltiplo
MCF-7	células epiteliais humanas do cancro da mama - do inglês <i>Michigan Cancer Foundation-7, human breast adenocarcinoma cell line</i>
MCR	reação com multi-componentes - do inglês, <i>Multi-Component Reaction</i>
MCT4	transportador de monocarboxilato 4 - do inglês, <i>monocarboxylate transporter 4</i>
MIC	Concentração mínima inibitória - do inglês, <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MMP(s)	metaloproteinase(s) da matriz- do inglês, <i>matrix metalloproteinase(s)</i>
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	nanómetro(s)
OCT2	transportador de catiões orgânicos 2 - do inglês, <i>Organic Cation Transporter 2</i>
Pa	probabilidade do composto ser ativo
PDB	Base de dados de proteínas - do inglês, <i>Protein Data Bank</i>
pf	ponto de fusão

Ph	Fenilo - do inglês, <i>Phenyl</i>
Pi	probabilidade do composto ser inativo
ppm	partes por milhão
QSAR	relação estrutura-atividade quantitativa - do inglês, <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RCM	reação de metátese de fecho de anel - do inglês, <i>Ring-Closing Metathesis</i>
REA	Relação estrutura-atividade
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de próton
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>
s	singuleto
SNC	Sistema Nervoso Central
t	triplete
td	triplo duplete
THF	tetrahidrofurano
THR	tirosina
Ts	<i>p</i> -toluenossulfonilo
USA	Estados Unidos da América - do inglês, <i>United States of America</i>
XO	Xantina Oxidase
δ	Desvio(s) químico(s) em RMN
η	rendimento
ν _{máx}	frequência máxima da banda de absorção
3D QSAR	relação estrutura-atividade quantitativa a 3 dimensões - do inglês, <i>3D quantitative structure activity relationships</i>
5-Fu	5-fluorouracilo

Capítulo 1 - Introdução

O presente capítulo visa fazer uma introdução à química medicinal e ao desenvolvimento de fármacos, em especial dos barbituratos funcionalizados em C5. Inicialmente será apresentada uma breve história do desenvolvimento de fármacos até à atualidade, sendo inseridos temas como a importância da química medicinal no desenvolvimento atual de fármacos, bem como as etapas fundamentais para este desenvolvimento. Na secção 1.1.1 serão apresentados os principais ensaios *in silico*, com especial atenção para o *docking* molecular. Na secção 1.1.2 será revisto sumariamente o ensaio *in vitro* utilizado para avaliação da inibição da xantina oxidase (XO) e da atividade antioxidante no presente trabalho de investigação.

Numa segunda instância será apresentada uma contextualização histórica, farmacológica e sintética dos barbituratos e respetivos produtos resultantes de funcionalizações em C5, com especial atenção para as espiropirimidinas de 5 membros. Serão ainda revistos os métodos de ciclização em C5-C6, tendo em conta o objetivo inicial proposto deste trabalho de dissertação, os quais serão apresentados no subcapítulo 1.4.

1.1 A química medicinal e o desenvolvimento de fármacos

Atualmente, um químico medicinal tem como tarefa principal projetar e preparar agentes com um dado efeito biológico desejado sobre o corpo humano ou outro organismo vivo tendo em conta a estrutura molecular do alvo biológico e/ou de ligandos do mesmo.¹ No entanto, nem sempre foi esta a abordagem da descoberta e desenvolvimento de fármacos.

Desde a Antiguidade que se faz uma associação entre plantas medicinais e benefícios em determinadas patologias, como é exemplo a utilização do ópio em doentes no pré-operatório para o “alívio da dor”.² No entanto, a descoberta de novos “fármacos” mais propriamente dita surge no século XIX com o desenvolvimento da química analítica, em particular, com o isolamento e purificação de metabolitos ativos a partir de plantas que até ao momento tinham sido descritas como medicinais. São exemplos a morfina e a papaverina, extraídas da papoila do ópio, e a cocaína extraída da coca (figura 1.1), sendo esta última a primeira a ser comercializada isoladamente.^{3, 4} Com o desenvolvimento da extração e isolamento de compostos nesse século, começou também a ser abordado o termo pureza, uma vez que a maioria dos fármacos eram comercializados ainda impuros. No fim do século XIX, após a definição de algumas teorias basilares da química e da estrutura do benzeno, surgiram as primeiras moléculas sintéticas com interesse terapêutico, como é o caso do ácido acetilsalicílico, do ácido barbitúrico que serviu de base a diversos barbituratos (figura 1.1).⁴⁻⁷

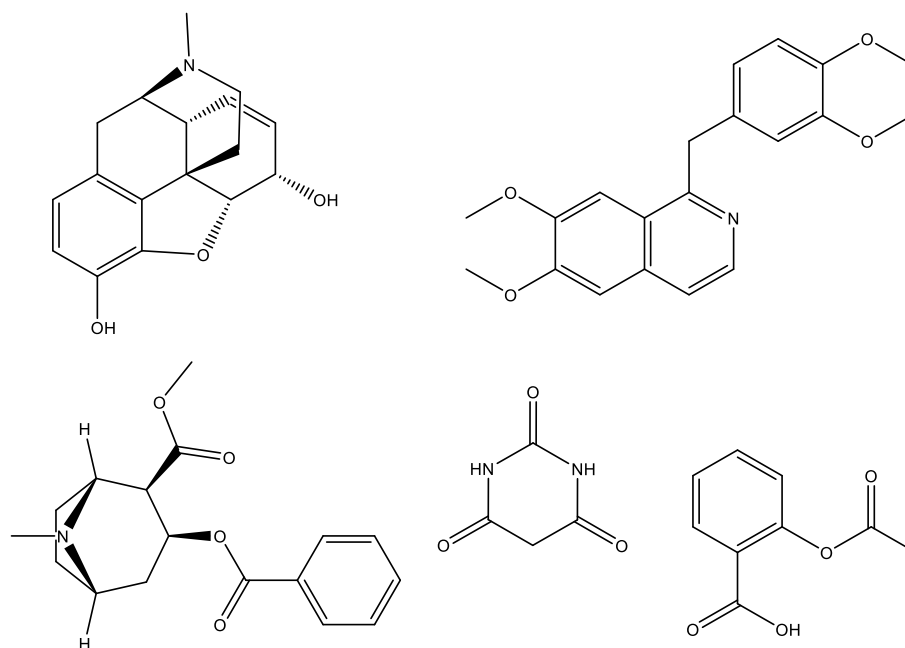


Figura 1.1 - Morfina, papaverina, cocaína, ácido barbitúrico e ácido acetilsalicílico. Da esquerda para a direita e de cima para baixo, respetivamente.

No início do século XX, as empresas tinham como maior preocupação a obtenção dos fármacos com lucro rápido, em detrimento da segurança dos consumidores. Para colmatar este facto, foi criada a agência reguladora “*Food and Drug Administration*” (FDA) nos Estados Unidos da América (EUA), a qual tem implementado diversos padrões de segurança, qualidade e eficácia pelos quais os fármacos têm de passar até chegarem como medicamento ao mercado. Muitos destes padrões surgiram em 1962 após terem surgido os problemas associados à talidomida (figura 1.2) quando administrada a grávidas. Este fármaco foi desenvolvido como sedativo e também mostrou atividades antieméticas tendo as mulheres grávidas se tornado o melhor mercado para este fármaco, que era útil para tratar os enjoos que são comuns no primeiro trimestre de gravidez. Infelizmente, uma das formas enantioméricas da talidomida revelou ser teratogénica, provocando malformações dos membros em muitos dos fetos expostos ao fármaco. Antes deste infortúnio, o uso da talidomida tinha sido submetido à aprovação pela FDA, que teve em conta os testes de segurança pré-realizados e não aprovou o fármaco. Este episódio foi considerado uma das vitórias da FDA na proteção da saúde pública, tendo a história da talidomida marcado um ponto de viragem no desenvolvimento de fármacos.⁸

O desenvolvimento de fármacos, propriamente dito, inicia-se de uma forma interdisciplinar com os avanços na bioquímica, biologia celular e química computacional, num período em que a química já tinha atingido a sua maturidade. Isto permitiu o início dos estudos das moléculas com base em modelos computacionais e em animais, tendo sido mais tarde também envolvidas enzimas ou recetores celulares, tornando-se o processo mais racional e tendo por base um

diálogo constante entre químicos e biólogos, uma vez que até este momento a descoberta de fármacos se baseava no serendipismo.^{4, 9, 10}

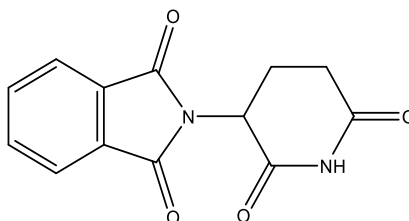


Figura 1.2 - Talidomida.

Ao longo dos anos, os métodos para a descoberta de fármacos sofreram várias transformações. No entanto, o objetivo permaneceu e permanece sempre o mesmo, nomeadamente o de encontrar fármacos mais seguros e efetivos contra doenças que têm um peso cada vez maior na morbidade e mortalidade.¹⁰ Este processo começa com a identificação de uma necessidade médica, incluindo uma revisão sobre a apropriação das terapias existentes, caso haja alguma. A partir desta análise são formuladas hipóteses sobre como se pode melhorar a terapêutica.¹¹

Após a identificação do alvo são essenciais os métodos denominados *in silico*, entrando em ação a química computacional com métodos como o *docking* molecular nomeadamente de bibliotecas de compostos.¹² Esta abordagem é apenas possível se o alvo biológico for conhecido, estiver cristalizado e bem caracterizado. Para contornar isto, torna-se importante o *design* de fármacos baseado no ligando quando a estrutura do recetor não é conhecida. Este método baseia-se no estudo das relações estrutura-atividade quantitativas a 3 dimensões (3D QSAR - do inglês, *3D quantitative structure activity relationships*) de moléculas que se ligam ao alvo biológico de interesse. Também é possível efetuar simulações de propriedades como a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) e as relações quantitativas de estrutura-atividade (QSAR - do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*) para a previsão de uma determinada atividade biológica.¹³ Neste passo é testado um largo espetro de moléculas, surgindo potenciais *hits in silico*. Contudo, este é um passo que pode gerar tanto falsos positivos como negativos, podendo eliminar-se moléculas com potencial interesse terapêutico, embora os recursos humanos e financeiros poupados por esta abordagem compensem estas desvantagens.¹

Posteriormente é efetuada a síntese química e os ensaios *in vitro* dos compostos sintetizados, dependendo do alvo biológico, identificando-se posteriormente os *hits*.¹¹ Aqui, torna-se importante a utilização de novas tecnologias como a química combinatória e o *screening* de alto rendimento (HTS - do inglês, *High-throughput screening*), do qual são exemplo os ensaios

biológicos automatizados em caixas multi-poços. Estas técnicas permitem um aumento da rapidez de processos, tanto na síntese como na avaliação biológica.¹⁰

Realizados os testes *in vitro*, é necessário encontrar modelos *in vivo* apropriados, capazes de reproduzir as circunstâncias associadas à doença em estudo, para ser feita a verificação dos efeitos dos *hits*. Neste ponto, são escolhidas moléculas *lead*, as quais são modificadas de modo a potenciar os seus efeitos farmacológicos e não só.¹¹ Aqui, é também importante a aquisição de informações relativas à relação estrutura-atividade (REA) para eventuais melhorias nos *lead*.^{10, 11}

Os candidatos a fármaco são, em seguida, submetidos a testes de avaliação do seu perfil ADMET em animais, conforme exigido e regulado por lei. Se o composto for aprovado na íntegra dos testes, todos os dados da pesquisa são apresentados às agências reguladoras do medicamento antes de serem iniciados os ensaios clínicos, como é o caso da Agência Europeia dos Medicamentos (EMA - do inglês, European Medicines Agency) na Europa e da FDA nos EUA.

Nos ensaios clínicos existem as 4 fases seguintes, com avaliação sequencial:^{11, 14}

- a) Fase I - ensaio de tolerância ao fármaco em voluntários saudáveis;
- b) Fase II - ensaio de eficácia e intervalo de dose em voluntários doentes;
- c) Fase III - ensaios generalizados em milhares de pacientes apropriados para desenvolver uma ampla base de dados sobre a eficácia e segurança do fármaco;
- d) Fase IV - estudos após comercialização. Ensaio de risco a longo prazo, benefícios e otimização da utilização do fármaco.

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

A sequenciação do genoma humano levou a um aumento muito importante no número de potenciais novos alvos terapêuticos. Além disso, o desenvolvimento da cristalografia de Raio-X e dos métodos de ressonância magnética nuclear contribuíram para a aquisição das estruturas atômicas de proteínas e complexos proteína-ligando com um elevado nível de pormenor.^{12, 15} Com base nestas estruturas, um dos métodos mais utilizados nos ensaios *in silico* é o *docking* (encaixe) molecular com base na estrutura do alvo biológico.^{12, 14} No entanto, este não é o único a ser empregue, sendo as interações proteína-proteína largamente aplicadas na compreensão de variados processos biológicos.¹⁵

O *docking* molecular pode basear-se na estrutura do alvo biológico pretendido ou utilizar estruturas homólogas a esta quando a estrutura pretendida não se encontra totalmente caracterizada. Estas estruturas podem ser submetidas a cálculos de *docking* para um *screening* virtual inicial, ou para o aperfeiçoamento posterior de um ligando na obtenção de potenciais fármacos (figura 1.3).¹⁵

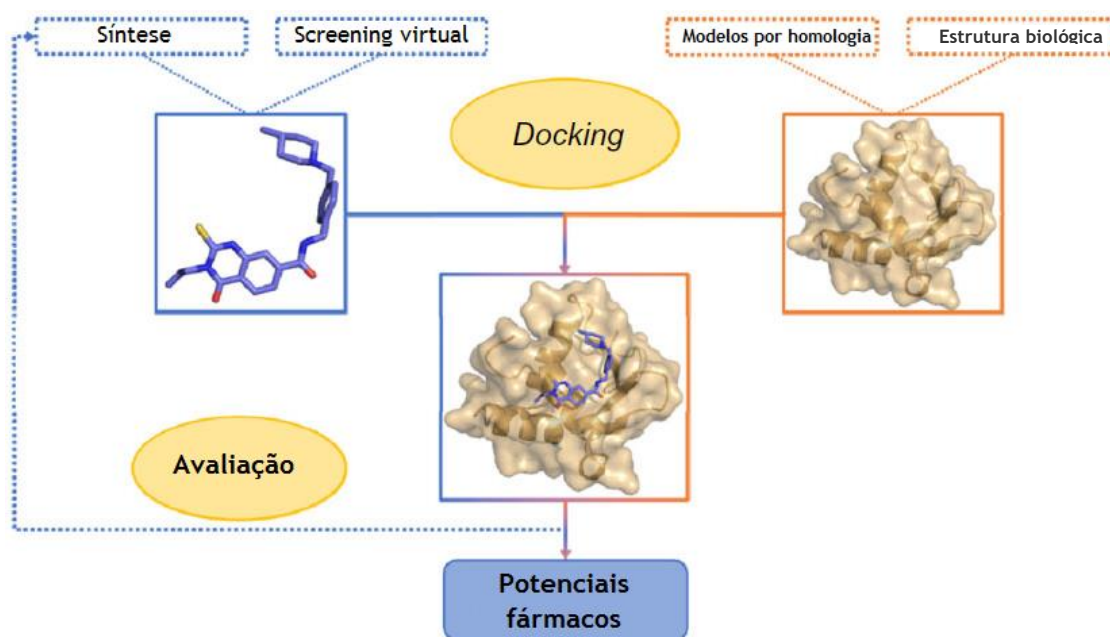


Figura 1.3 - Resumo do método de encaixe molecular (*docking*). Adaptado de de Ruyck *et al.*¹⁵

No panorama do encaixe molecular, os *softwares* computacionais mais utilizados para a realização do *docking* são o Gold, Glide e AutoDock.^{12, 15} Os dois primeiros são comerciais, enquanto o último é grátis e encontra-se livre para utilização.¹⁵ Estes têm desempenhado um papel importante no desenho de novas moléculas de forma mais racional, servindo de exemplo alguns potenciais anticancerígenos tendo como alvo a fosfoinositídeo 3-quinase¹⁶ e inibidores da XO.¹⁷

Outros métodos *in silico* com elevado interesse no desenvolvimento de fármacos são os *softwares* de predição de atividades biológicas e propriedades de ADMET. Estes baseiam-se em bibliotecas de compostos e em modelos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR - do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*), de modo a desenvolver modelos de previsão das suas atividades químicas e biológicas.^{13, 18} Neste contexto, a “regra dos cinco” de Lipinski foi formulada para permitir prever a biodisponibilidade oral de potenciais fármacos e é largamente utilizada por estes *softwares*. Esta regra envolve quatro propriedades importantes, cada uma relacionada com o número 5 (massa molecular < 500 g/mol; logaritmo

do coeficiente de partilha (LogP) calculado < 5 ; grupos doadores em pontes de hidrogénio < 5 ; e grupos aceptadores em pontes de hidrogénio < 10). A regra é baseada em dados da literatura para um grande número de compostos, incluindo fármacos conhecidos, que se correlacionam por ter boas propriedades de biodisponibilidade oral.^{19, 20} Outro parâmetro tido muitas das vezes em consideração são os parâmetros de Veber (número de ligações rotáveis ≤ 10 e área superficial polar $\leq 140 \text{ \AA}^2$).²¹

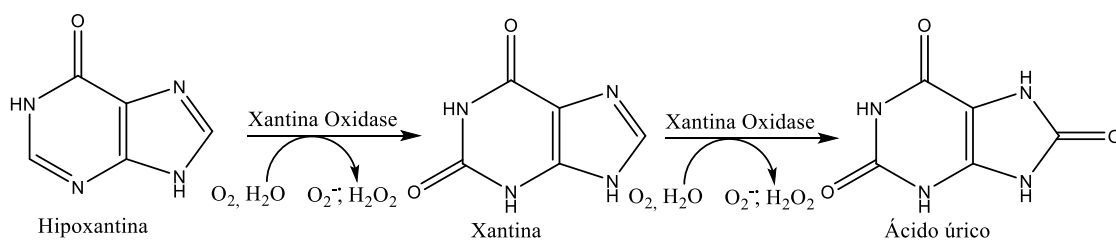
1.1.2 Ensaios *in vitro* da XO e atividade antioxidante

Não obstante, os ensaios *in silico* serem importantes tanto na diminuição dos recursos humanos e financeiros utilizados, como na compreensão de alguns dos mecanismos associados ao efeito biológico dos fármacos, não permitem reproduzir as circunstâncias associadas à doença em estudo, sendo para isto sempre necessário numa fase posterior os ensaios *in vitro* de avaliação biológica.

Como neste trabalho de dissertação foi definido como um dos objetivos testar a atividade dos compostos sintetizados e seus precursores como potenciais inibidores da enzima XO, é aqui seguidamente revisto sumariamente este ensaio e a avaliação da atividade antioxidante a este associado.

Esta enzima é um homodímero com massa molécula de 290 kDa.²² A XO pertence à família das molibdeno-proteínas, contendo um molibdénio, um dinucleótido de flavina e adenina (FAD - do inglês, *Flavine Adenine Dinucleotide*), e dois centros de ferro-enxofre do tipo ferredoxina em cada uma das suas duas subunidades independentes, contendo dois locais separados de ligação ao substrato.^{22, 23}

A gota é resultado da catalisação oxidativa por parte da XO, transformando a hipoxantina em xantina e subsequentemente a ácido úrico.^{22, 23} Durante a reoxidação da enzima, o oxigénio molecular atua como aceptador de eletrões, produzindo o radical anião superóxido e peróxido de hidrogénio (esquema 1.1).²³ Estes podem provocar danos oxidativos nos tecidos, sendo importante a prevenção da sua formação. Para isto é importante verificar igualmente a atividade antioxidante dos potenciais inibidores desta enzima.²⁴



Esquema 1.1 - Processo catalisado pela XO. Adaptado de Kostic *et al.*.²²

O aumento dos níveis de ácido úrico, designadamente pela hiperatividade da XO, resulta na condição conhecida como gota, uma doença reumática comum.²⁵ Uma via comum para efetuar o tratamento desta patologia envolve a redução da produção, sendo os inibidores da XO muito importantes. Nesta segunda abordagem, os inibidores da XO mais conhecidos são o alopurinol e o febuxostat (figura 1.4).^{22, 25}

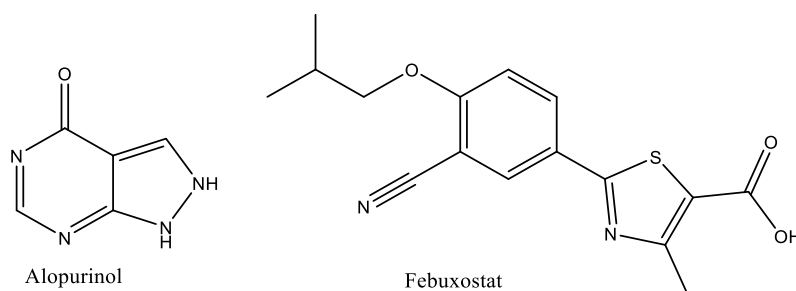
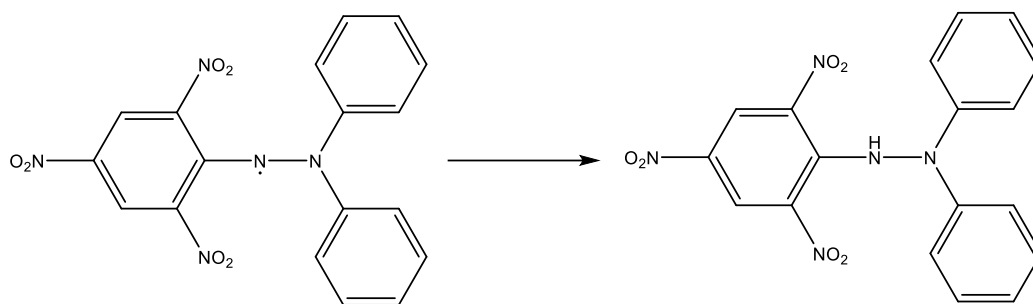


Figura 1.4 - Alopurinol e febuxostat.

O método de DPPH para a avaliação da atividade antioxidante foi implementado há cerca de 60 anos por Marsden Blois²⁶ e simplificado por Brand-Williams *et al.*²⁷ Este último tem sido o mais utilizado entre a comunidade científica, sendo recomendada a utilização de volumes de trabalho próximos dos 4 mL devido à elevada volatilidade do solvente utilizado neste ensaio.²⁸ No entanto, verificando-se uma necessidade crescente na identificação de compostos ativos, têm sido desenvolvidos métodos mais simples e rápidos. Neste ponto de vista, foi implementado um método mais rápido e prático envolvendo a utilização de placas multi-poços por Cheng *et al.*²⁹

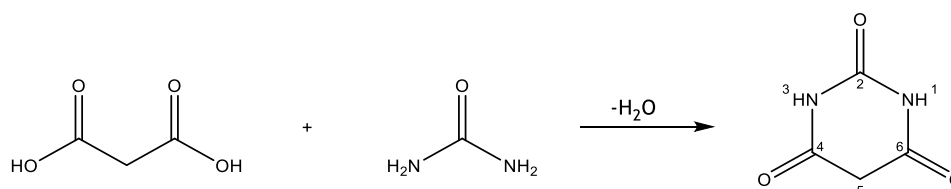
O radical DPPH caracteriza-se por ser um radical estável, apresentando uma deslocalização do eletrão livre por toda a molécula que não permite a sua dimerização. Esta deslocalização dá origem a uma coloração violeta escuro em solução de etanol, caracterizada por uma banda de absorção a cerca de 520 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com um composto capaz de doar um átomo de hidrogénio, dá-se uma reação radicalar, originando a sua forma reduzida - difenilpicril-hidrazina - com consequente perda gradual da cor violeta. Com a redução do DPPH é de esperar uma coloração residual amarela pálida, característica do grupo picrilo ainda presente na molécula reduzida (esquema 1.2).^{28, 30, 31}



Esquema 1.2 - Radical DPPH (difenilpicril-hidrazilo) e respectiva forma reduzida (difenilpicril-hidrazina).

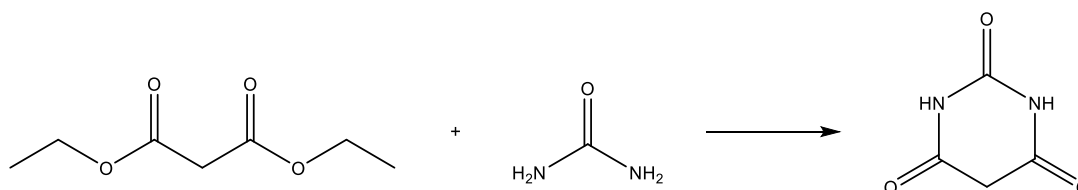
1.2 Barbituratos

O ácido barbitúrico foi sintetizado pela primeira vez em 1864 por um químico alemão chamado Adolph von Baeyer, prémio Nobel da Química em 1904, através da ciclização da ureia com o ácido malónico com eliminação de água (esquema 1.3).⁵ Desde a primeira síntese descrita, muitas têm sido as alterações efetuadas ao método original, embora todas tendo a mesma base de ciclização. Um ajuste a este método, mantendo o ácido malónico e a ureia [alterada muitas das vezes pela tioureia (substituída ou não)], é a adição de cloreto de acetilo e ácido acético, levando a um aumento da velocidade e do rendimento reacional.^{32, 33}



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

Uma alternativa ao ácido malónico é a utilização do malonato de dietilo (esquema 1.4). Esta reação tem sido descrita de diversas formas, sendo as mais comuns a utilização do etóxido de sódio em etanol^{34, 35} ou metóxido de sódio em metanol para promover a reação.³⁶



Esquema 1.4 - Formação do ácido barbitúrico a partir do malonato de dietilo e ureia.

Farmacologicamente, os barbitúricos são considerados potentes depressores do sistema nervoso central (SNC), tendo atividades sedativo-hipnóticas, anestésicas e anticonvulsivantes. Entre o ano de 1920 e meados de 1960, estes foram praticamente os únicos fármacos utilizados como sedativo-hipnóticos, tendo sido amplamente utilizados até ao início da comercialização das benzodiazepinas em 1960.^{7, 37}

Dado o seu interesse, no século XX, foram sintetizadas mais de 2500 (tio)barbitúricos diferentes, dos quais cerca de 50 acabaram por ser utilizados em pacientes com esquizofrenia, epilepsia, e como sedativo-hipnóticos e anestésicos administrados intravenosamente.⁷ Os barbitúricos desempenharam um papel crucial na compreensão da função do recetor do ácido γ -aminobutírico (GABA), e só foram substituídos por outros agentes, nomeadamente benzodiazepinas, devido a problemas na segurança da sua utilização. Entre estas, incluem-se a tolerância e dependência, o abuso, e uma janela terapêutica relativamente estreita, o que pode conduzir rapidamente a sobredosagem e intoxicação.³⁷ Os barbituratos mais utilizados ao longo dos anos foram: mefobarbital, fenobarbital, amobarbital, butabarbital, talbutal, pentobarbital, secobarbital, metohexital e tiopental (figura 1.6), embora alguns destes já não sejam utilizados atualmente. Estes podem ser divididos em 4 classes, tendo em conta o seu tempo de ação (tabela 1.1).^{7, 37, 38} Esta característica, na maioria dos casos, está diretamente relacionada com o logP das moléculas, diminuindo o tempo de ação com o seu aumento.³⁷

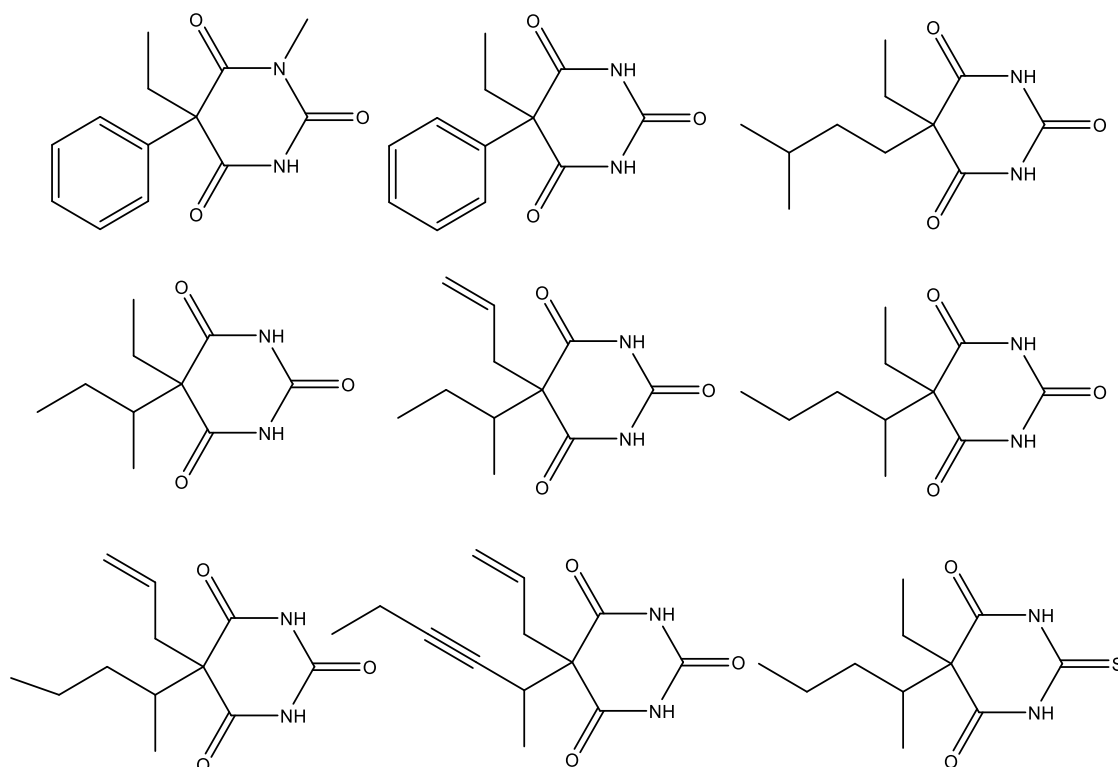


Figura 1.5 - Mefobarbital, fenobarbital, amobarbital, butabarbital, talbutal, pentobarbital, secobarbital, metohexital e tiopental. Da esquerda para a direita e de cima para baixo, respetivamente.

Tabela 1.1 - Lista de barbituratos mais utilizados ao longo dos anos, respetiva divisão por tempo de ação e informação da comercialização.

Barbiturato	Ação	Duração	Utilização
Mefobarbital	Longa	10 - 16 horas	a)
Fenobarbital			a) e b)
Amobarbital	Intermédia	6 - 8 horas	a)
Butobarbital			a)
Talbutal			a)
Pentobarbital	Curta	3 - 4 horas	a)
Secobarbital			a)
Metohexital	Ultra-curta	10 - 30 minutos	a)
Tiopental			a) e b)

- a) Aprovado pela FDA;
b) Utilizado em Portugal.

Depois de administrados, os barbituratos sofrem metabolização, principalmente por oxidação dos substituintes na posição 5 e/ou completa remoção desses substituintes, *N*-desalquilação em *N1* e *N3* (quando aplicável), dessulfuração oxidativa do carbono 2 (caso dos tiobarbitúricos) e hidrólise do anel barbitúrico na ligação 1:6 para dar origem a malonilureias substituídas.^{1, 37}

Além do uso clássico dos barbituratos relacionado com as doenças do SNC, esta classe de compostos tem atraído a fascinação de investigadores em diferentes áreas relacionadas com as ciências da saúde, tais como a bioquímica, química, química medicinal, medicina e farmacêutica, devido à sua ampla gama de outras atividades biológicas. Mais concretamente, têm-se destacado como inibidores de enzimas [colagenase-3, metaloproteinases da matriz (MMPs - do inglês, *matrix metalloproteinases*),³⁹ isoformas do citocromo P450, XO⁴⁰ e metionina aminopeptidase-1], e ainda como antibacterianos,⁴¹ antitumorais,^{42, 43} antiangiogénicos, imunomoduladores, herbicidas, fungicidas, antivirais e antioxidantes.^{44, 45} Estas atividades estão associadas a diversas alterações estruturais em *N1*, *N3*, *C2* e *C5*, sendo estas últimas as mais exploradas.

1.3 Funcionalizações em C5

Entre as funcionalizações mais importantes no C5 dos ácidos (tio)barbitúricos estão a sua reação com um benzaldeído ou com o *o*-formiato de trietilo, formando 5-benzilidenopirimidinas ou metilenopirimidinas, através de uma reação de Knoevenagel.

As 5-benzilidenopirimidinas foram sintetizadas pela primeira vez em 1901 por Conrad *et al.*, utilizando como solvente a água.⁴⁶ Desde então, têm havido várias alterações, não só ao

método, como também à forma de isolamento dos produtos. Na tabela 1.2 são apresentados várias condições reacionais representativas com os respectivos rendimentos e autores. Apesar de haver diversas alternativas, o método em água apresenta rendimentos superiores a todos os outros, tendo ainda a vantagem de ser um método interessante no âmbito da química verde. Esta família de compostos foi testada recentemente como inibidores da atividade da XO⁴⁰ e como antibacterianos,⁴⁷ demonstrando alguma potencialidade.

Tabela 1.2 - Condições reacionais representativas de reações de Knoevenagel para a formação de 5-benzilidenopirimidinas e respetivos rendimentos.

Bibliografia	Condições	Rendimentos (%)
Conrad <i>et al.</i> , 1901 ⁴⁶	Água	a)
Fraser <i>et al.</i> , 1990 ⁴⁸	13% HCl aquoso	66
Jursic, 2001 ⁴⁹	Ácido acético	88
Deb <i>et al.</i> , 2005 ⁵⁰	Água	96
Palasz, 2012 ⁵¹	Água	96
Chen <i>et al.</i> , 2014 ⁵²	Etanol	80
a) Não reportado		

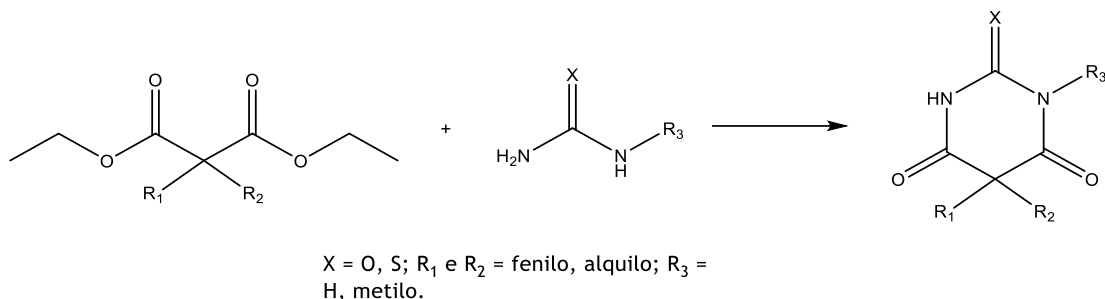
As metilenopirimidinas são sintetizadas a partir do ácido (tio)barbitúrico e do *o*-formiato de trietilo com ou sem solvente, sendo utilizadas na maioria das vezes, em passos intermediários para a síntese de diversas moléculas, normalmente por uma reação de Michael com posterior eliminação de etanol.^{53, 54}

1.3.1 5,5-Dissubstituídos

São exemplos de barbituratos dissubstituídos na posição 5 todos os barbituratos patentes na figura 1.5. Estes apresentam uma síntese comum a partir do derivado de malonato de dietilo característico de cada molécula em particular e da (tio)ureia correspondente, substituída ou não (esquema 1.5).⁵⁵

Os espirobarbituratos em C5 que serão aqui convenientemente revistos nos subcapítulos seguintes podem também ser considerados 5,5-dissubstituídos, uma vez que apresentam duas

ligações no carbono 5, mas dada a sua relevância para o presente trabalho decidiu-se separá-los desta secção.



Esquema 1.5 - Síntese geral para os barbituratos 5,5-dissubstituídos patentes na figura 1.5, a partir do derivado de malonato de dietilo e (tio)ureia.

1.3.2 Espirobarbituratos

Historicamente, os espirobarbituratos foram primeiramente descritos por Dox *et al.* em 1921, com o C5 da estrutura do ácido barbitúrico a fazer parte de um ciclobutano ou ciclohexano não substituídos.⁵⁶ Estes compostos foram preparados por apresentarem uma semelhança estrutural aos barbituratos 5,5-dissubstituídos, conhecidos pela sua ação hipnótica, embora as suas propriedades farmacológicas não tenham sido testadas.^{56, 57} Desde a sua descoberta até à atualidade, outros espirobarbituratos têm demonstrado atividades biológicas interessantes, como é o caso do AZD0914, um agente antibacteriano (figura 1.7).^{41, 58}

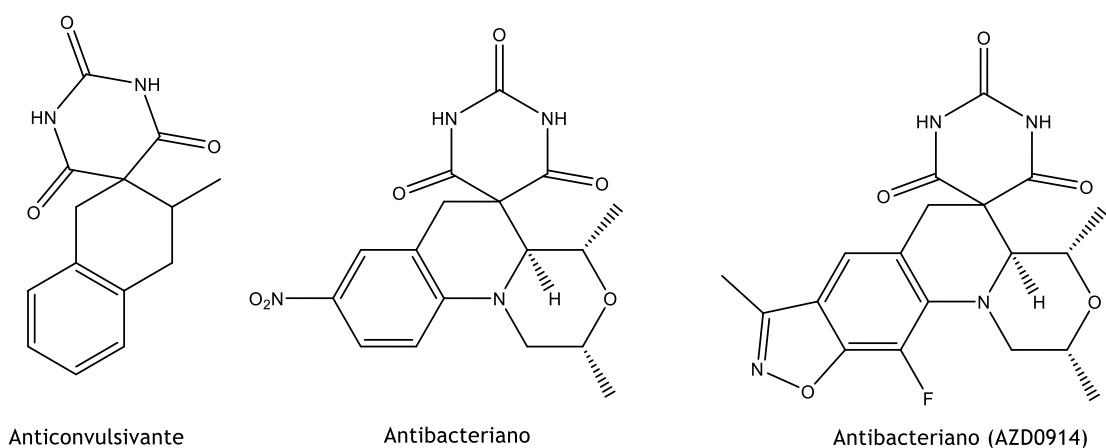
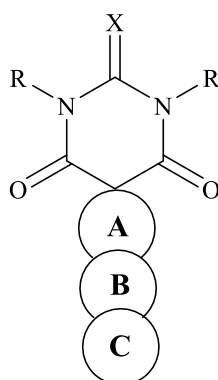


Figura 1.6 - Barbituratos espirocíclicos com atividades biológicas anticonvulsivantes⁵⁹ e antibacterianos,^{60, 61} da esquerda para a direita, respetivamente.

Por conveniência, os espiro(tio)barbituratos são aqui divididos a partir do número e natureza dos anéis fundidos (A, B e C) ligados ao carbono 5 do (tio)barbitúrico base. O anel A apresenta-se como um carbociclo não aromático ou heterociclo de 3 a 7 membros, enquanto os anéis B e C podem ser um carbociclo, heterociclo, aromático ou heteroaromático (figura 1.7). Não obstante esta variedade, são aqui apenas revistos os espirobarbituratos estruturalmente semelhantes aos apresentados neste trabalho de dissertação, nomeadamente com anel A de 5 membros, incluindo indóis. Para isso, são revistas tanto as reações envolvidas como as atividades biológicas conhecidas para cada uma destas classes de espirobarbituratos.



X = O, S

R = H, alquilo ou arilo

A = carbociclo não aromático ou heterociclo

B e C = carbociclo, heterociclo, aromático ou heteroaromático

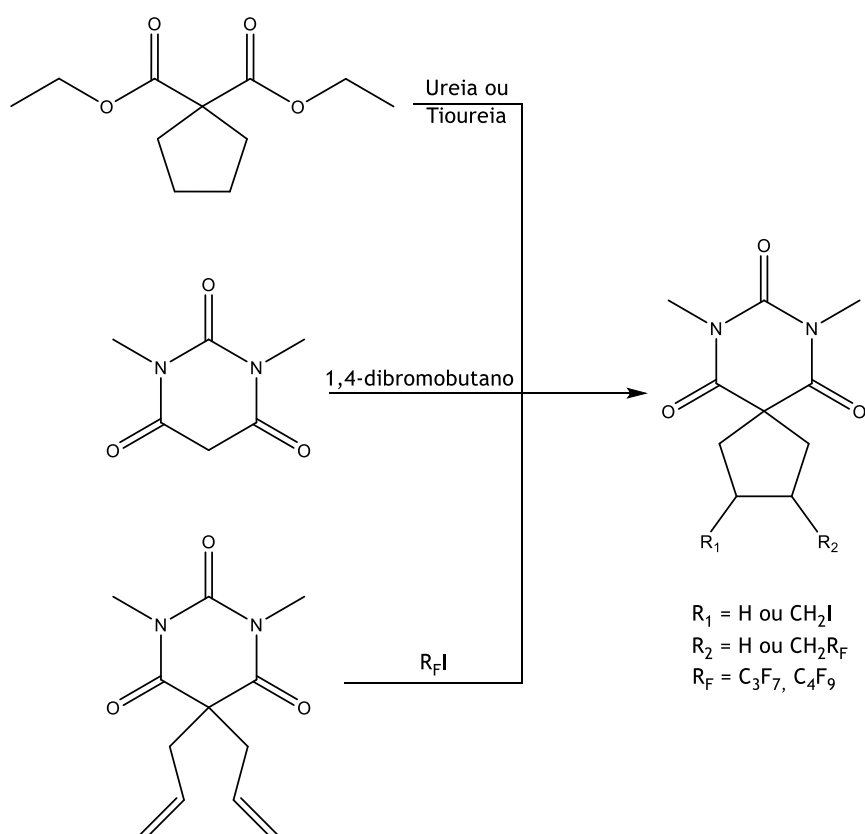
Figura 1.7 - Divisão dos anéis para os espiro barbituratos.

É de notar que algum dos esquemas apresentados não têm em consideração a maioria dos grupos gerais presentes nas moléculas, a menos que a sua presença seja essencial para o sucesso da reação, dando-se relevo à construção do esqueleto base.

1.3.2.1 Espirociclopenta[(di)e]nos (espiros com anéis de 5 sem heteroátomos)

Depois de Dox *et al.* em 1921 terem descrito a formação de pirimidoespirociclohexanos,⁵⁶ a síntese de pirimidoespirociclopenta[(di)e]nos (esquema 1.6) iniciou-se em 1950 com o método sintético de Skinner *et al.*. Este envolve a formação do éster ciclopentano-1,1-dicarboxílico, a partir do 1,4-dibromobutano, com posterior condensação pela ureia e respetiva formação do espirociclopentano com rendimento de 58%. Estes autores relatam ainda a elevada instabilidade deste composto por formação do respetivo sal dissódico, o qual se decompõe em condições aquosas. A tentativa de síntese do análogo espirociclopenteno a partir do 1,4-dibromobut-2-eno é descrita sem sucesso.⁶² Mais tarde, Voronin *et al.* realizam a mesma síntese, substituindo

a ureia por tioureia, obtendo o espirociclopentano derivado do ácido tiobarbitúrico com um rendimento de 55%. Verificaram ainda que estes não apresentam propriedades antiespasmódicas em ratos nem problemas de toxicidade.⁶³ Recentemente, Singh *et al.* descrevem a formação de espirociclopentanos a partir do ácido barbitúrico e do 1,4-dibromobutano em meio básico com catálise de hidrogenossulfato de tetrabutylamónio, com rendimentos entre os 52 e 55%.^{64, 65} Em 2002, Renard *et al.* descreveram a síntese de espiro nucleósidos (sem oxigénio na pentose) a partir da ureia e do derivado do éster de ciclopentano-1,1-dicarboxílico em *tert*-butóxido de potássio, com rendimento de 68%.⁶⁶

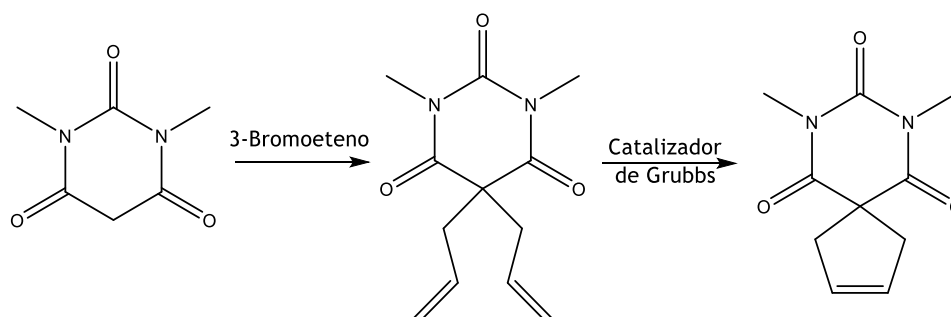


Esquema 1.6 - Síntese de espirociclopentanos pelas diferentes vias sintéticas descritas na literatura a partir do éster de ciclopentano-1,1-dicarboxílico,^{62, 66} ácido barbitúrico^{64, 65} ou barbitúrico 5,5-dialilo.⁶⁷

Partindo de um ácido barbitúrico 5,5-dialilo (esquema 1.6), Zhang *et al.* descrevem a formação de espirociclopentanos com recurso a uma reação radicalar. Para isso, submeteram o 5,5-dialilo ao iodeto de perfluoroalquilo, na presença de ditionito de sódio e carbonato de sódio (1:1) em acetonitrilo/água, em diferentes proporções, obtendo rendimentos superiores a 90%. O ditionito é utilizado como iniciador e o carbonato como diminuidor da velocidade de decomposição do primeiro.⁶⁷

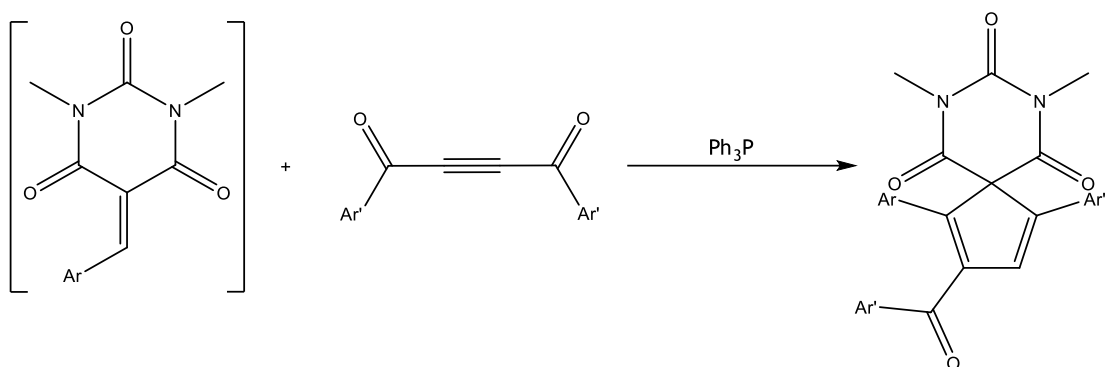
Todos os métodos anteriormente citados permitem a síntese de pirimidoespirociclopentanos com diferentes substituições ao núcleo base. Comparando os métodos de formação do núcleo base, sem qualquer substituição, verifica-se que tanto os métodos de Skinner *et al.*⁶² e Voronin *et al.*,⁶³ como o de Singh *et al.*^{64, 65} apresentam rendimentos moderados, em que o último tem apenas um passo reacional, o que é, à partida, vantajoso. Os métodos de Zhang *et al.*⁶⁷ e Renard *et al.*⁶⁶ apresentam como vantagem o facto de poderem vir a sofrer posteriores alterações nos substituintes ao núcleo base.

Depois das tentativas de Skinner *et al.* para a formação de espirociclopentenos a partir do 1,4-dibromobut-2-eno e de um ácido barbitúrico,⁶² também Kotha *et al.* o tentaram, embora igualmente sem sucesso.⁶⁸ Estes investigadores encontraram uma solução para a síntese destes compostos aplicando uma reação de metátese de fecho de anel (RCM - do inglês, Ring-Closing Metathesis), recorrendo ao catalisador de Grubbs (esquema 1.7). Esta reação inicia-se com a adição de 3-bromoeteno a um ácido barbitúrico em meio básico, formando o derivado 5,5-dialilo. Este último sofre uma ciclização com ajuda da catálise de ruténio (catalisador de Grubbs), com eliminação de etileno e formação do espirociclopenteno.^{68, 69} Esta alternativa apresenta resultados excelentes em termos de rendimentos (superiores a 88%), embora não seja possível a síntese de produtos sem serem *N* substituídos, uma vez que no primeiro passo reacional se dá uma tetra-alkilação nos ácidos barbitúricos não *N*-substituídos.⁶⁸



Esquema 1.7 - Síntese de espirociclopentenos por uma RCM do barbitúrico 5,5-dialilo.⁶⁸

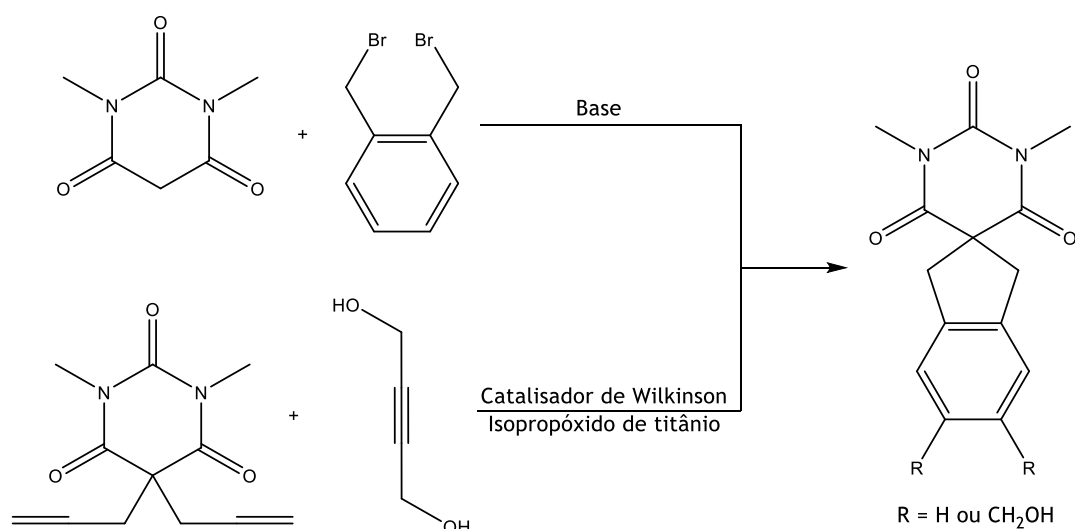
Tendo sido já aqui demonstrada a formação e das 5-benzilidenopirimidinas, Adib *et al.* apresentaram uma síntese de espirociclopentadienos a partir dos intermediários anteriormente mencionados. Estes autores basearam-se numa reação multi-componente (MCR - do inglês, *Multi-Component Reaction*) que consiste na formação inicial da 5-benzilidenopirimidina com posterior adição *in situ* de um diacilacetileno na presença de trifetilfosfina. Estes dois últimos componentes formam um intermediário zwitteriónico que permite o ataque nucleófilo ao benzilideno, com posterior ciclização no espiro pretendido (esquema 1.8), com rendimentos superiores a 90%.⁷⁰



Esquema 1.8 - Síntese dos espirociclopentadienos por adição *in situ* do diaroilacetileno à 5-benzilidenopirimidina intermediária, na presença de trifetilfosfina.⁷⁰

1.3.2.2 Espiroindanos, espiroindenos e espirociclopentaquinolinas (espiros com anéis de 5 sem heteroátomos com anéis B ou B e C)

Uma das primeiras abordagens para a formação de pirimidoespiroindanos foi descrita por Singh *et al.*⁶⁴ Estes autores basearam-se no mesmo método descrito para a formação de espirociclopentanos,^{64, 65} alterando o brometo utilizado com base na reação de ciclização do 1,2-bis(bromometil)benzeno com o ácido barbitúrico em meio básico, formando-se o espiroindano correspondente (esquema 1.9) com rendimento de 60%.⁶⁴

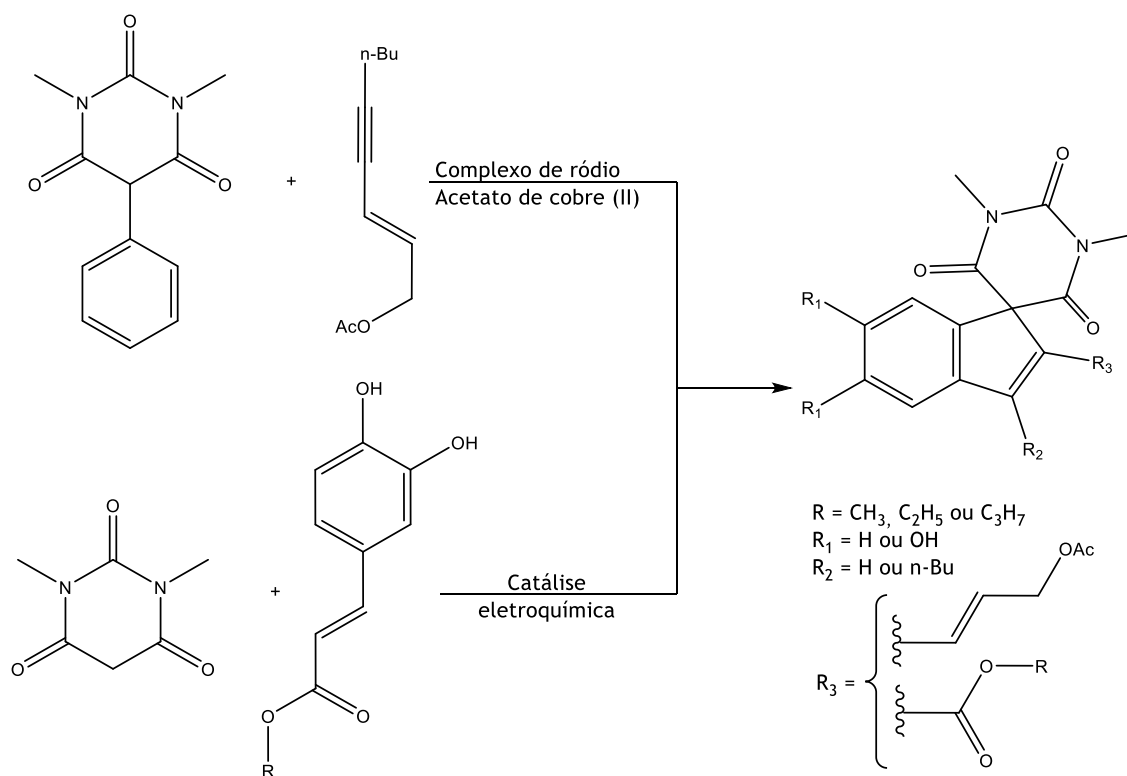


Esquema 1.9 - Síntese de pirimidoespiroindanos pelas diferentes vias sintéticas descritas na literatura a partir do 1,2-bis(bromometil)benzeno⁶⁴ ou do barbiturato 5,5-diino com o 2-butino-1,4-diol.⁷¹

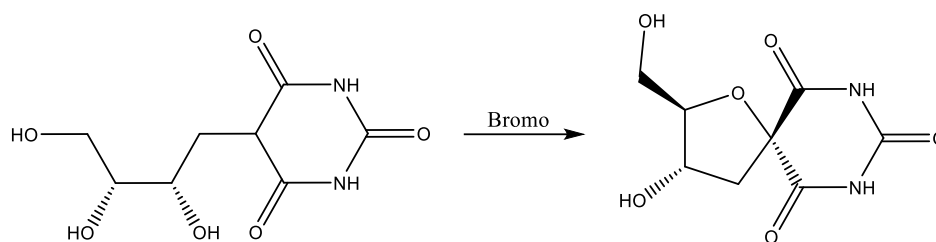
Para a obtenção deste tipo de anéis, Kotha *et al.* propuseram igualmente um tipo de reação diferente, isto é, após a formação de um barbiturato 5,5-dissubstituído a partir de um brometo e um ácido barbitúrico (referido em 1.3.2.1 - esquema 1.7), é promovida a cicloadição do diino formado ao 2-butino-1,4-diol na presença de catalisador de Wilkinson e uma quantidade catalítica de isopropóxido de titânio (esquema 1.9). Depois de submetidas a diversas reações, foi ainda descrita a obtenção de um segundo anel aromático no lugar do diol presente no espiroindano apresentado, levando à formação de um espirociclopentanaftaleno.⁷¹

Comparando os dois métodos apresentados, o primeiro permite uma síntese mais fácil e rápida para o núcleo pirimidoespiroindano, embora os dióis presentes no segundo como grupos substituintes permitam uma maior facilidade de manipulação da molécula em posteriores modificações.

Para a formação de outros espiroindenos (esquema 1.10), Burns *et al.* descreveram outra via sintética a partir de 5-arylpirimidinas. Estas, após submetidas a uma reação com a 1,3-enina (acetato de non-2-en-4-in-1-ilo) com catálise de ródio (III) [cloreto de pentametilciclopentadienilródio(III)] e acetato de cobre (II), formam os respetivos espiroindenos com rendimentos superiores a 82%. Estes autores, mencionam ainda a possibilidade de formação de produtos secundários nestas reações, como é exemplo o derivado espiro-naftaleno (anel de 6 membros análogo ao anel de 5 aqui descrito).⁷²

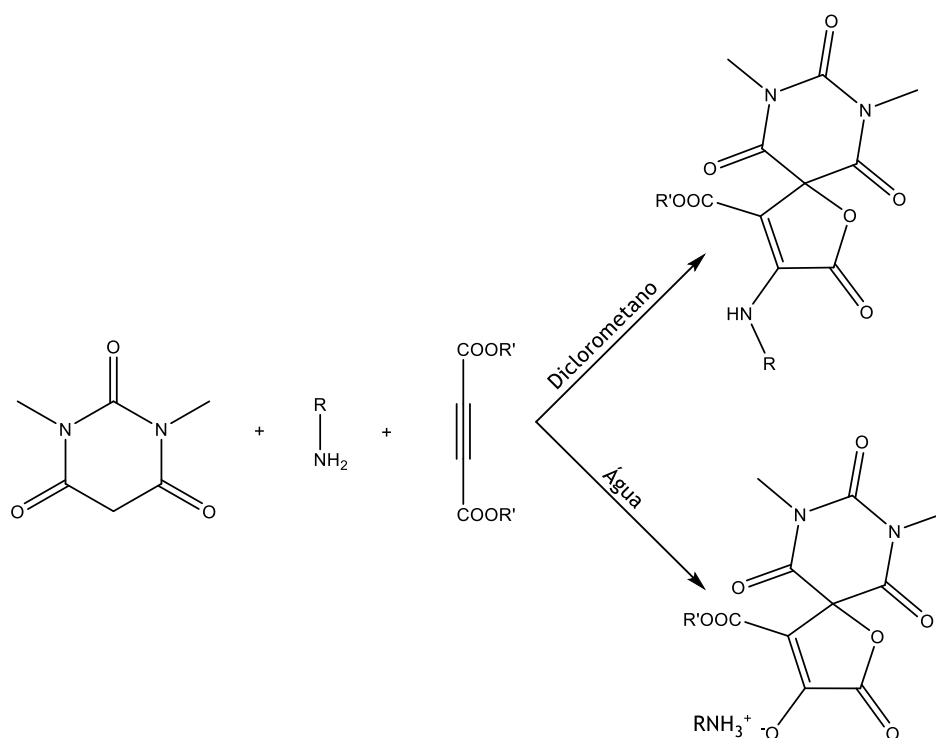


Esquema 1.10 - Síntese de pirimidoespiroindenos pelas diferentes vias sintéticas descritas na literatura a partir da reação do 5-fenilbarbiturato com o acetato de non-2-en-4-in-1-ilo,⁷² ou do ácido barbitúrico com os ésteres derivados do ácido cafeico.⁷³



Esquema 1.12 - Síntese do pirimidospironucleósido por bromação do triálcool.⁶⁶

Posteriormente, Teimouri *et al.* descreveram a formação de pirimidospirofuranos recorrendo a dois métodos de MCR com os mesmos materiais de partida (esquema 1.13).^{75, 76} O primeiro descreveu a formação dos compostos espiros a partir do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico, uma amina primária e um acetilenodicarboxilato de dialquila em diclorometano, com rendimentos entre 89 e 93%.⁷⁵ No segundo método, apenas foi alterado o solvente reacional para água, originando um espirofurano na forma de sal, com rendimentos entre 70 e 98%.⁷⁶



Esquema 1.13 - Síntese de pirimidospirofuranos a partir do ácido barbitúrico, uma amina e um acetilenodicarboxilato em meio básico e diclorometano⁷⁵ ou água.⁷⁶

1.3.2.4 Espirofuranos fundidos com ácidos (tio)barbitúricos e espirodioxolopiranos derivados da galactopirranose (espiros com anéis de 5 com oxigénio e anel B)

Os espirofuranos com anel B fundido correspondente a um ácido (tio)barbitúrico incluem dois tipos de compostos, designadamente dímeros e trímeros, sendo as MCR essenciais para a sua obtenção.

Em 1979, Kato *et al.* descreveram a síntese de um espirofurano com trímero de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (figura 1.8), por eletro-oxidação do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico, na presença de ácido acético.⁷⁷ Mais tarde, Jursic *et al.* voltaram a citar esta molécula e apresentam uma síntese alternativa em clorofórmio, com ácido 1,3-dimetilbarbitúrico e bromo molecular.⁷⁸ Em 2011, Jalilzadeh *et al.* descreveram a formação do trímero, com a reação do ácido anteriormente referido com brometo de cianogênio em metanol⁷⁹ ou água⁸⁰ e acetona, na presença de trietilamina ou pirimidina. Estes autores referiram não se verificar a formação dos trímeros quando utilizado o ácido barbitúrico ou 1-metilbarbitúrico.⁷⁹

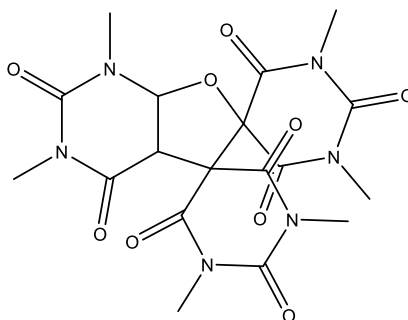
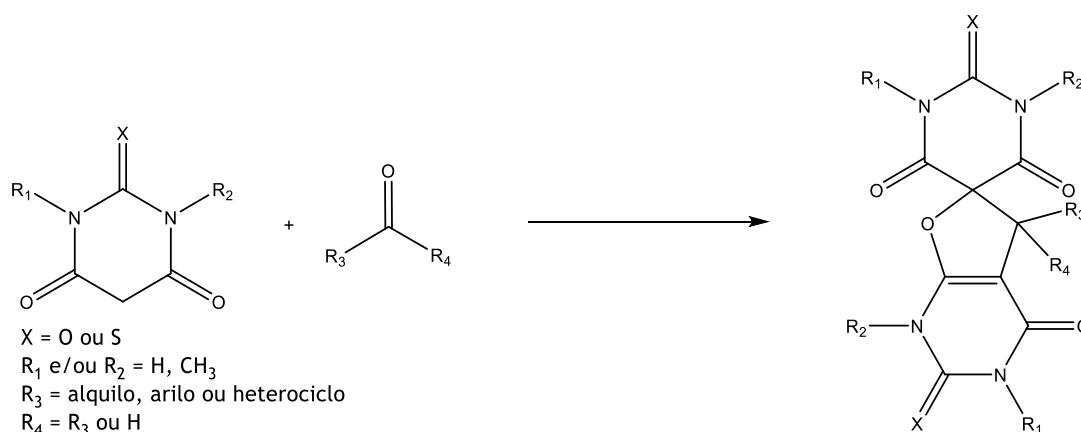


Figura 1.8 - Espirofurano com trímero de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico.⁷⁷

Os primeiros espirofuranos com dímeros de ácido barbitúrico foram obtidos por Jursic *et al.* em 2004 (esquema 1.13),⁷⁸ sendo as condições reacionais conducentes a estes espiros largamente exploradas desde então. Estes autores descreveram a síntese dos dímeros a partir de dois equivalentes do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico e um equivalente do 4-piridinocarboxaldeído em ácido trifluoroacético, metanol e bromo molecular, com rendimentos superiores a 85%.⁷⁸

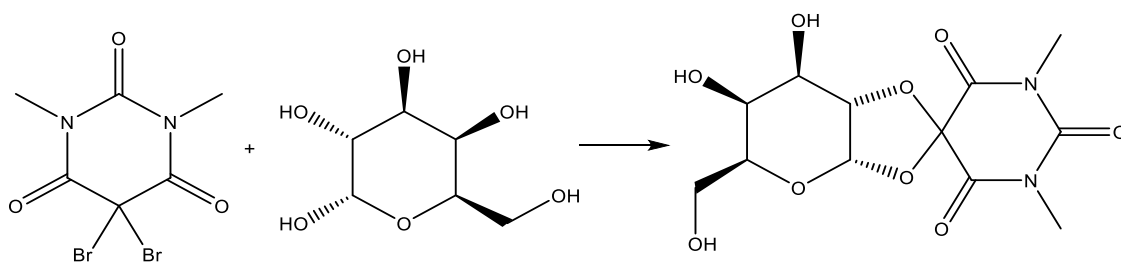


Esquema 1.14 - Síntese geral dos espirofuranos com dímeros de ácido barbitúrico a partir de aldeídos ou cetonas.

Elinson *et al.* descreveram dois métodos a partir, uma vez mais, de dois equivalentes de um ácido barbitúrico e um de aldeído (benzaldeídos substituídos). No primeiro método foi utilizado etóxido de sódio em etanol numa primeira instância e bromo numa segunda, enquanto no outro método foi utilizado apenas etanol inicialmente e de seguida é adicionado bromo em água. Comparativamente, o primeiro método demonstrou rendimentos superiores a todos os outros. Apesar de se tratar de uma MCR, os autores descreveram a formação inicial do derivado 5-benzilideno por uma reação de Knoevenagel com posterior adição de Michael do segundo ácido barbitúrico, seguida de bromação e ciclização para formar o espiro dímero de ácido barbitúrico.⁸¹⁻⁸³

De modo a verificar a influência de utilização de barbitúricos assimétricos, Jalilzadeh *et al.* submeteram o ácido 1-metilbarbitúrico a um aldeído, brometo de cianogénio e trietilamina ou piridina em metanol, tendo-se verificado a possibilidade de formação de uma mistura de 4 tautómeros. Por outro lado, os aldeídos aromáticos demonstraram-se mais reativos que os aldeídos alifáticos.⁷⁹ Mais tarde, foram levadas a cabo várias alterações, nomeadamente a substituição do metanol por etanol e do ácido 1-metilbarbitúrico pelo barbitúrico e tiobarbitúrico, observando-se a formação de apenas um dímero.⁸⁴⁻⁸⁶ Alterando o ácido tiobarbitúrico por um dissustituído, Jalilzadeh verificou ainda a formação de um tetrâmero, quando o aldeído utilizado era o *m*- ou *p*-ftalaldeído.⁸⁶ Recorrendo às condições anteriormente mencionadas, com alteração do aldeído para uma cetona e o solvente de metanol para água, Hosseine *et al.* comprovou igualmente a formação dos dímeros. No entanto, a formação de trímeros também foi verificada para estas condições reacionais, não sendo verificados para barbituratos que não os *N,N*-dimetílicos.⁸⁰ Por fim, foi descrito um método com base igualmente numa MCR alterando o bromo por iodo molecular em água com excelentes rendimentos.⁸⁷

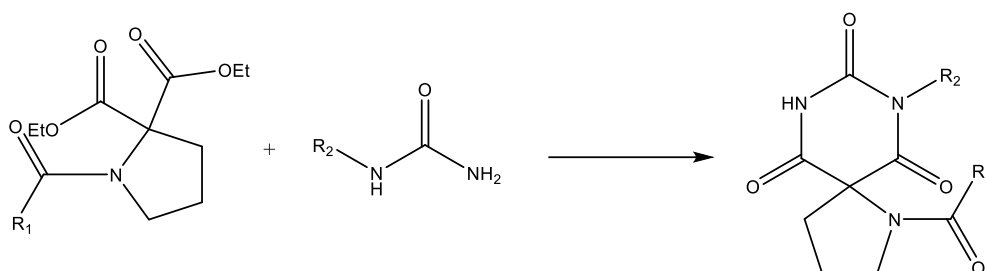
Uma abordagem não muito diferente das anteriores foi proposta por Ingle *et al.* para a formação de espirodioxolopiranos. Esta inicia-se com o ácido barbitúrico 5,5-dibromado, ao qual é adicionada a galactopiranosose (esquema 1.15), com formação de um espirodioxolopirano derivado da galactopiranosose. Estas moléculas foram testadas como antibacterianas e antifúngicas, observando-se atividades muito próximas das observadas com os fármacos utilizados como referências.⁸⁸



Esquema 1.15 - Síntese de dioxolopiranos derivados da galactopiranosose a partir da reação desta com o ácido barbitúrico 5,5 dibromado.⁸⁸

1.3.2.5 Espiropirrolidinas e espirotetrahidropirrolotiazóis (espiros com anéis de 5 com azoto, na presença ou não de anel B)

A formação de espiropirrolidinas foi descrita inicialmente por Ambrozak *et al.* ao mencionarem a reação de um derivado de malonato de dietilo com a ureia monossubstituída em etóxido de sódio e etanol (esquema 1.16).⁸⁹ Mais tarde, Lomlim *et al.* reportaram a mesma síntese com *tert*-butóxido de potássio e dimetilsulfóxido (DMSO).⁹⁰ Recentemente, Freeman-Cook *et al.* descreveram a mesma reação utilizando hidreto de sódio e DMSO. Este autor narrou ainda a potencialidade destes espiros (figura 1.9) serem inibidores da MMP-13, com elevada seletividade para esta em relação a outras MMP.⁹¹



Esquema 1.16 - Síntese de espiropirrolidinas a partir de uma ureia monossubstituída e do derivado de malonato de dietilo.⁹¹

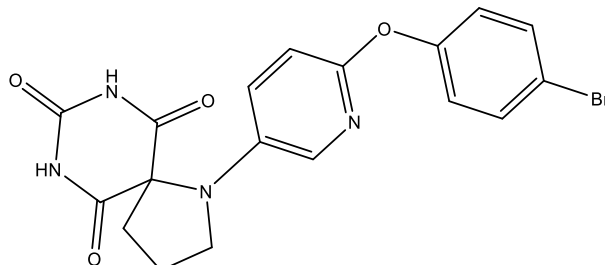
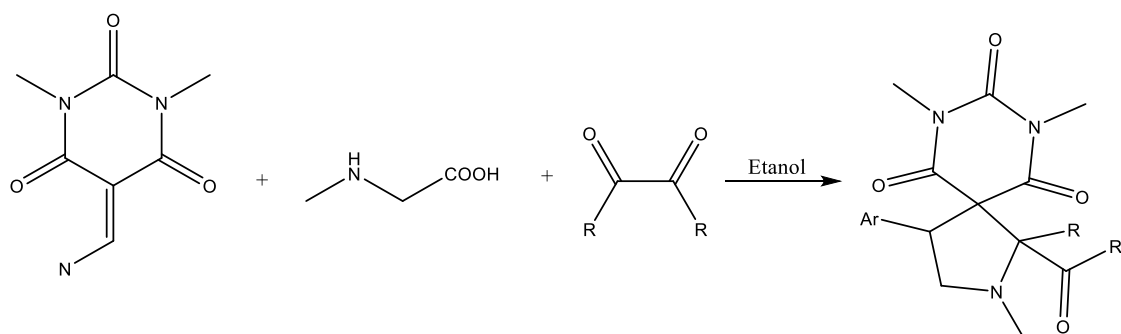


Figura 1.9 - Espiropirrolidina inibidora seletiva da MMP-13.⁹¹

Huang *et al.*⁹² e, mais tarde, Hu *et al.*⁹³ descreveram a formação de outro tipo de espiropirrolidinas a partir de um derivado 5-arylideno, uma 1,2-dicetona e sarcosina em etanol (esquema 1.17). Enquanto as sínteses anteriores permitiram a formação de espiropirrolidinas com o átomo de azoto na posição 2 em relação ao átomo que dá origem ao espiro, estes métodos dão origem a pirrolidinas com o azoto na posição 3. Para além desta síntese, estes autores descreveram igualmente a síntese de espirotetrahidropirrolotiazóis com a substituição da sarcosina por *L*-thioprolina.^{92, 93}

Outro método para a síntese das pirrolidinas anteriormente referidas foi proposto por Zhao *et al.* a partir de um arilideno por reação com um derivado do oxoindole 3-isocianato em

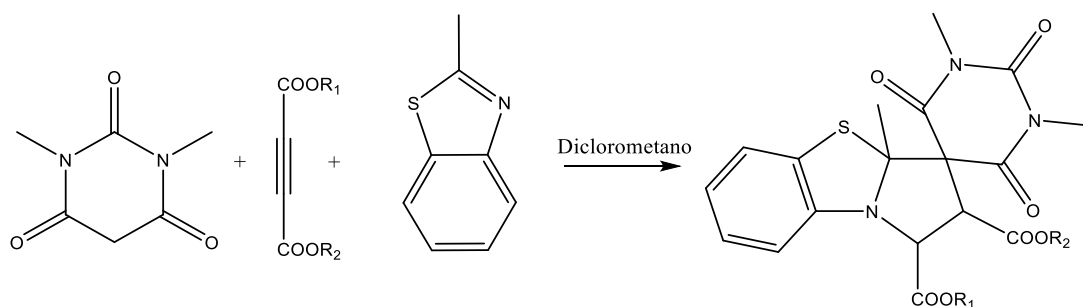
diclorometano, na presença de uma quantidade catalítica de trietilamina, com rendimentos de 53 a 99%.⁹⁴



Esquema 1.17 - Síntese de espiropirrolidinas a partir de um 5-arilideno, uma 1,2-dicetona e sarcosina.

1.3.2.6 Espirobenzopirrolotiazóis (espiros com anéis de 5 com azoto e anel B e C)

Os únicos autores a descreveram a formação de espirobenzopirrolotiazóis, foram Nassiri *et al.* em 2015. Estes autores descreveram uma MCR com o ácido 1,3-dimetilbarbitúrico, um éster acetilénico e o 2-metilbenzotiazole em diclorometano à temperatura ambiente (esquema 1.18) com rendimentos de 86 a 91%.⁹⁵

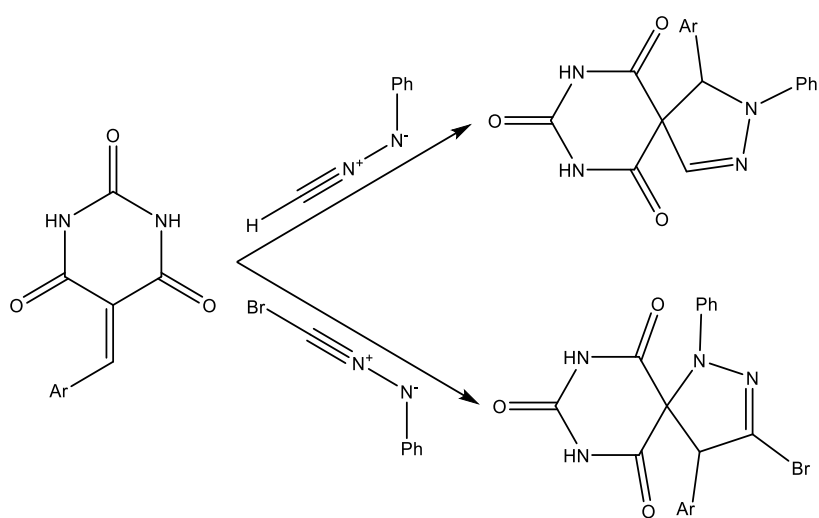


Esquema 1.18 - Síntese de espirobenzopirrolotiazóis por uma MCR, a partir do ácido barbitúrico, um éster acetilénico e o 2-metilbenzotiazole.⁹⁵

1.3.2.7 Espiropirazóis (espiros com anéis de 5 com dois azotos)

Galati *et al.*⁹⁶ e depois Foti *et al.*,⁹⁷ descreveram pela primeira vez a formação de derivados de pirimidoespiropirazóis. Esta síntese baseou-se na adição de uma 5-benzilidenopirimidina a uma nitrilimina (esquema 1.19). A natureza desta última é determinante para a obtenção dos espiros 2,3 ou 3,4-diaza com rendimentos moderados a baixos.^{96, 97} Galati *et al.* relataram ainda algumas propriedades farmacológicas destes espiros, apresentando valores de dose letal em

50% da população (DL₅₀) entre 150 e 200 mg/Kg em ratos. Foram ainda testadas as suas atividades anticonvulsivantes e efeitos sedativos, tendo-se demonstrado proteção para as convulsões tónicas e clónicas, e um aumento do tempo induzido de sono quando administrados em combinação com o pentobarbital, potenciando a atividade deste barbiturato. Recentemente, Girgis *et al.* relataram a mesma formação dos espiropirazóis 2,3-diaza, demonstrando que estes potenciam a atividade hipnótica do tiopental quando administrados em conjunto.⁹⁸

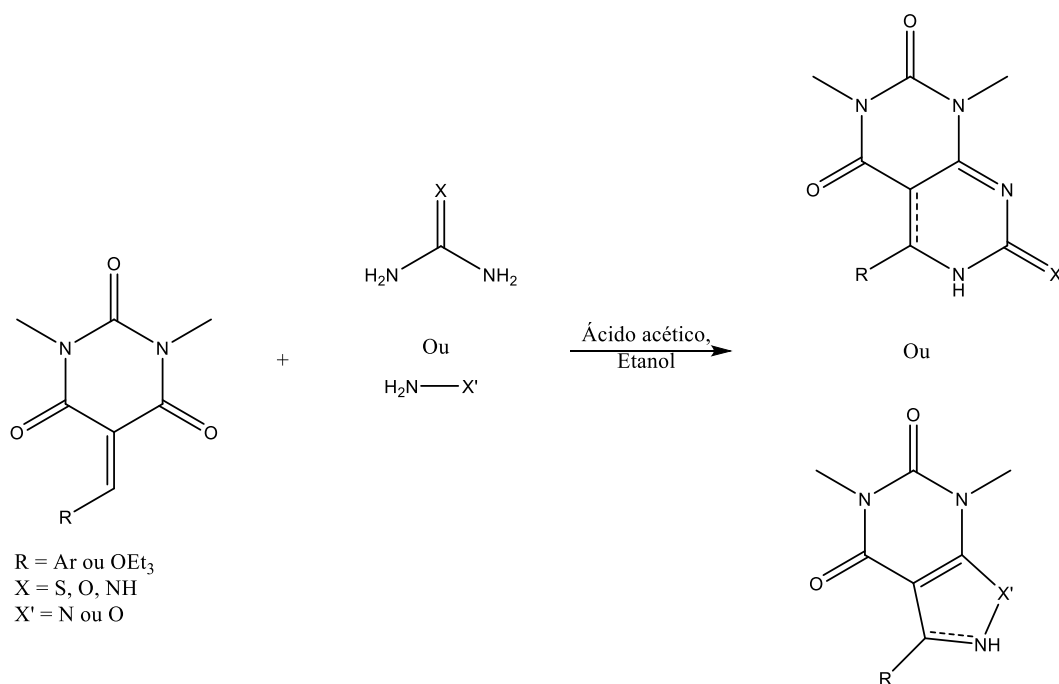


Esquema 1.19 - Síntese dos espiros 2,3 e 3,4-diaza a partir do 5-benzilideno e das nitrilimas.

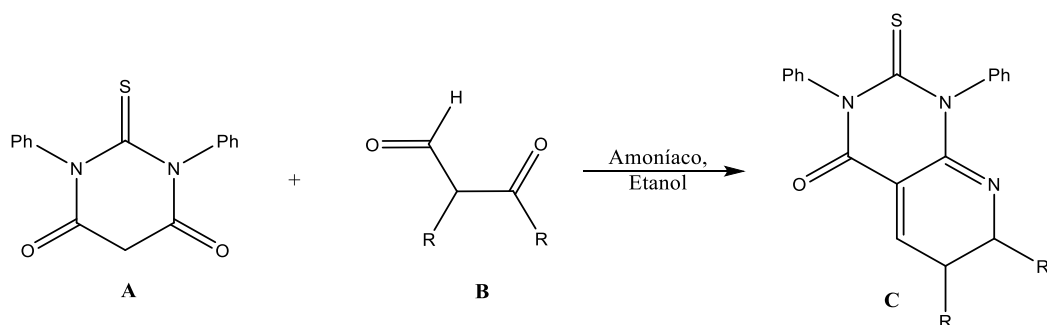
1.3.3 Ciclizações em C5-C6

Tendo em conta que o objetivo inicial para este trabalho de dissertação era a obtenção de anéis fundidos (com destaque para os de 7 membros) com os C5-C6 de ácidos (tio)barbitúricos, é aqui revista as reações que envolvem este tipo de ciclizações. Neste âmbito, têm sido reportadas várias destas ciclizações, nomeadamente adição de derivados destes ácidos 5-metilidenos à tiourea, ureia, guanidina, hidrazina ou hidroxilamina em ácido acético e etanol, formando as respetivas pirimidopirimidinas, pirazolopirimidinas ou isoxalotopirimidinas (esquema 1.20). Os ácidos 5-metilidenos mencionados podem ser formados tanto por reação do ácido barbitúrico com um benzaldeído, como com *o*-formiato de trietilo.^{99, 100} Outras abordagens substituíram o ácido acético por uma mistura de ácido acético/acetato de amónio.^{99, 101}

Exemplos de outras abordagens de ciclizações análogas, é o método descrito por Kumar *et al.* em que foi adicionado um 2-oxoaldeído ao ácido 1,3-difeniltioarbitúrico em amoníaco e etanol (esquema 1.21), com rendimentos entre 68 e 82%.¹⁰²



Esquema 1.20 - Síntese de pirimidopirimidinas, pirazolopirimidinas ou isoxazolopirimidinas a partir de 5-metilidenopirimidinas e respetiva diamina ou hidroxilamina.



Esquema 1.21 - Síntese de piridinopirimidinas a partir da reação com um 2-oxoaldeído.¹⁰²

Estas ciclizações permitem a obtenção de moléculas similares estruturalmente a outras moléculas com potenciais terapêuticos, como é o caso do alopurinol, um inibidor bem conhecido da XO. Adicionalmente, pode-se constatar a semelhança estrutural com os compostos AR-C155858 e AR-C117977 (figura 1.10) descritos e patenteados como inibidores do transportador de monocarboxilato 4 (MCT4 - do inglês, monocarboxylate transporter 4).¹⁰³ Este é um transportador de lactato do meio intracelular para o meio extracelular, tendo demonstrado uma expressão aumentada em cancros humanos. O lactato, uma vez no meio extracelular, leva à acidificação do meio, com supressão das defesas imunitárias e favorecimento da invasão tumoral,^{104, 105} sendo relevante a inibição do MCT4 no tratamento do cancro.¹⁰⁴

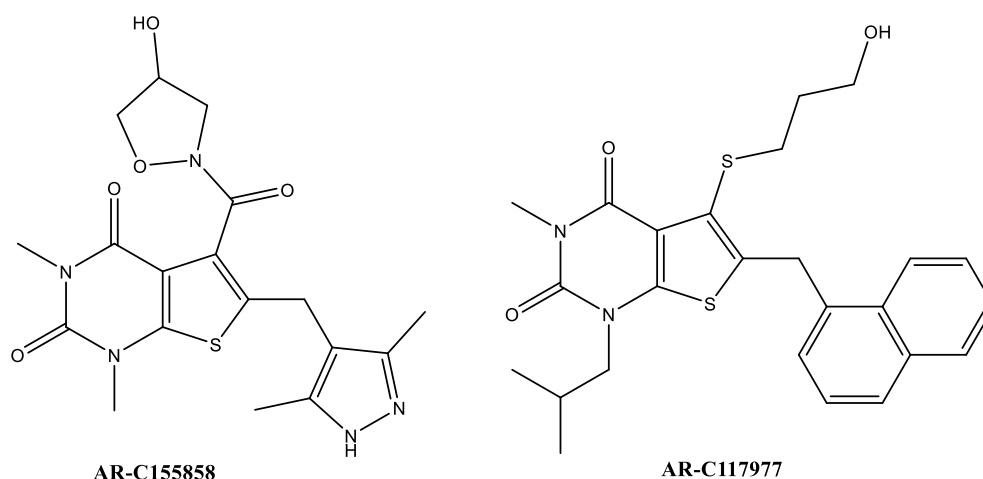


Figura 1.10 - AR-C155858 e AR-C117977 descritos e patenteados como inibidores da MCT4.¹⁰³

1.4 Objetivos

Foram objetivos deste trabalho de dissertação:

- A síntese e caracterização espectroscópica de novos (tio)barbituratos potencialmente bioativos, incluindo derivados heterocíclicos obtidos por fusão de anéis em C5-C6 (com destaque para os de 7 membros) não conseguidos e por ciclização a partir do C-5 com formação de novos espiro(tio)barbituratos.
- A avaliação biológica dos (tio)barbituratos sintetizados, nomeadamente determinação do seu potencial de inibição da enzima XO, capacidade antioxidante, antimicrobiana e a atividade antiproliferativa em diversas linhas celulares.
- Complementar os ensaios biológicos por estudos *in silico*, sempre que possível.

Capítulo 2 - Resultados e Discussão

2.1 Síntese

Neste subcapítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na preparação e na tentativa de preparação de novos derivados pirimidínicos, incluindo os seus precursores.

Desta forma, de 2.1.1 a 2.1.4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos na síntese e caracterização dos precursores 5-benzilidenopirimidinas, 5-fenilaminometilenopirimidinas e 5-felinilcianometilpirimidinas, fazendo-se uma breve referência às várias abordagens realizadas ao longo desta dissertação para uma melhor compreensão da evolução dos estudos realizados com vista à obtenção destes precursores.

No final, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas tentativas de síntese de pirimidodiazepinas, pirimidoxazepinas e pirrolopirimidinas, bem como na síntese conseguida de novos pirimidoespiroindóis e pirimidoespiroindolinas, e aos quais se devota aqui uma especial atenção.

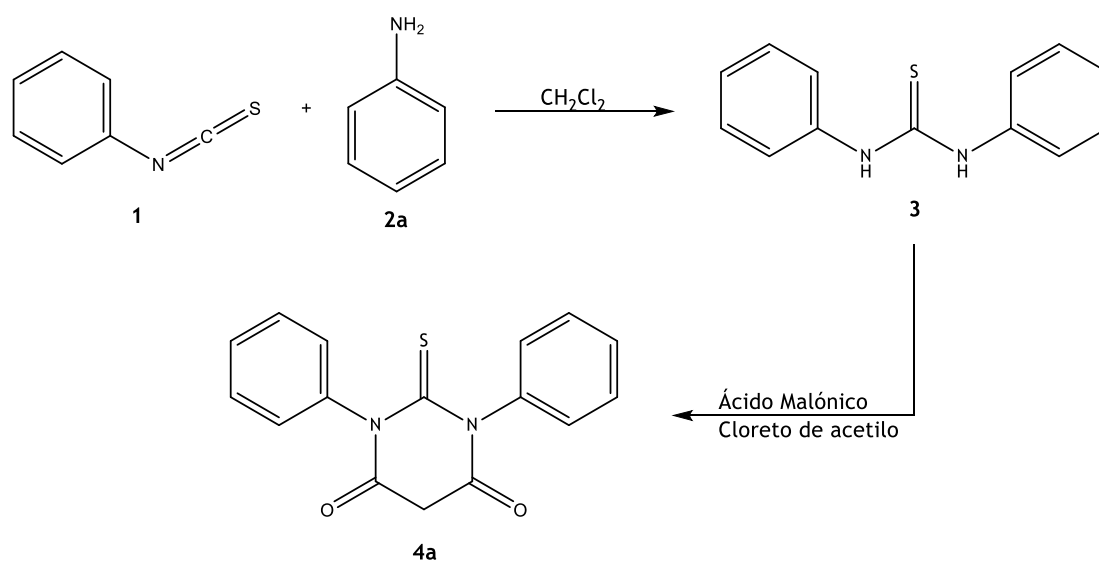
De uma forma geral, nas tabelas de RMN de ^1H (Ressonância Magnética Nuclear de ^1H) são apresentados a multiplicidade do sinal [s (singuleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), dt (duplo triplete) ou m (multiplete)], a intensidade relativa (nH, como número de prótons), a constante de acoplamento [J, em Hertz (Hz)] e a atribuição do próton na molécula. Para RMN de ^{13}C (Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C) é apresentado o desvio químico [δ , em partes por milhão (ppm)] e a atribuição do carbono na molécula. Os sinais característicos de cada molécula em particular e/ou não identificados são apresentados como “outros sinais”. Esta atribuição foi, em alguns casos, inequivocamente estabelecida com o apoio da técnica de intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização (DEPT- do inglês, *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*), tal como dos espetros 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*), sendo utilizados para este efeito os solventes DMSO- d_6 (dimetilsulfóxido hexadeuterado) ou CDCl_3 (clorofórmio deuterado). Para os espetros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR - do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*), as bandas características foram atribuídas de acordo com o descrito na literatura.¹⁰⁶ Adicionalmente e para uma rápida compreensão das estruturas mencionadas durante a discussão foram estabelecidos auxiliares de estruturas, os quais poderão ser encontrados e consultados nos anexos 1, 2 e 3.

2.1.1 Ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico

A síntese do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**) teve como finalidade a sua utilização como precursor na síntese das 5-benzilidenopirimidinas, 5-fenilcianometilpirimidinas e 5-fenilaminometileno-pirimidinas.

A obtenção da tioureia **3** a partir da anilina (**2a**) e do fenilisotiocianato (**1**) realizou-se de acordo com Lu *et al.* (esquema 2.1).¹⁰⁷ Este método permite um isolamento do produto de uma forma fácil e rápida, uma vez que precipita ao longo da sua formação, obtendo-se um elevado grau de pureza e rendimento (95% - tabela 2.1).

Depois de isolada, a 1,3-difeniltioureia (**3**) foi submetida a uma ciclização com o ácido malónico e cloreto de acetilo, de acordo com o método descrito por Henda Schulte.³³ Apesar de ser necessária uma posterior recristalização em ácido acético, este método permite a obtenção do ácido 1,3-difenilbarbitúrico (**4a**) com um elevado rendimento (95%), registando-se um rendimento global de 90%.



Esquema 2.1 - Síntese do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**).

Tabela 2.1 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para a tioureia **3** e ácido tiobarbitúrico **4a**.

Composto	FTIR (bandas características em cm^{-1})	Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Literatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimento (%)
3	3202 (N-H) 1598 (C=C)	142-144	140-142 ¹⁰⁸	95%
4a	1727 e 1707 (C=O) 1594 (C=C)	252-253	258-259 ^{33, 109}	95%

Os pontos de fusão dos compostos obtidos encontram-se genericamente de acordo com a literatura, apresentando pequenos intervalos de fusão o que indica a ausência de impurezas (tabela 2.1).

Os espectros de FTIR apresentam evidências da formação do ácido tiobarbitúrico **4a** pelo desaparecimento da banda da ligação amino da tiourea **3** a 3202 cm^{-1} e pelo aparecimento das bandas características dos grupos carbonilo a 1727 e 1707 cm^{-1} .

À semelhança dos espectros de FTIR, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C evidenciam a formação do ácido tiobarbitúrico **4a**. Como esperado, verifica-se a ausência do sinal relativo ao próton amino da tiourea **3** a $9,79\text{ ppm}$, a presença dos sinais do tiobarbitúrico **4a** relativos aos carbonilos a $163,32\text{ ppm}$ e ainda os sinais relativos ao metileno a $4,10$ e $41,23\text{ ppm}$ nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respetivamente (tabela 2.2 e 2.3). De destacar que os sinais observados para o **4a** estão de acordo com a literatura,¹⁰⁸ à exceção do sinal que se encontra a $7,33\text{ ppm}$ na forma de tripleto, correspondente aos carbonos $3'$ e $5'$, estar descrito como multiplete, facto este que pode ser explicado pelo uso de espectrómetros diferentes, nomeadamente 300 MHz ¹⁰⁸ versus 400 MHz no trabalho descrito nesta dissertação.

Tabela 2.2 - RMN de ^1H da tiourea **3** e ácido tiobarbitúrico **4a**.

Composto	1 e 3 NH	2' e 6'-ArCH (J em Hz)	3' e 5'-ArCH (J em Hz)	4'-ArCH (J em Hz)	5-CH ₂
3	9,79 (s, 2H)	7,48 (d, 4H, J = 7,4)	7,33 (t, 4H, J = 8,2, 7,6)	7,12 (t, 2H, J = 7,4)	a)
3 (Lit. ¹⁰⁸)	9,79 (s, 2H)	7,48 (d, 4 H, J = 7,9)	7,30 - 7,36 (m, 4H)	7,12 (t, 2 H, J = 7,5)	a)
4a	a)	7,21 (d, 4H, J = 7,3)	7,55 - 7,41 (m, 6H)		4,10 (s, 2H)

a) Não aplicável

Tabela 2.3 -RMN de ^{13}C da tiourea **3** e ácido tiobarbitúrico **4a**.

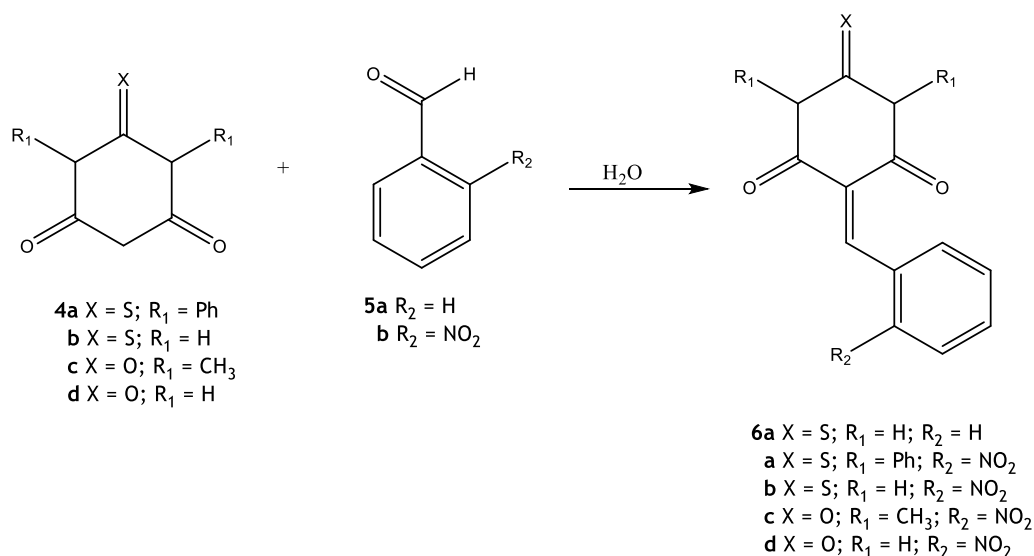
Composto	2-C _S	4, 6-C _O	1'-ArC	2', 3', 5' e 6'-ArCH	4'-ArCH	5-CH ₂
3	179,63	a)	139,46	128,45 e 123,66	124,44	a)
3 (Lit. ¹⁰⁸)	179,67	a)	139,49	128,50 e 123,72	124,20	a)
4a	181,64	163,32	138,75	129,68 e 128,64	129,20	41,23

a) Não aplicável

2.1.2 5-Benzilidenopirimidinas

A síntese da 5-benzilideno-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**6a**) teve como objetivo a sua utilização como precursor na síntese de pirimidodiazepinas, enquanto as 5-benzilidenopirimidinas **6b-e** serviram de precursores na síntese dos pirimidoespiroindóis.

A obtenção das 5-benzilidenopirimidinas **6** envolve uma reação do tipo Knoevenagel que, neste caso particular, consiste na adição de um benzaldeído **5** a um ácido (tio)barbitúrico **4** (esquema 2.2). Para esta síntese foi escolhido um método que envolve um procedimento experimental simples e com utilização de água como solvente reacional. Este método foi adaptado de Deb *et al.*,⁵⁰ aumentando-se a temperatura reacional para a temperatura de refluxo. Uma vez mais, o produto precipita ao longo da sua formação, o que permite um isolamento fácil e rápido, obtendo-se rendimentos excelentes (90 - 97% - tabela 2.4). De referir que os grupos R_1 da estrutura não parecem ter grande influência neste parâmetro, ao contrário do calcogénio X, sendo que o rendimento parece estar favorecido quando X=O (barbitúricos).



Esquema 2.2 - Síntese das 5-benzilidenoprimidinas **6**.

Os pontos de fusão dos compostos obtidos encontram-se genericamente de acordo com a literatura, apresentando pequenos intervalos de fusão o que indica a ausência de impurezas (tabela 2.4).

Os espectros de FTIR dos compostos **6** apresentam as bandas características esperadas (tabela 2.4). De destacar a presença das bandas entre 3255 e 3138 cm^{-1} representativas das ligações N-H, o que revela campos baixos para estas vibrações. Isto poderá ser explicado pela ressonância do anel e/ou pela participação destes prótons em pontes de hidrogénio intermoleculares. Não

obstante, verifica-se a presença característica de três bandas para as vibrações do grupo nitro quando o R₁ é metilo ou fenilo e de apenas duas bandas em detrimento do hidrogénio.

Tabela 2.4 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para as 5-benzilidenopirimidinas **6a-e**.

Composto	X	R ₁	R ₂	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	Rendimento (%)
6a	S	H	H	3198 e 3138 (N-H) 1722 e 1660 (C=O) 1197 (C=S)	264-266	267-270 ¹¹⁰	91
6b	S	Ph	NO ₂	1717 e 1691 (C=O) 1520, 1353 e 1325 (NO ₂) 1265 (C=S)	235 dec.	232 ¹¹¹	90
6c	S	H	NO ₂	3255 e 3156 (N-H) 1718 e 1692 (C=O) 1513 e 1351 (NO ₂) 1203 (C=S)	239-241	246-250 ¹¹⁰	90
6d	O	CH ₃	NO ₂	1663 (C=O) 1518, 1342 e 1323 (NO ₂)	158-159	159-161 ¹¹²	97
6e	O	H	NO ₂	3230 (N-H) 1739 e 1676 (C=O) 1516 e 1341 (NO ₂)	274-275	274-276 ¹¹⁰	97

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C das 5-benzilidenopirimidinas **6a-e** apresentam todos os sinais esperados (tabelas 2.5 e 2.6). De destacar a simetria verificada para os prótons 3', 5' e 2', 6' do **6a** no espectro de RMN de ¹H, a qual não é verificada no espectro de RMN de ¹³C. De salientar ainda que os substituintes do anel pirimidínico não têm grande influência nos desvios químicos dos sinais espectroscópicos; o mesmo não acontece para o substituinte do benzilideno que, quando modificado, promove alterações significativas nos mesmos sinais. Isto pode ser verificado por comparação dos sinais do **6a** com **6b-e** e estes últimos entre si, nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C.

2.1.3 5-Fenilaminometilenopirimidinas

A síntese das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-d** teve como objetivo a sua utilização como precursores na síntese de pirimidodiazepinas e pirimidoxazepinas, enquanto as 5-fenilaminometilenopirimidinas **8e-k** foram sintetizadas com vista ao estudo da REA desta série de compostos, nas várias atividades biológicas testadas ao longo desta dissertação.

Tabela 2.5 - RMN de ^1H das 5-benzilidenopirimidinas **6a-e**.

Composto	5-C $\underline{\text{C}}\text{H}$	3'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$ (J em Hz)	5'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$ (J em Hz)	4'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$ (J em Hz)	2'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$ (J em Hz)	6'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$ (J em Hz)	Outros sinais
6a	5,95 (s, 1H)	7,18 (t, 2H, J = 7,5)		7,08 (t, 1H, J = 7,5)	7,02 (d, 2H, J = 8,1)		11,74 (s, 2H, 2 x NH)
6b	8,80 (s, 1H)	8,19 (d, 1H, J = 8,2)	a)	7,71 (t, 1H, J = 7,5)	b)	a)	7,59 (t, 2H), 7,45 (t, 2H), 7,40 - 7,28 (m, 6H), 7,20 (d, 2H)
6c	8,63 (s, 1H)	8,24 (dd, 1H, J = 8,3, 1,0)	7,80 (td, 1H, J = 7,6, 1,1)	7,72 - 7,66 (m, 1H)	b)	7,62 (dt, 1H, J = 7,7, 1,2)	12,56 (s, 1H, NH), 12,33 (s, 1H, NH)
6d	8,71 (s, 1H)	8,26 (dd, 1H, J = 8,3, 1,2)	7,80 (td, 1H, J = 7,6, 1,3)	7,69 (t, 1H, J = 7,7)	b)	7,53 (d, 1H, J = 7,8)	3,25 (s, 3H, N-CH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 3,06 (s, 3H, N-CH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)
6e	8,60 (s, 1H)	8,23 (d, 1H, J = 7,9)	7,79 (t, 1H, J = 7,4)	7,68 (t, 1H, J = 7,7)	b)	7,57 (d, 1H, J = 7,7)	11,49 (s, 1H, NH), 11,24 (s, 1H, NH)

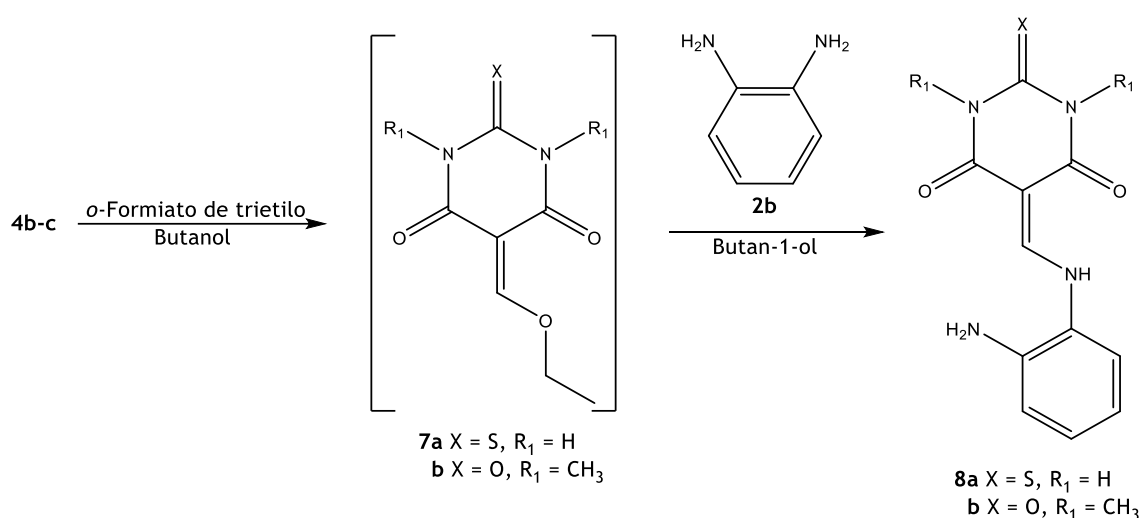
- a) Indefinido
b) Não aplicável

Tabela 2.6 - RMN de ^{13}C das 5-benzilidenopirimidinas **6a-e**.

Composto	2-C $\underline{\text{C}}$	4 e 6-C $\underline{\text{O}}$	5-C $\underline{\text{C}}\text{H}$	1'-Ar $\underline{\text{C}}$	2'-Ar $\underline{\text{C}}$	3'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$	4'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$	5'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$	6'-Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$	5-C $\underline{\text{C}}$	Outros sinais
6a	172,88 (C $\underline{\text{S}}$)	163,09	142,43	133,48	127,77	126,58	125,04	126,58	127,77	95,94	a)
6b	181,43 (C $\underline{\text{S}}$)	160,28 158,81	155,02	131,76	146,19	124,12	130,40	134,04	130,15	121,29	140,02 (Ar $\underline{\text{C}}$), 139,72 (Ar $\underline{\text{C}}$), 129,05 (Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$), 128,88 (Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$), 128,84 (Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$), 128,83 (Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$), 128,27 (Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$), 128,10 (Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$)
6c	179,05 (C $\underline{\text{S}}$)	160,63 159,18	153,31	131,57	146,28	124,08	130,48	133,77	130,39	120,60	a)
6d	151,10 (C $\underline{\text{O}}$)	161,20 159,96	153,65	132,01	146,15	124,06	130,09	133,90	130,02	120,14	28,44 (N-CH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) 27,82 (N-CH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)
6e	150,26 (C $\underline{\text{O}}$)	162,38 161,20	152,45	131,72	146,28	124,06	130,41	133,76	130,16	120,54	a)

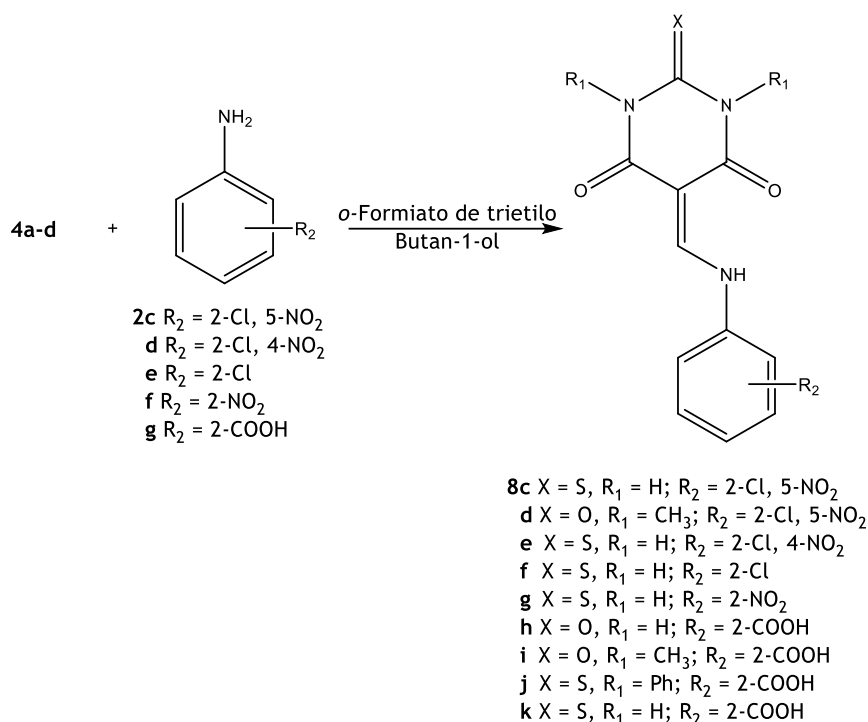
- a) Não aplicável

As 5-fenilaminometilenopirimidinas foram sintetizadas de acordo com Rauf *et al.*⁵⁴ alterando o solvente de butan-2-ol para butan-1-ol, o que permite um aumento da temperatura reacional dos 99 para os 118 °C. Para as 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-b** foi efetuada uma segunda adaptação, uma vez que a *o*-fenilenodiamina (**2b**) quando adicionada ao *o*-formiato de trietilo dá origem ao benzimidazole, impossibilitando a reação com os ácidos (tio)barbitúricos para a obtenção dos produtos pretendidos. A MCR foi alterada para uma reação em dois passos (esquema 2.3), permitindo inicialmente uma reação tipo Knoevenagel, com a adição do *o*-formiato de trietilo a um ácido (tio)barbitúrico **4b-c** em refluxo de butan-1-ol, formando-se os intermediários **7a-b**. Neste passo é acrescentada a anilina **2b** *in situ*, dando origem aos compostos **8a-b** formados por uma adição seguida de eliminação de etanol. Ao utilizar as anilinas **2c-g**, o problema referido anteriormente não se verificou, sendo possível a síntese das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-b** por MCR (esquema 2.4).



Esquema 2.3 - Síntese das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-b** e respetiva representação dos intermediários sintéticos **7a-b**.

Analogamente aos processos anteriores, este método de síntese permite isolar o produto de uma forma fácil e rápida. É ainda de salientar que a alteração do solvente de butan-2-ol para butan-1-ol permitiu otimizar os rendimentos reacionais dos compostos **8h** e **8k** de 72 e 89% para 84 e 97% respetivamente. Observa-se ainda a obtenção de muito bons a excelentes rendimentos (77 - 98%), verificando-se que o tiobarbitúrico parece favorecer o aumento do rendimento em relação ao barbitúrico (tabela 2.4). Não obstante, os (tio)barbitúricos *N,N*-dissubstituídos com grupos mais volumosos que o hidrogénio parecem desfavorecer o rendimento reacional.



Esquema 2.4 - Síntese das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8c-k** por MCR dos ácidos (tio)barbitúricos **4a-d**, as anilinas **2c-g** e *o*-formiato de trietilo em butan-1-ol .

Com exceção do **8b**, todos as 5-fenilaminometilenopirimidinas descritos na literatura apresentam pontos de fusão superiores aos descritos, o que indica um maior grau de pureza. Não obstante, todos apresentam pequenos intervalos de fusão (tabela 2.7).

Os espectros de FTIR das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8** apresentam as bandas características esperadas, salvo raras exceções (tabela 2.7). De evidenciar a ausência da banda característica das ligações N-H referentes ao grupo aminometileno, o que poderá ser explicado pela sua participação em pontes de hidrogénio intramoleculares, formando um anel de seis membros com o carbonilo vicinal, já descrito por Teimouri *et al.*¹¹³ (figura 2.1 - A). Esta hipótese pode ainda ser apoiada pela distância de 2.1 Å entre o hidrogénio e o oxigénio supramencionados, calculada para o **8a**, a título exemplificativo, através do software ChemBioDraw 3D da Cambridge Software (figura 2.1 - B). Para as pontes de hidrogénio do tipo N-H---O=C, está descrita uma distância ótima entre 1.5 e 2.2 Å,¹¹⁴ estando a distância calculada dentro deste intervalo.

Tabela 2.7 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para as 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-k**.

Composto	X	R ₁	R ₂	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	Rendimento (%)
8a	S	H	2-NH ₂	3429 e 3342 (NH ₂) 1688 (C=O) 1162 (C=S)	247-249	a)	81
8b	O	CH ₃	2-NH ₂	3393 e 3331 (NH ₂) 1713 e 1644 (C=O)	199-201	200-201 ¹¹⁵	80
8c	S	H	2-Cl, 5-NO ₂	1686 (C=O) 1517, 1317 e 1301 (NO ₂) 1161 (C=S)	348-349	a)	97
8d	O	CH ₃	2-Cl, 5-NO ₂	1721 e 1631 (C=O) 1528 e 1344 (NO ₂)	257-259	a)	92
8e	S	H	2-Cl, 4-NO ₂	3332 (NH) 1698 (C=O) 1506 e 1347 (NO ₂)	365 dec.	a)	91
8f	S	H	2-Cl	3106 (NH) 1680 (C=O) 1157 (C=S)	357-358	a)	93
8g	S	H	2-NO ₂	3121 (NH) 1684 (C=O) 1511 e 1377 (NO ₂)	330 dec.	a)	98
8h	O	H	2-COOH	3163 (NH) 3163 a 2514 (OH) 1729 e 1673 (C=O)	363 dec.	310-314 ⁵⁴	84
8i	O	CH ₃	2-COOH	3300 a 2600 (OH) 1715 e 1644 (C=O)	314-315	210 ¹¹⁶	77
8j	S	Ph	2-COOH	3400 a 2700 (OH) 1689 (C=O) 1147 (C=S)	322-324	a)	83
8k	S	H	2-COOH	3142 (NH) 3142 a 2511 (OH) 1676 (C=O) 1158 (C=S)	365 dec.	340-344 ⁵⁴	97

a) Não descrito na literatura

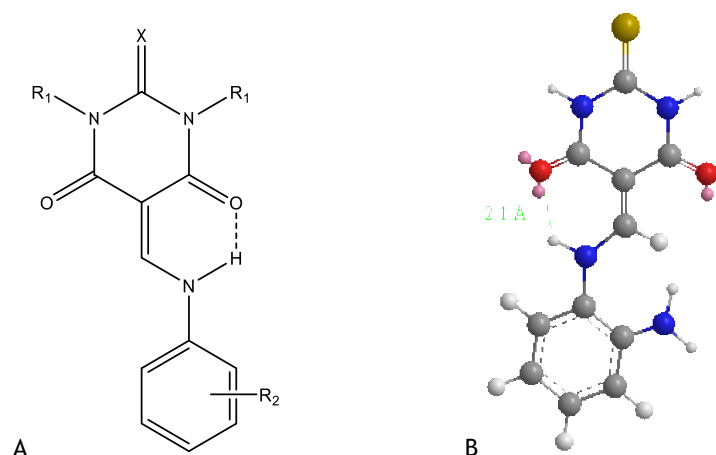


Figura 2.1 - A - Proposta de Teimouri *et al.*¹¹³ para pontes de hidrogénio intramoleculares em 5-fenilaminometilenopirimidinas; B - Simulação da distância entre o hidrogénio amino e o oxigénio do carbonilo da 5-fenilaminometilenopirimidina **8a**, através do *software* ChemBioDraw 3D da Cambridge Software.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-k** apresentam todos os sinais esperados (tabelas 2.8 a 2.11). Para as 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-e** foi possível identificar inequivocamente todos os sinais de RMN de ^1H . Tal como para as 5-benzilidenopirimidinas **6**, sendo de destacar que os diferentes substituintes do anel pirimidínico não têm grande influência nos desvios químicos dos sinais espectroscópicos, o que não acontece para os substituintes do fenilaminometileno, comprovado por comparação dos sinais dos **8a-b** com **8c-d** e **8e** (tabela 2.8). O mesmo acontece nos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos referidos anteriormente (tabelas 2.9 e 2.10), onde apenas foi possível identificar inequivocamente os sinais **8a-b**. Não obstante, verifica-se ainda que todos os sinais correspondentes aos prótons vicinais relativos ao aminometileno se desdobram em dupletos com constantes de acoplamento entre 10,8 e 14,2 Hz, com exceção do composto **8d** que apresenta dois singletos.

Para as 5-fenilaminometilenopirimidinas **8b**, **8h**, **8i** e **8k**, já descritas na literatura,^{54, 116, 117} verificam-se sinais iguais aos obtidos experimentalmente, com exceção dos espectros de RMN de ^1H dos compostos **8b** e **8i** que apresentam alguns desvios por terem sido realizados em solventes diferentes. De salientar ainda a ausência dos sinais relativos ao grupo ácido carboxílico da molécula **8i** nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C ,¹¹⁶ facto que não é explicado pelos autores.

2.1.4 5-Fenilcianometilpirimidinas

A síntese das 5-fenilcianometilpirimidinas **9a-b** teve como objetivo a sua utilização como precursor na tentativa de síntese de algumas pirimidodiazepinas e pirrolopirimidinas.

As 5-fenilcianometilpirimidinas **9a-b** foram preparadas por um método envolvendo dois passos *in situ* (esquema 2.5), iniciando-se com a formação inicial de um carbonilo α,β -insaturado por uma reação do tipo Knoevenagel já descrita ao longo desta dissertação. Depois de formados os 5-benzilidenos **6f-g**, é adicionado o cianeto por uma reação de Michael que leva à formação dos β -cianocarbonilos **9** com bons rendimentos (67 - 77%). Esta reação pode ser realizada em dois passos, tal como foi feito neste trabalho de dissertação, ou apenas num passo, fazendo reagir o cianeto de sódio com uma 5-benzilidenopirimidina preparada. Estes dois métodos de preparação das 5-fenilcianometilpirimidinas encontram-se descritas por Soleimani *et al.*¹¹⁸

Os espectros de FTIR das 5-fenilcianometilenopirimidinas **9a-b** apresentam as bandas características esperadas, sendo de ressaltar as vibrações do grupo ciano responsáveis pelo aparecimento da banda a 2245 cm^{-1} (tabela 2.12).

Tabela 2.8 - RMN de ¹H das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-e**.

Composto	1'-Ar-NH (<i>J</i> em Hz)	5-CCH (<i>J</i> em Hz)	3'-Ar-CH (<i>J</i> em Hz)	4'-Ar-CH (<i>J</i> em Hz)	5'-Ar-CH (<i>J</i> em Hz)	6'-Ar-CH (<i>J</i> em Hz)	Outros sinais (<i>J</i> em Hz)
8a	11,89 (d, 1H, <i>J</i> = 10,8)	8,43 (d, 1H, <i>J</i> = 10,8)	6,87 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7)	7,05 (t, 1H, <i>J</i> = 7,6)	6,73 (t, 1H, <i>J</i> = 7,5)	7,35 (d, 1H, <i>J</i> = 7,8)	12,14 (s, 1H, NH), 11,99 (s, 1H, NH), 5,20 (s, 2H, 1'-Ar-NH ₂)
8b	11,76 (d, 1H, <i>J</i> = 14,1)	8,45 (d, 1H, <i>J</i> = 13,8)	6,88 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,0, 1,4)	7,05 (td, 1H, <i>J</i> = 7,6, 1,4)	6,74 (td, 1H, <i>J</i> = 7,6, 1,4)	7,31 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,0, 1,4)	5,13 (s, 2H, 2'-Ar-NH ₂), 3,20 (d, 6H, <i>J</i> = 9,3, 2 x N-CH ₃);
8b (Lit. ¹¹⁷ em CDCl ₃)	12,35 (d, 1H, <i>J</i> = 11,7)	8,63 (d, 1H, <i>J</i> = 10,5)	6,84-7,41 (m, 4H)				12,30 (d, 2H, <i>J</i> = 11,2, 2'-Ar-NH ₂), 3,36 (s, 6H, 2 x N-CH ₃);
8c	12,57 (d, 1H, <i>J</i> = 13,1)	8,91 (d, 1H, <i>J</i> = 13,0)	7,89 (d, 1H, <i>J</i> = 8,8)	8,06 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,8, 2,6)	a)	8,76 (d, 1H, <i>J</i> = 2,6)	12,37 (s, 1H, NH), 12,20 (s, 1H, NH)
8d	12,52 (s, 1H)	8,93 (s, 1H)	7,89 (d, 1H, <i>J</i> = 8,8)	8,06 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,8, 2,4)	a)	8,74 (d, 1H, <i>J</i> = 2,4)	3,24 (s, 6H, 2 x N-CH ₃)
8e	12,63 (d, 1H, <i>J</i> = 12,9)	8,83 (d, 1H, <i>J</i> = 12,9)	8,48 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2)	a)	8,25 (dd, 1H, <i>J</i> = 9,2, 1,9)	8,19 (d, 1H, <i>J</i> = 9,2)	12,44 (s, 1H, NH), 12,27 (s, 1H, NH)

a) Não aplicável

Tabela 2.9 - RMN de ¹³C das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-b**.

Composto	2-C	4 e 6-CO	5-CCH	1'-Ar-C	2'-Ar-C	3'-Ar-CH	4'-Ar-CH	5'-Ar-CH	6'-Ar-CH	5-C	Outros sinais
8a	177,70 (CS)	164,03 161,64	153,24	126,02	140,40	117,62	127,71	118,37	119,71	93,81	a)
8b	151,45 (CO)	164,04 161,90	153,17	126,27	140,32	117,60	127,39	118,35	119,54	92,20	27,53 (N-CH ₃) 26,94 (N-CH ₃)
8b (Lit. ¹¹⁷ em CDCl ₃)	151,89 (CO)	165,15 162,64	153,65	126,66	137,84	118,17	127,08	119,05	120,54	93,07	28,05 (N-CH ₃) 27,28 (N-CH ₃)

a) Não aplicável

Tabela 2.10 - RMN de ^{13}C das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8c-k**.

Composto	2- $\underline{\text{C}}$	1'-Ar- $\underline{\text{C}}\text{OOH}$	4 e 6- $\underline{\text{C}}\text{O}$	5- $\underline{\text{C}}\text{CH}$	5- $\underline{\text{C}}$	N- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	Outros sinais
8c	178,04 ($\underline{\text{C}}\text{S}$)	a)	164,56, 161,06	152,92	96,17	a)	147,29, 136,10, 131,07, 129,64, 120,96, 113,70
8d	151,14 (CO)	a)	164,67, 161,38	152,26	95,00	27,66 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) 27,15 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)	147,31, 136,26, 131,02, 129,46, 120,59, 113,26
8e	178,13 ($\underline{\text{C}}\text{S}$)	a)	164,48, 160,99	151,47	97,31	a)	144,11, 140,41, 125,45, 124,03, 123,08, 117,96
8f	177,93 ($\underline{\text{C}}\text{S}$)	a)	164,49, 161,26	151,86	95,27	a)	134,81, 130,00, 128,82, 127,22, 123,15, 118,18
8g	178,10 ($\underline{\text{C}}\text{S}$)	a)	163,57, 161,35	151,86	96,75	a)	138,03, 136,23, 133,94, 126,20, 125,98, 119,60
8h	149,85 (CO)	167,69	165,08, 163,72	150,71	94,26	a)	139,97, 134,57, 131,69, 124,97, 118,57, 116,87
8h (Lit. ⁵⁴)	149,8 (CO)	167,6	165,0, 163,7	150,6	94,2	a)	139,9, 134,5, 131,6, 124,9, 118,5, 116,8
8i	150,40 (CO)	167,58	163,04, 162,06	151,41	94,19	27,64 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) 27,03 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)	139,81, 134,53, 131,66, 125,09, 118,69, 116,83
8i (Lit. ¹¹⁶ em CDCl_3)	150,90 (CO)	a)	160,71, 160,14	152,64	108,07	28,72 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) 27,90 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)	136,29, 126,77, 120,03, 117,12, 116,25, 112,48
8j	180,74 ($\underline{\text{C}}\text{S}$)	167,30	161,92, 161,05	152,23	96,12	a)	140,30, 139,66, 139,33, 134,58, 131,68, 129,27, 129,09, 128,90, 128,84, 128,00, 127,88, 125,81, 119,30, 117,50,
8k	178,00 ($\underline{\text{C}}\text{S}$)	167,61	162,92, 161,78	150,92	95,48	a)	139,59, 134,56, 131,67, 125,50, 118,91, 117,30
8k (Lit. ⁵⁴)	178 ($\underline{\text{C}}\text{S}$)	167,5	162,9, 161,7	150,9	95,4	a)	139,5, 134,5, 131,6, 125,4, 118,9, 117,2

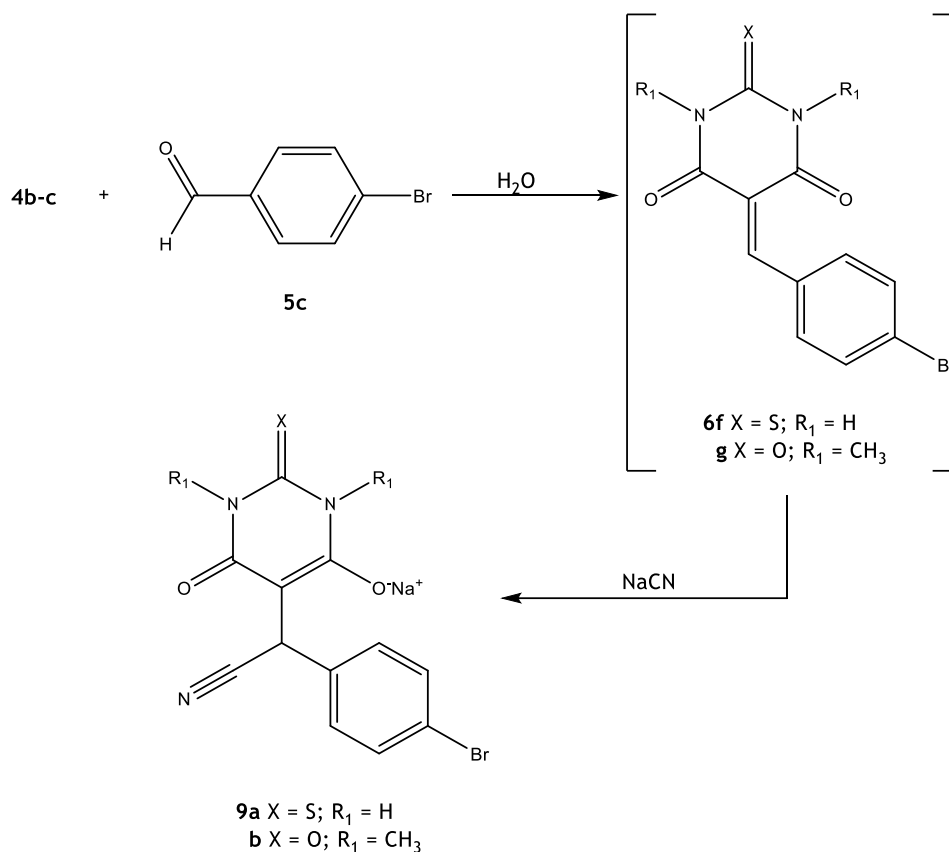
a) Não aplicável

Tabela 2.11 - RMN de ¹H das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8f-k**.

Composto	2'-Ar-COOH	1'-Ar-NH (J em Hz)	1 e 3-N (J em Hz)	5-CCH (J em Hz)	Outros sinais (J em Hz)
8f	a)	12,53 (d, 1H, J = 13,4)	12,31 (s, 1H, NH) 12,14 (s, 1H, NH)	8,74 (d, 1H, J = 13,4)	7,93 (d, 1H, J = 8,1, ArCH), 7,62 (dd, 1H, J = 8,0, 1,1, ArCH), 7,45 (t, 1H, J = 7,7, ArCH), 7,29 (td, 1H, J = 7,7, 1,1, ArCH)
8g	a)	13,33 (d, 1H, J = 13,3)	12,36 (s, 1H, NH) 12,19 (s, 1H, NH)	8,72 (d, 1H, J = 13,3)	8,26 (dd, 1H, J = 8,4, 1,0, ArCH), 8,09 (d, 1H, J = 8,2, ArCH), 7,86 (td, 1H, J = 7,9, 1,1, ArCH), 7,47 (td, 1H, J = 7,8, 1,0, ArCH)
8h	13,75 (s, 1H)	13,38 (d, 1H, J = 13,9)	10,96 (s, 1H, NH) 10,88 (s, 1H, NH)	8,62 (d, 1H, J = 13,8)	8,02 (d, 1H, J = 7,6, ArCH), 7,81 (d, 1H, J = 8,4, ArCH), 7,69 (t, 1H, J = 7,9, ArCH), 7,32 (t, 1H, J = 7,6, ArCH)
8h (Lit. ⁵⁴)	13,78 (s, 1H)	13,36 (d, 1H, J = 13,8)	10,95 (s, 1H, NH) 10,87 (s, 1H, NH)	8,61 (d, 1H, J = 13,8)	8,01 (d, 1H, J = 7,6, ArCH), 7,80 (d, 1H, J = 8,4, ArCH), 7,69 (t, 1H, J = 7,6, ArCH), 7,31 (t, 1H, J = 7,6, ArCH)
8i	13,60 (s, 1H)	13,46 (d, 1H, J = 14,1)	3,18 (d, 6H, J = 3,1, 2 x N-CH ₃)	8,67 (d, 1H, J = 13,9)	8,01 (d, 1H, J = 7,7, ArCH), 7,79 (d, 1H, J = 8,4, ArCH), 7,69 (t, 1H, J = 7,7, ArCH), 7,32 (t, 1H, J = 7,5, ArCH)
8i (Lit. ¹¹⁶ em CDCl ₃)	b)	13,69 (d, 1H, J = 13,2)	3,39 (s, 6H, 2 x N-CH ₃)	8,94 (d, 1H, J = 13,8)	8,24 (dd, 1H, J = 8,1, ArCH), 7,79 (t, 1H, J = 7,8, ArCH) 7,69 (d, 1H, J = 8,1, ArCH), 7,43 (t, 1H, J = 7,5, ArCH)
8j	13,82 (s, 1H)	13,57 (d, 1H, J = 14,2)	a)	8,83 (d, 1H, J = 14,1)	8,03 (dd, 1H, J = 7,9, 1,8, ArCH), 7,88 (d, 1H, J = 8,4, ArCH), 7,73 (td, 1H, J = 7,6, 1,2, ArCH), 7,52 - 7,43 (m, 4H, Ar-CH), 7,42 - 7,31 (m, 5H, ArCH), 7,29 (d, 2H, J = 7,2, ArCH)
8k	13,86 (s, 1H)	13,53 (d, 1H, J = 14,0)	12,14 (s, 1H, NH) 12,05 (s, 1H, NH)	8,67 (d, 1H, J = 14,0)	8,03 (d, 1H, J = 7,7, ArCH), 7,86 (d, 1H, J = 8,4, ArCH), 7,70 (t, 1H, J = 7,5, ArCH), 7,35 (t, 1H, J = 7,6, ArCH)
8k (Lit. ⁵⁴)	13,84 (s, 1H)	13,5 (d, 1H, J = 14,0)	12,11 (s, 1H, NH) 12,02 (s, 1H, NH)	8,65 (d, 1H, J = 14,0)	8,02 (d, 1H, J = 8, ArCH), 7,84 (d, 1H, J = 8, ArCH), 7,69 (t, 1H, J = 8, ArCH), 7,34 (t, 1H, J = 8, ArCH)

a) Não aplicável

b) Não definido



Esquema 2.5 - Síntese das 5-fenilcianometilpirimidinas **9a-b**.

Tabela 2.12 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para as 5-fenilcianometilpirimidinas **9a-b**.

Composto	X	R ₁	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura	Rendimento (%)
9a	S	H	2245 (CN) 1592 (C=C) 1173 (C=S)	310 (dec.)	a)	67
9b	O	CH ₃	2247 (CN) 1668 (C=O) 1583 (C=C)	273 (dec.)	b) ¹¹⁸	77

- a) Não descrito
 b) Não reportado

Os sinais de RMN de ¹H e ¹³C encontram-se de acordo com o esperado teoricamente. Sendo os compostos **10** sais de sódio, é de destacar a ressonância entre os dois carbonilos que leva a uma simetria nos sinais dos prótons ligados ao azoto 1 e 3 (hidrogênio para o **9a** e metilo para o **9b**) e nos grupos metilo do **9b** para o espectro de RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente. Esta simetria também é verificada nos espectros de RMN de ¹³C para os carbonos 4 e 6. Não obstante, é ainda de assinalar que os substituintes do anel pirimidínico não têm grande influência nos desvios químicos dos sinais espectroscópicos. Por fim, de notar que apesar do composto **9b** já se encontrar descrito na literatura, não está descrito do ponto de vista físico e espectroscópico (tabelas 2.13 e 2.14).¹¹⁸

Tabela 2.13 -RMN de ¹H das 5-fenilcianometilpirimidinas 9a-b.

Composto	1 e 3-N	Zona aromática (J em Hz)	5-CCH
9a	10,72 (s, 2H, 2 x NH)	7,47 (d, 2H, J = 8,1, 2 x ArCH) 7,31 (d, 2H, J = 7,9, 2 x ArCH)	5,24 (s, 1H)
9b	3,04 (s, 6H, 2 x N-CH ₃)	7,45 (d, J = 8,5, 2H, 2 x ArCH) 7,31 (d, J = 8,2, 2H, 2 x ArCH)	5,35 (s, 1H)

Tabela 2.14 -RMN de ¹³C das 5-fenilcianometilpirimidinas 9a-b.

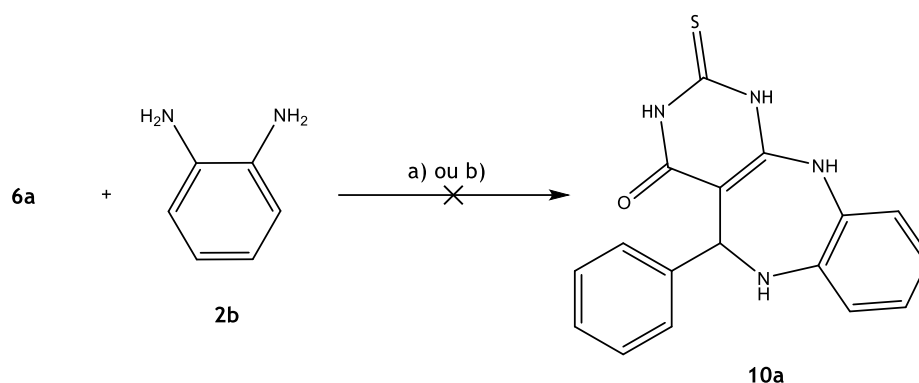
Composto	2-C	4 e 6-CO	5-C	5-CCH	1 e 3-N-CH ₃	Outros Sinais
9a	173,82 (CS)	161,41	86,08	30,03	a)	137,61, 130,90 (2 x ArCH), 129,17 (2 x ArCH), 120,26, 119,59
9b	152,75 (CO),	161,10	82,03	31,56	26,97	138,46, 130,82 (2 x ArCH), 129,17 (2 x ArCH), 120,85, 119,37
a) Não aplicável						

2.1.5 Pirimidodiazepinas

Neste sub-capítulo são apresentados os resultados obtidos nas várias tentativas de síntese com vista na obtenção de novas pirimidodiazepinas, explicando-se inicialmente a importância da preparação destes compostos. De seguida é apresentado um breve resumo de todas as tentativas efetuadas para a síntese das pirimidodiazepinas pretendidas, possibilitando assim uma rápida identificação das principais diferenças entre cada método reacional efetuado (tabela 2.15), sendo posteriormente apresentada cada reação em detalhe. Lisanti *et al.* desenvolveram uma bateria de compostos descritos como inibidores do MCT4, que consistiam na fusão de um anel derivado de pirimidina com um anel de quatro membros.¹⁰³

Com base neste resultado, foi iniciado neste trabalho de dissertação, o desenvolvimento de análogos com alteração do anel vicinal do anel pirimidínico para um anel de sete membros (esquema 2.6), esperando-se obter pirimidodiazepinas com possível potencial anticancerígeno. Desta forma iniciou-se a síntese destes a partir do método de Thokchom *et al.* que descreve a ciclização de 5-benzilidenopirimidinas com hidrazina para a formação de um anel de pirazole.¹¹⁹

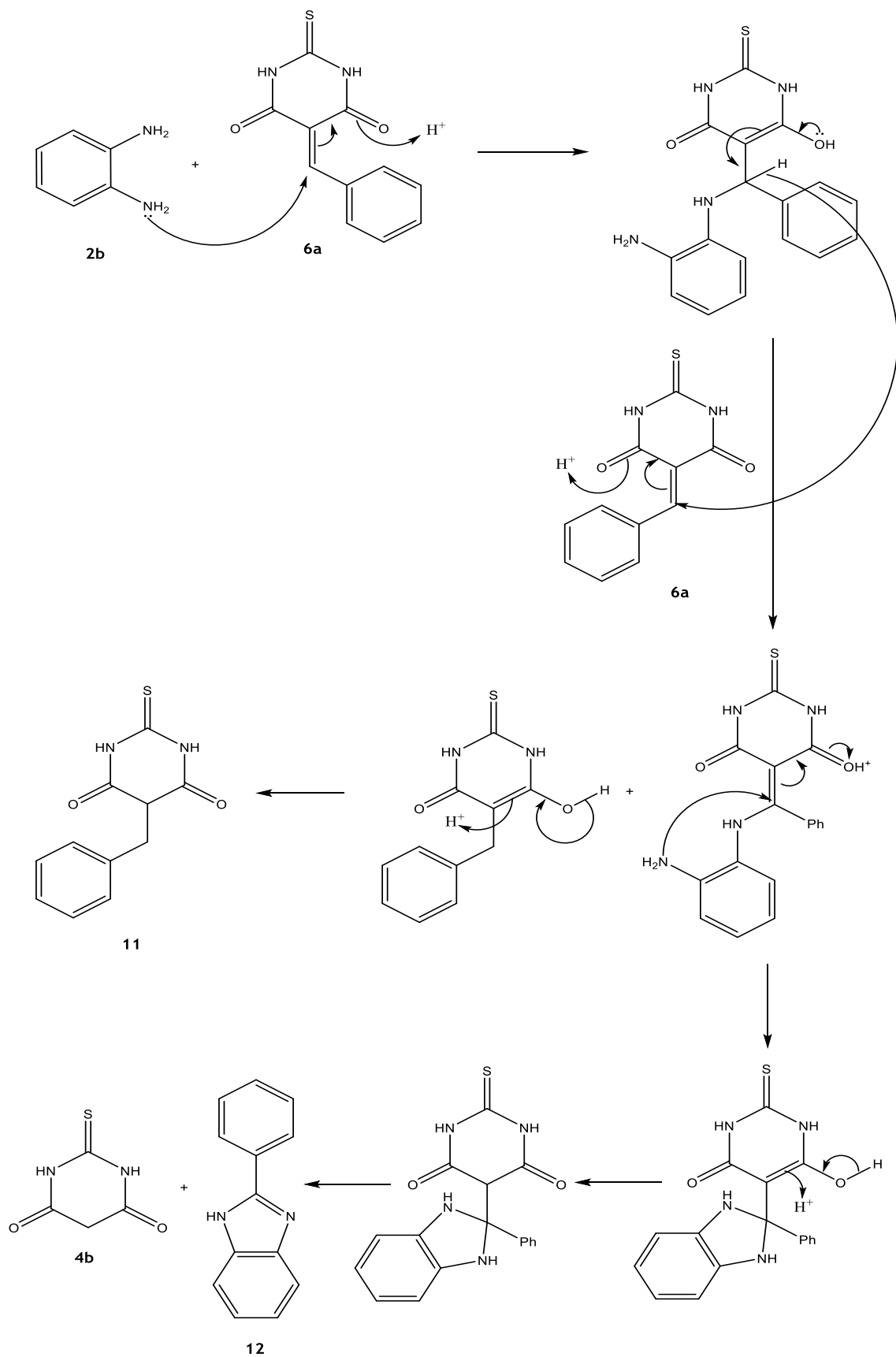
Para atingir o objetivo pretendido nesta dissertação, alterou-se a diamina supracitada, fazendo-se reagir a *o*-fenilenodiamina (**2b**) com a 5-benzilidenopirimidina **6a** em etanol e ácido acético (solventes utilizados na literatura) (esquema 2.6). No decorrer da reação verificou-se a formação de uma mistura complexa por cromatografia em camada fina (ccf), a qual não foi possível identificar os seus constituintes, analogamente ao já descrito por Zoorob *et al.*¹²⁰ Os investigadores anteriormente citados identificam a formação de 3 produtos em que nenhum deles é a pirimidodiazepina **10a** pretendida, propondo o mecanismo apresentado e adaptado aos compostos em questão (esquema 2.7). A reação do **6a** com o **2b** passa por vários passos intermédios que levam à formação dos compostos **11**, **12** e do barbitúrico **4b**. Após comparação por ccf, comprovou-se que um dos produtos formados era efetivamente o ácido tiobarbitúrico (**4b**); no entanto, verificaram-se mais produtos que os anteriormente expostos (estruturas **11** e **12**).



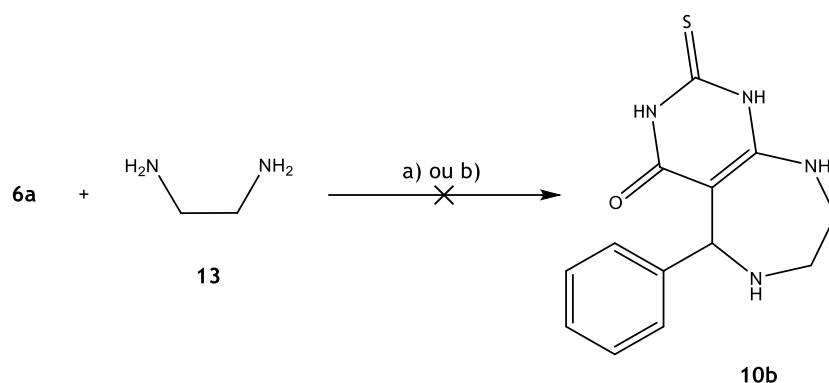
Esquema 2.6 - Tentativa de síntese da pirimidodiazepina **10a**, a partir da 5-benzilidenopirimidina **6a** e da *o*-fenilenodiamina (**2b**), de acordo com as condições reacionais a) ou b). a) ácido acético/etanol; b) ácido acético/*Downtherm A*.

Foi escolhido o *Downtherm A* para a realização desta reação, uma vez que este solvente é um fluido de transferência de calor, sendo o seu ponto de ebulição próximo dos 260 °C. Assim e de forma a averiguar a importância deste solvente em ciclizações que levem à formação de heterociclos, tentou-se a síntese da pirimidodiazepina **10a** em *Downtherm A* (esquema 2.6). A alternativa indicada não foi bem sucedida, verificando-se por ccf a formação da mesma mistura complexa supramencionada.

Após verificar a hipótese da formação dos três produtos mencionados, ao invés do pretendido, tentou-se contornar esse problema utilizando a etilenodiamina (**13**) em detrimento da *o*-fenilenodiamina (**2b**) (esquema 2.8). No entanto, esta abordagem originou igualmente uma mistura complexa.



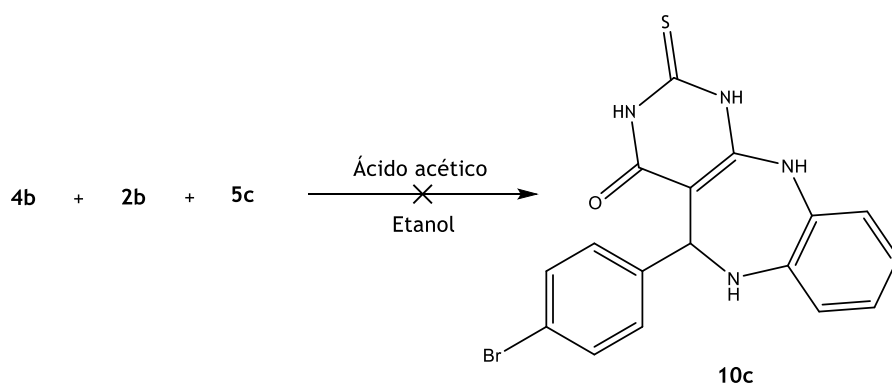
Esquema 2.7 - Mecanismo reacional proposto por Zoorob *et al.* explicativo do insucesso reacional na formação de pirimidodiazepinas a partir de 5-arilidenopirimidinas (**6**) e da *o*-fenilenodiamina (**2b**). Adaptado de 120



Esquema 2.8 - Tentativa de síntese da pirimidodiazepina **10b**, a partir da 5-benzilidenopirimidina **6a** e da etilenodiamina (**13**), de acordo com as condições reacionais a) ou b). a) AcOH/etanol; b) AcOH/*Downtherm* A.

As duas reações mencionadas (esquemas 2.6 e 2.8) foram efetuadas com *o*-fenilenodiamina (**2b**) e etilenodiamina (**13**) em ácido acético, utilizando como solventes o etanol e o *Downtherm* A. Verifica-se que a ciclização pretendida não depende da temperatura reacional (89 e 260 °C, respetivamente para cada solvente) nem do tipo de diamina utilizada, uma vez que não se verificam grandes diferenças reacionais entre si por ccf.

Atestando-se o insucesso das reações anteriores e a importância das MCRs em inúmeras reações envolvendo ácidos barbitúricos e barbituratos,^{44, 45} planeou-se a uma via sintética adaptando o método descrito por Faidallah *et al.* (esquema 2.9).¹²¹ O princípio de reação é o mesmo verificado no esquema 2.6 e 2.8 sem a formação prévia da 5-benzilidenopirimidina, adicionando-se no mesmo vaso reacional o ácido barbitúrico (**4b**), a *o*-fenilenodiamina (**2b**) e o benzaldeído **5c**. No entanto, esta alternativa demonstrou-se infrutífera para a síntese da pirimidodiazepina **10c**.



Esquema 2.9 - Tentativa de síntese da pirimidodiazepina **10c** por MRC, a partir do ácido tiobarbitúrico (**4b**), da *o*-fenilenodiamina (**2b**) e do benzaldeído **5c**.

Nas reações apresentados anteriormente (esquemas 2.6, 2.8 e 2.9), todos apresentavam um grupo fenilo volumoso (figura 2.2 - composto exemplificativo). Assim, e de modo a verificar se

o tamanho do grupo substituinte tinha influência no insucesso das ciclizações pretendidas, foi projetada a síntese das pirimidodiazepinas **10d-e** (esquema 2.10).

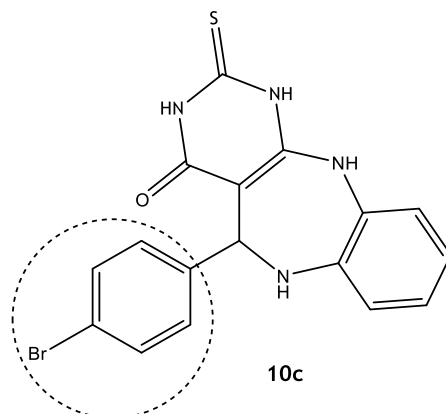
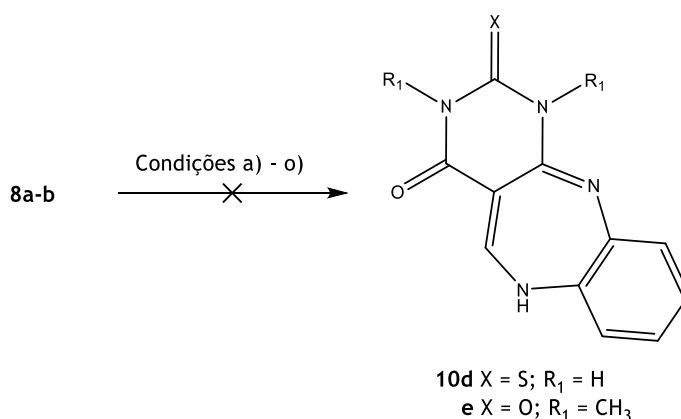


Figura 2.2 - Pirimidodiazepina **10c**. Identificação do grupo substituinte volumoso a tracejado.

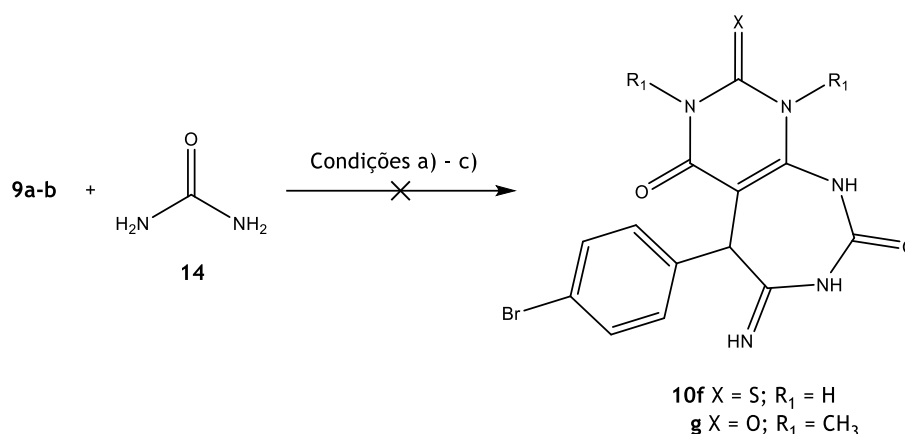


Esquema 2.10 - Tentativa de síntese das pirimidodiazepinas **10d-e** por ciclização das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-b**, de acordo com as condições reacionais a) - j). a) AcOH/butan-1-ol; b) AcOH (10% mol/mol)/butan-1-ol; c) HCl (10% mol/mol)/butan-1-ol; d) TsOH (10% mol/mol)/butan-1-ol; e) DCC/butan-1-ol; f) AcOH/DMF; g) AcOH (10% mol/mol)/DMF; h) HCl (10% mol/mol)/DMF; i) TsOH (10% mol/mol)/DMF; j) DCC/DMF; k) AcOH/*Downtherm* A; l) AcOH (10% mol/mol)/*Downtherm* A; m) HCl (10% mol/mol)/*Downtherm* A; n) TsOH (10% mol/mol)/*Downtherm* A; o) DCC/*Downtherm* A.

Para a síntese das pirimidodiazepinas anteriormente mencionadas, partiu-se das 5-fenilaminometilenopirimidinas **8a-b**, de modo a verificar a influência do calcogênio X e do R₁ na ciclização pretendida. Por outro lado, foram também utilizados vários catalisadores [ácido acético, ácido clorídrico, ácido *p*-toluenosulfônico (TsOH) e *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC)] e três solventes diferentes [butan-1-ol, *N,N*-dimetilformamida (DMF) e *Downtherm* A] (tabela 2.15). As reações com os dois materiais de partida foram realizadas em paralelo, efetuando cinco alterações nos catalisadores e três no solvente reacional, não se verificando qualquer evolução reacional no total das alterações efetuadas. Todos os catalisadores foram utilizados com vista na ativação do grupo carbonilo, tanto a promover a sua protonação, como a promover a sua desidratação depois do ataque nucleófilo por parte da amina (caso do DCC).

Estes insucessos reacionais poderiam ser explicados pela protonação da amina e consequente desativação. No entanto, esta protonação não se pode verificar no caso do DCC e ainda assim não há evolução reacional.

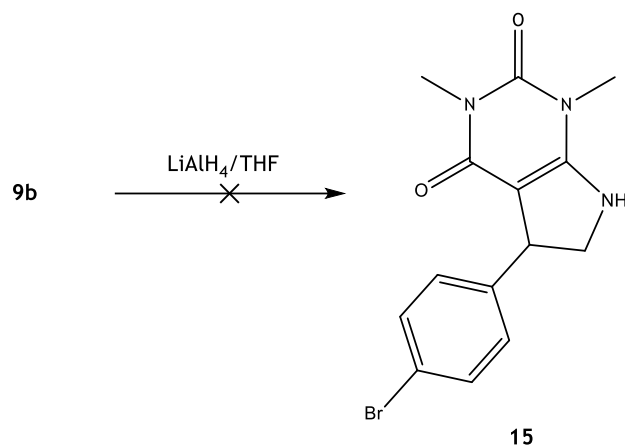
Por fim, após todos os insucessos até agora apresentados, verificou-se a possibilidade de síntese das 5-fenilcianometilpirimidinas de uma forma simples e fácil, como mencionado em 2.1.4. A síntese destes compostos permitiu uma tentativa de síntese para pirimidodiazepinas, tendo por base o ataque nucleófilo da ureia (**14**) ao nitrilo das 5-fenilcianometilpirimidinas **10f-g**, com posterior ciclização no carbonilo do anel pirimidínico dos compostos mencionados (esquema 2.11). Inicialmente tentou-se a formação do produto tanto por catálise básica com trietilamina, como por catálise ácida com ácido *p*-toluenossulfónico, não se verificando qualquer tipo de evolução reacional por ccf. Após estas tentativas, surgiu a hipótese de utilizar um ativador do nitrilo, o nitrato de ferro(III) monohidratado, de acordo com o descrito na literatura para outro tipo de compostos;¹²² mesmo com este ativador não se verificou reação.



Esquema 2.11 - Tentativa de síntese das pirimidodiazepinas **10f-g**, a partir das 5-fenilcianometilpirimidinas **9a-b** e da ureia (**14**), de acordo com as condições reacionais a) a c). a) Trietilamina (10% mol/mol)/etanol; b) TsOH (10% mol/mol)/etanol; c) Fe(NO₃)₃·H₂O (10% mol/mol)/etanol.

2.1.6 Pirrolopirimidinas

Foi realizada a tentativa de síntese da pirrolopirimidina **15** por redução das 5-fenilcianometilpirimidinas **9a-b** para verificar a reatividade do grupo nitrilo, uma vez que anteriormente não tinha reagido com a ureia (**14**). Para isto adaptou-se o método descrito na literatura com hidreto de alumínio e lítio em tetrahydrofurano (THF) seco (esquema 2.12).¹²³
¹²⁴ Não se verificou qualquer evolução reacional em banho de gelo, pelo foi aumentada a temperatura até ao refluxo, não havendo qualquer alteração, o que pode dever-se ao facto da fraca solubilidade do material de partida em THF.

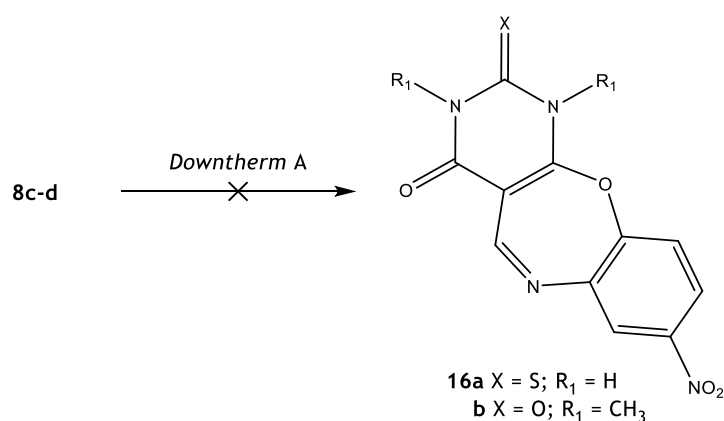


Esquema 2.12 - Tentativa de síntese da pirrolopirimidina **15**, por redução da 5-fenilcianometilpirimidina **9b**.

2.1.7 Pirimidoxazepinas

Depois de verificar que a ciclização de benzopiranopirimidinas se dava através de um haleto de 5-benzilidenopirimidina apenas por uma questão térmica,^{125, 126} tentou-se a ciclização das 5-fenilaminometilienopirimidinas **8c-d** para a obtenção das pirimidoxazepinas **16a-b** (esquema 2.13). Estas são análogas clássicas das pirimidodiazepinas, alterando um átomo de azoto por oxigênio no anel de sete membros

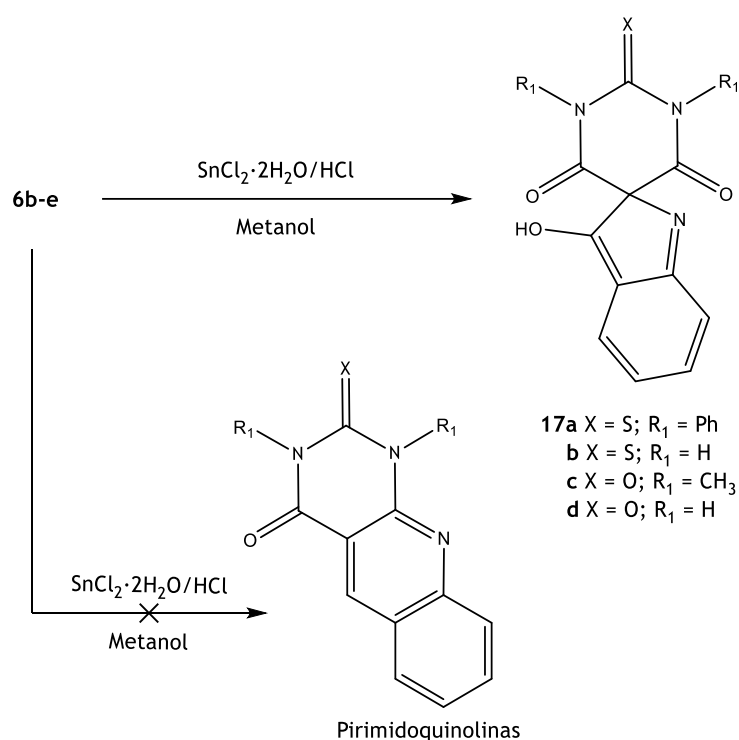
Apesar do posicionamento do grupo nitro em posição *-para* em relação ao átomo de cloro favorecendo a substituição nucleofílica aromática e a utilização do *Downtherm A*, não se verificou evolução reacional por ccf.



Esquema 2.13 - Tentativa de síntese das pirimidoxazepinas **16a-b**, por aquecimento das 5-fenilaminometilienopirimidinas **9c-d** em *Downtherm A*.

2.1.8 Pirimidoespiroindóis

Após a tentativa de obtenção de uma nova via sintética para síntese de pirimidoquinolinas por redução das nitro-5-benzilidenopirimidinas **6b-e**, verificou-se a obtenção de um produto novo, por comunicação pessoal com Eunice Soares Cavalheiro (esquema 2.14). De modo a ser possível a caracterização estrutural e avaliação biológica destes novos compostos, foram sintetizados os pirimidoespiroindóis **18a-d** por redução das 5-benzilidenopirimidinas **6b-e** com cloreto de estanho di-hidratado em refluxo de ácido clorídrico e metanol.



Esquema 2.14 - Síntese dos pirimidoespiroindóis **17a-d** por redução de cloreto de estanho em ácido clorídrico e metanol das 5-benzilidenopirimidinas **6b-e**. Não se verificou a formação de pirimidoquinolinas.

Esta nova via sintética é completamente inesperada, permite obter 3-hidrooespiroindóis de uma forma fácil e rápida, uma vez que o produto precipita ao longo da sua formação, obtendo-se um elevado grau de pureza. Verifica-se a obtenção de rendimentos bons a muito bons (51 - 82%), sendo que estes não foram otimizados (tabela 2.16). O grupo calcogénio substituinte do anel pirimidínico parece influenciar pouco o rendimento, aparentando haver um aumento de rendimento não muito significativo quando comparados tiobarbituratos com barbituratos. Por outro lado, verifica-se uma grande influência das substituições em R₁, observando-se rendimentos mais baixos com grupos mais volumosos que o hidrogénio.

Tabela 2.16 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os compostos **17a-d**.

Composto	X	R ₁	FTIR (bandas características)	Ponto de fusão (°C)	Literatura	Rendimento (%)	ES MS: m/z encontrado
17a	S	Ph	3200 a 2200 (OH) 1684 (C=O) 1347 e 1246 (C-O) 1183 (C=S)	255-256	a)	67	414,0908 (M+H) ⁺ e 436,0728 (M+Na) ⁺ [calculado para C ₂₃ H ₁₆ N ₃ O ₃ S ⁺ (M+H) ⁺ 414,09069]
17b	S	H	3381 (NH) 3200 a 2200 (OH) 1664 (C=O) 1357 e 1251 (C-O) 1164 (C=S)	207-208 dec.	a)	82	262,0281 (M+H) ⁺ e 284,0100 (M+Na) ⁺ [calculado para C ₁₁ H ₈ N ₃ O ₃ S ⁺ (M+H) ⁺ 262,02809]
17c	O	CH ₃	3200 a 2200 (OH) 1707 e 1644 (C=O) 1353 e 1230 (C-O)	211-213	a)	51	b)
17d	O	H	3174 (NH) 3200 a 2200 (OH) 1722 e 1666 (C=O) 1360 e 1238 (C-O)	266-268 dec.	a)	79	b)

a) Não descrito
b) Não determinado

Nos espectros de FTIR é de destacar a presença de todas as bandas esperadas (tabela 2.16); no entanto, os espectros dos compostos em questão são muito complexos. As vibrações de deformação axial das ligações N-H do anel de pirimidina dão origem a uma banda a 3381 cm⁻¹ quando este é o tiobarbitúrico e uma banda a 3174 cm⁻¹ quando é barbitúrico. Isto poderá demonstrar um maior efeito de ressonância no anel de pirimidina para os barbituratos. Por outro lado, e ainda relativamente à parte pirimidínica das moléculas, verifica-se o aparecimento de uma banda característica entre 1644 e 1684 cm⁻¹ característica da vibração da ligação C=O comum em todos os compostos. Não obstante, para a parte indole das moléculas, verificam-se duas bandas características das vibrações da ligação C-O na zona dos 1350 e 1240 cm⁻¹ e uma banda larga entre 3200 e 2200 cm⁻¹ característica das vibrações da ligação O-H. Não obstante, confirma-se a massa molecular dos espiroindóis **17a-b** por espectroscopia de massa de alta resolução.

A caracterização estrutural das pirimidoespiroindolinas **17a-e** foi levada a cabo por RMN de ¹H e ¹³C, HMBC e HSQC. Para os espectros de RMN de ¹H (tabela 2.17) verifica-se um sinal característico entre 7,77 e 7,90 ppm para o protão 4, apresentando-se como duplete para os tiobarbitúricos e como duplo tripleto para os barbitúricos. Não obstante, entre 7,35 e 7,46 ppm é observado o protão 7 como duplete com constantes de acoplamento entre 8,9 e 9 Hz. Entre 7,19 e 7,29 ppm apresentam-se os sinais relativos ao protão 6, sendo os barbitúricos duplos dupletos. O barbitúrico **17b** apresenta-se como duplete, enquanto o **17a** apresenta uma sobreposição de sinais nesta zona. Por fim, na zona entre 6,71 e 6,89 ppm destacam-se os sinais

do próton 5 como duplos dupletos para os tiobarbitúricos e duplos duplos dupletos para os barbitúricos. Todos os outros sinais encontram-se de acordo com o esperado.

Os sinais de RMN de ^{13}C das pirimidoespiroindolinas **17a-e** encontram-se de acordo com o esperado (tabela 2.18), apresentando zonas características para cada carbono (tal como no RMN de ^1H). Não obstante, verificam-se duas exceções nos sinais do carbono 2',5; estes sinais aparecem para os tiobarbitúricos entre 84,89 e 85,37 ppm e não aparecem para os barbitúricos. Apesar disto, todos os dados apontam para as estruturas propostas.

Tabela 2.17 - RMN de ¹H das pirimidoespiroindolinas 17a-e.

Composto	4-ArCH (J em Hz)	7-ArCH (J em Hz)	6-ArCH (J em Hz)	5-ArCH (J em Hz)	Outros sinais (J em Hz)
17a	7,80 (d, 1H, J = 8,8)	7,35 (d, 1H, J = 8,9)	a)	6,71 (dd, 1H, J = 8,9, 6,2)	7,40 (t, 4H, J = 7,7, 3'' e 5''-ArCH) 7,29 (t, 2H, J = 7,4, 4''-ArCH) 7,24 - 7,19 (m, 5H, 2'' e 6''-ArCH e, 6-ArCH)
17b	7,84 (d, 1H, J = 8,8)	7,38 (d, 1H, J = 9,0)	7,25 (dd, 1H, J = 9,0, 6,3)	6,79 (dd, 1H, J = 8,8, 6,3)	11,31 (s, 2H, 1' e 3'-NH)
17c	7,90 (dt, 1H, J = 8,8, 1,1)	7,37 (d, 1H, J = 8,9)	7,29 (ddd, 1H, J = 8,9, 6,2, 1,1)	6,80 (ddd, 1H, J = 8,8, 6,3, 0,9)	3,17 (s, 6H, 1' e 3'-NCH ₃)
17d	7,77 (dt, 1H, J = 8,8, 1,2)	7,46 (d, 1H, J = 9,0)	7,32 (ddd, 1H, J = 9,1, 6,4, 0,8)	6,89 (ddd, 1H, J = 8,9, 6,4, 0,6)	10,69 (s, 2H, 1' e 3'-NH)

a) Indefinido

Tabela 2.18 - RMN de ¹³C das pirimidoespiroindolinas 18a-e.

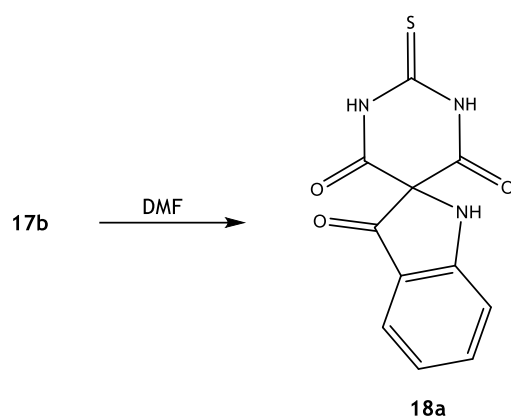
Composto	2-C	3-C	4' e 6'-CO	7a-ArC	6-ArCH	4-ArCH	5-ArCH	3a-ArC	7-ArCH	2,5'-C	Outros sinais
18a	178,55 (CS)	166,25	159,58	156,12	130,24	125,34	119,28	114,30	113,09	85,37	141,84 (1''-ArC), 129,56 (2'' e 6''-ArCH), 128,40 (3'' e 5''-ArCH), 126,91 (4''-ArCH)
18b	174,46 (CS)	166,07	161,01	156,28	130,26	125,43	119,29	114,18	113,12	84,99	a)
18c	152,26 (CO)	167,41	160,88	155,87	131,16	125,55	120,00	114,88	112,87	b)	27,66 (1' e 3'-NCH ₃)
18d	150,30 (CO)	163,27	162,22	156,04	131,16	123,86	121,49	115,92	113,43	b)	a)

a) Não aplicável

b) Ausência de sinal

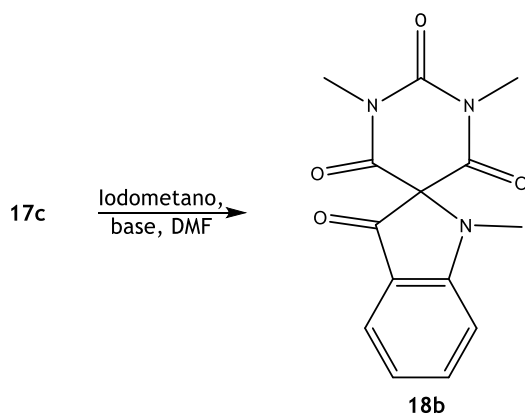
2.1.9 Pirimidoespiroindolinas

Posto o problema anteriormente mencionado, foram efetuadas diversas tentativas de cristalização das pirimidoespiroindolinas **17a-e** de etanol/água e DMF de forma a poderem ser analisados por Raios-x Apesar da formação de cristais em etanol/água, estes não difrataram para Raio-X. Numa segunda tentativa de cristalização da pirimidoespiroindolina **17b** a quente com posterior adição de água, verificou-se a formação de um novo produto, o qual foi caracterizado por espectroscopia de Raio-X e RMN de ^1H e ^{13}C , verificando-se a formação da pirimidoespiroindolina **18a** (esquema 2.15).



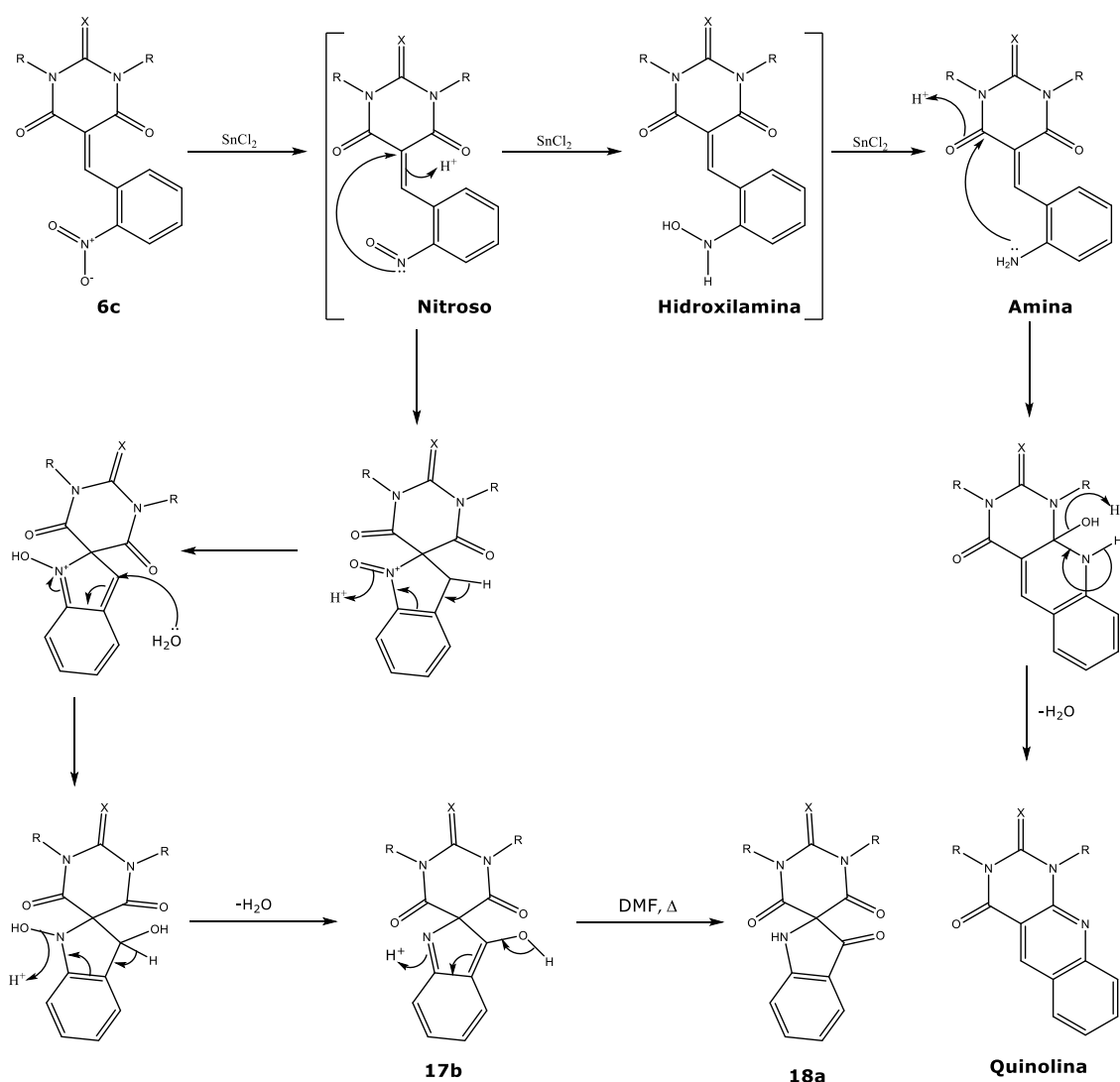
Esquema 2.15 - Síntese das pirimidoespiroindolina **18a**.

A reação do espiroindole **17c** com iodometano em carbonato de potássio e DMF seco por aquecimento foi levada a cabo para a obtenção da espiroindolina **18a** (esquema 2.16). Verificou-se que o iodometano parece deslocar o equilíbrio reacional para a formação da espiroindolina, potencialmente promovido pela alquilação do azoto da indolina.



Esquema 2.16 - Síntese da pirimidoespiroindolina **18a**.

O mecanismo reacional apresentado no esquema 2.17 tenta explicar não só a formação desta pirimidoespiroindolina como dos pirimidoespiroindóis **17a-d**. De acordo com este mecanismo, a redução do grupo nitro a amina com posterior ataque nucleofílico ao carbonilo vicinal e consequente ciclização para a obtenção da quinolina não se verifica. Na redução da amina, o intermediário nitroso reage *in situ* atacando intramolecularmente o carbono 5 do anel pirimidínico, originando assim um espiro de 5 membros após adição e posterior eliminação de água. Este mecanismo permite ainda explicar a formação da pirimidoespiroindolina **18a** a partir do aquecimento do espiroindole **17b** em DMF.



Esquema 2.17 - Mecanismo reacional proposto para a formação dos pirimidoespiroindóis **17** e da pirimidoespiroindolina **18a**. Não se verificou a formação da quinolina esperada.

Nos espectros de FTIR das pirimidoespiroindolinas **18a-d** verifica-se o desaparecimento das bandas características das vibrações das ligações O-H e C-O do grupo álcool dos espiroindóis **17b-c**, observando-se apenas a vibração da ligação C=O do grupo carbonilo a 1697 cm⁻¹ (tabela 2.19). Verifica-se ainda que o rendimento reacional da formação da espiroindolina **18b** é superior em relação ao do **18a**.

Tabela 2.19 - Grupos substituintes, bandas características dos espectros de FTIR, pontos de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para as pirimidoespiroindolinas **18a-d** e seus precursores **17b-c**.

Composto	X	R ₁	FTIR (bandas características)	Ponto de fusão (°C)	Literatura	Rendimento (%)
17b	S	H	3381 (NH) 3200 a 2200 (OH) 1664 (C=O) 1357 e 1251 (C-O) 1164 (C=S)	207-208 dec.	a)	82
18a	S	H	1697 (C=O) 1139 (C=S)	160 dec.	a)	50
17c	O	CH ₃	3200 a 2200 (OH) 1707 e 1644 (C=O) 1353 e 1230 (C-O)	211-213	a)	51
18b	O	CH ₃	1697 (C=O)	225-228	a)	90

Foi possível a caracterização da 3-oxoespiroindolina **18a** por Raio-X, verificando-se a estrutura pirimidoespiroindolínica proposta. É de salientar que o anel pirimidínico e o anel indolidínico se encontram em planos perpendiculares (figura 2.3 - A). Adicionalmente, verifica-se que as moléculas de **18a** estão estabilizadas por pontes de hidrogénio intermoleculares, o que leva à formação de uma rede cristalina ordenada (figura 2.3 - B).

Todos os sinais dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C, DEPT, HSQC e HMBC corroboram a estrutura confirmada por Raio-X.

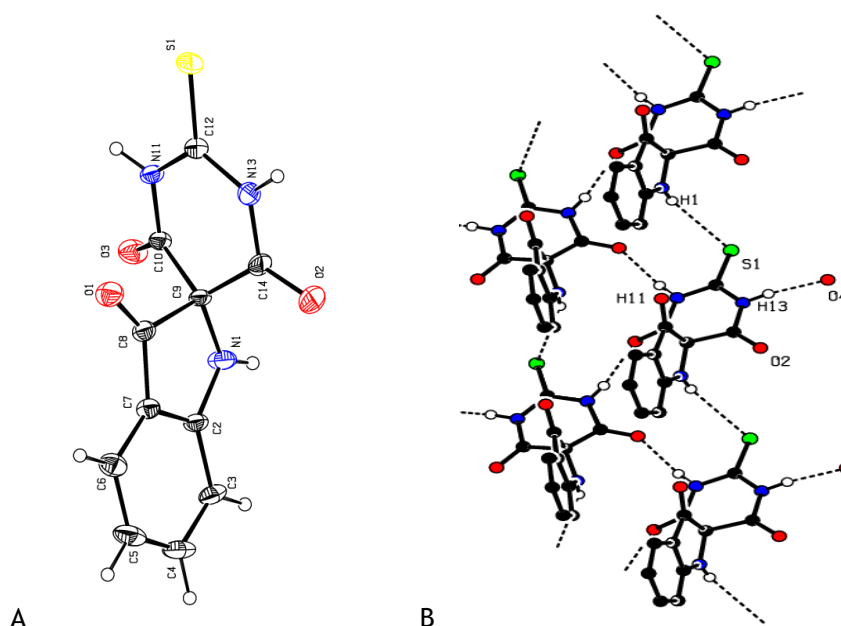


Figura 2.3 - Estrutura da pirimidoespiroindolina **18a** por Raio-X. A - *Orted plot*, B - Distribuição das moléculas na rede cristalina e respetivas pontes de hidrogénio estabilizadoras.

2.2 Avaliação biológica

Neste subcapítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na determinação da atividade antibacteriana, inibitória da XO, antioxidante e antiproliferativa das 5-fenilaminometilpirimidinas **8a** e **8c-k**, 5-fenilcianometilpirimidinas **9a-b**, dos pirimidoespiroindóis **17a-d** e pirimidoespiroindolinas **18a-b**.

Por fim será apresentada a REA geral das famílias de compostos referidos para as várias atividades biológicas testadas.

A avaliação da atividade inibitória da XO e antibacteriana dos compostos sintetizados teve por base a atividade descrita na literatura para alguns (tio)barbituratos, incluindo espiro(tio)barbituratos antibacterianos.

Ao longo das experiências verificou-se que nenhum dos compostos em estudo precipitou durante os ensaios, inferindo-se que a concentração que atuou foi efetivamente a que foi colocada em cada poço.

2.2.1 Atividade antibacteriana

A avaliação da concentração mínima inibitória (MIC - do inglês, *Minimum inhibitory concentration*) para atividade antibacteriana não foi realizada no âmbito desta dissertação, sendo os resultados obtidos e gentilmente cedidos pela Dra. Susana Ferreira. Assim, foi avaliada a MIC para duas bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e cinco bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* e *Acinetobacter baumannii*).

Após análise dos resultados (tabela 2.20), verifica-se que os compostos **8a**, **8c-k**, **9a-b**, **17a-d**, e **18b** apresentam valores superiores a 200 µM para todas as bactérias. Não obstante, o **18a** apenas difere dos anteriores por apresentar MIC de 200 µM para a *Staphylococcus aureus*; no entanto, este resultado é demasiado elevado e não se apresenta promissor em comparação com o antibiótico utilizado como padrão (tetraciclina).

Tabela 2.20 - Valores de MIC (em µM) estimados para os compostos tetraciclina, **8a**, **8c-k**, **9a-b**, **17a-d**, **18a-b**.

Compostos	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)
8a, 8c-k, 9a-b, 17a-d, 18b	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
18a	>200	200	>200	>200	>200	>200	>200
Tetraciclina	0,14	2,25	4,50	9,00	36,00	9,00	9,00

- a) *Bacillus cereus* ATCC1178
- b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- c) *Escherichia coli* ATCC 25922
- d) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- e) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- f) *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311
- g) *Acinetobacter baumannii* LMG 1025

2.2.2 Determinação *In Vitro* da atividade inibitória da XO

De acordo com o nosso conhecimento, esta é a primeira vez em que se testa a atividade inibitória da XO para as famílias de compostos supramencionadas. Esta atividade foi avaliada espectrofotometricamente para as famílias de compostos supramencionadas, utilizando o alopurinol como controlo positivo e medindo os níveis de formação de ácido úrico a 295 nm. Uma vez que a enzima transforma a xantina em ácido úrico, e o método utilizado se baseia na formação do produto, é importante perceber em que intervalo de concentração há linearidade da absorvância. Para isto realizou-se uma curva de calibração a 295 nm para várias concentrações de ácido úrico, observando-se haver linearidade pelo menos entre 12,5 e 400 µM (gráfico 2.1).

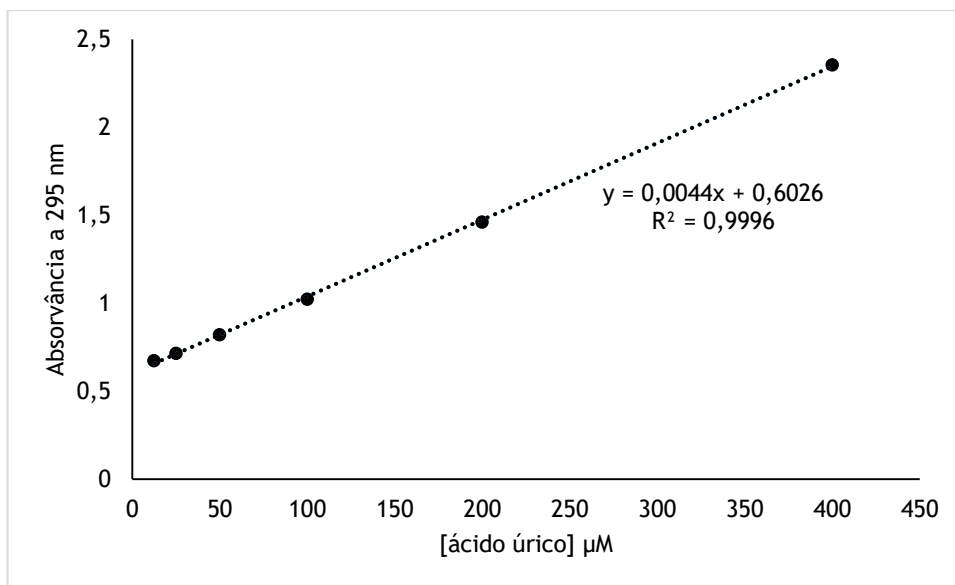


Gráfico 2.1 - Curva de calibração para o ácido úrico a 295 nm com respectiva equação da reta e erro quadrado.

Para a realização do screening foi utilizada uma concentração de 30 μM de composto em estudo, em cada poço, seguindo as condições descritas por Zhao *et al.*¹²⁷ e o método de Gupta *et al.*¹²⁸

Após análise dos resultados obtidos (gráfico 2.2 e anexo 6), verifica-se que os espiros **17d** e **18a** são os que apresentam um maior potencial de inibição da enzima, embora não melhores que o alopurinol, utilizado como referência.

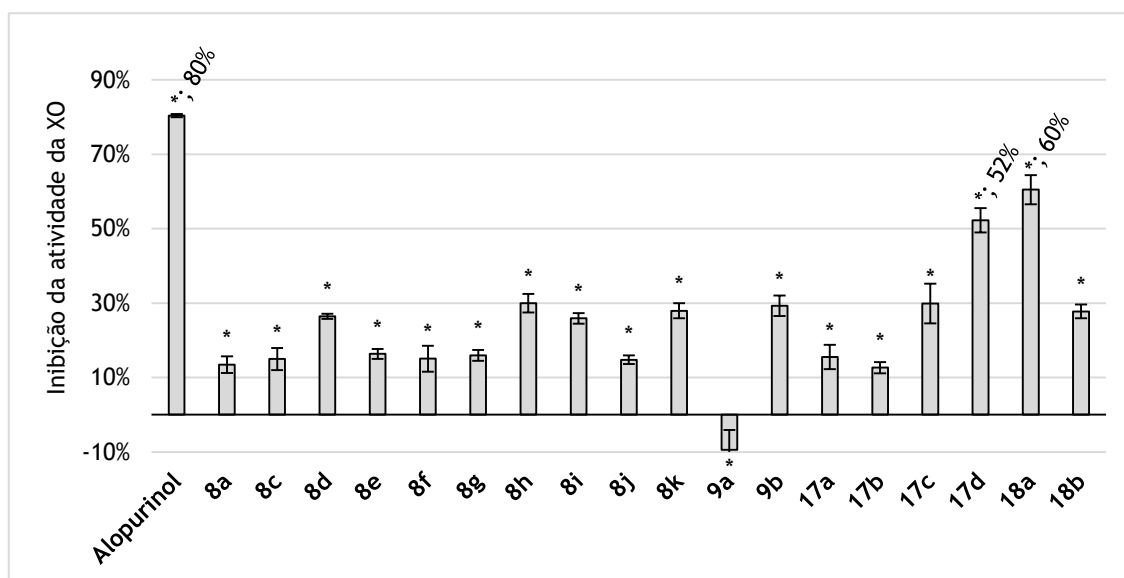


Gráfico 2.2 - Percentagem de inibição da enzima XO em relação ao controle por parte dos compostos alopurinol, **8a**, **8c-k**, **9a-b**, **17a-d**, **18a-b** a uma concentração de 30 μM . Para os compostos em que é especificada a percentagem de redução, foram realizadas curvas de concentração-resposta. Os dados são apresentados com os respectivos desvios padrão representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controle (Teste t de Student).

Para as 5-fenilaminometilpirimidinas **8** e 5-fenilcianometilpirimidinas **9** verifica-se que todas têm uma ação inibitória na enzima, com exceção da **9a**, que parece favorecer um aumento da transformação de xantina em ácido úrico, quando comparado com o controlo. Para os compostos com efeito inibidor, há um favorecimento dessa inibição quando o anel pirimidínico é o ácido barbitúrico não substituído (compostos **8d**, **8h**, **8i** e **9b**). As alterações efetuadas no grupo fenilaminometilo não levaram a variações significativas na inibição da XO.

Os substituintes do anel de pirimidina para os pirimidoespiroindóis **17** também demonstram o perfil anteriormente mencionado. Apenas foi possível a síntese de duas pirimidoespiroindolinas, observando-se um claro aumento da inibição da enzima, quando comparado o composto **17b** com o **18a**. No entanto, quando observada a atividade do **18b** verifica-se que a substituição no azoto da indolina não contribui para o aumento para esta atividade.

Não obstante, após análise dos dados da inibição da atividade enzimática ao longo dos 10 minutos de reação, verifica-se um perfil idêntico ao do alopurinol para os espiros **17d** e **18a**, o que não acontece para todos os outros compostos testados (apenas apresentados os dados representativos do composto **17b**) (gráfico 2.3). Posto isto, foram efetuadas as curvas concentração-resposta para o alopurinol, **17d** e **18a**.

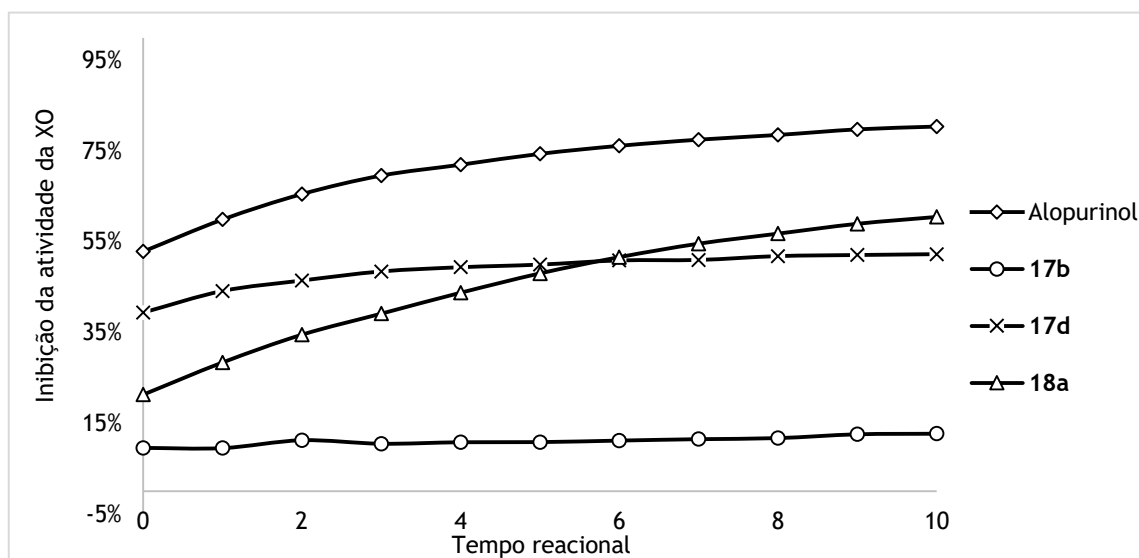


Gráfico 2.3 - Percentagem de inibição da enzima XO em função do tempo de reação decorrido para os compostos alopurinol, **17b-d** e **18a** a uma concentração de 30µM.

Após análise dos dados obtidos, foi possível o cálculo dos valores de concentração inibitória para metade da atividade máxima (IC_{50} - do inglês, *half maximal inhibitory concentration*) para os compostos supramencionados, verificando-se que os valores obtidos se encontram de acordo com o *screening* inicial (gráfico 2.2). Para este cálculo foi utilizada a extensão linear de cada curva de concentração-resposta. O alopurinol apresenta um IC_{50} calculado de 2,83 µM (tabela

2.21), próximo do resultado descrito na literatura de 4,75 μM .¹²⁷ A pirimidoespiroindolina **18a** apresenta um valor de 8,07 μM , o que poderá ser um resultado interessante em comparação com o alopurinol, sendo testada a sua atividade antiproliferativa. Futuramente, será de todo determinante a realização dos gráficos de Lineweaver-Burk de modo a verificar o tipo de inibição e os parâmetros cinéticos.

Tabela 2.21 - Valores de IC_{50} estimados para a inibição da atividade da enzima XO dos compostos alopurinol, **17d** e **18a**.

Composto	IC_{50} (μM)	R^2
Alopurinol	2,83	0,9944
18a	8,07	0,9983
17d	22,10	0,9768

Em questão à produção de radicais livres pela enzima aquando da conversão da xantina em ácido úrico (o qual não é solucionado pelo alopurinol), testou-se a atividade antioxidante dos compostos em estudo pelo método de DPPH.

2.2.3 Atividade antioxidante - ensaio DPPH

Neste trabalho de dissertação foi utilizado o método descrito por Cheng *et al.*²⁹ em placas de multi-poços, uma vez que este é um método simples e rápido. De forma a decidir qual o comprimento de onda a utilizar foram realizadas duas curvas de calibração com várias concentrações de DPPH. Apesar de poucas diferenças, foi escolhido o comprimento de onda de 517 nm, uma vez que apresentava uma melhor correlação linear (tabela 2.22). É de ter ainda em consideração que a concentração de DPPH escolhida para o ensaio (100 μM) se encontra dentro do intervalo de linearidade.

Tabela 2.22 - Curvas de calibração para o radical livre DPPH a 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

O *screening* inicial dos compostos sintetizados, a uma concentração de 30 μM , foi realizado em placas de 96 poços, com leitura da absorvância aos 20 e 60 minutos,¹²⁹ e utilizando o trolox como controlo positivo, de acordo com o método de Zhao *et al.*¹²⁷ Os dados obtidos mostram uma maior percentagem de redução aos 60 minutos, em comparação com os 20 minutos; no entanto, verifica-se que nenhum composto apresenta maior potencial de redução que o controlo trolox (70%), sendo de destacar a 5-fenilaminometilenopirimidina **8a**, os espiros **17a-b** e **18a** (gráfico 2.4 e anexo 6). É de notar ainda que o alopurinol e os compostos **8c**, **8g**, **8j**, **9a**, **17c** e **18b**, apresentam percentagens negativas.

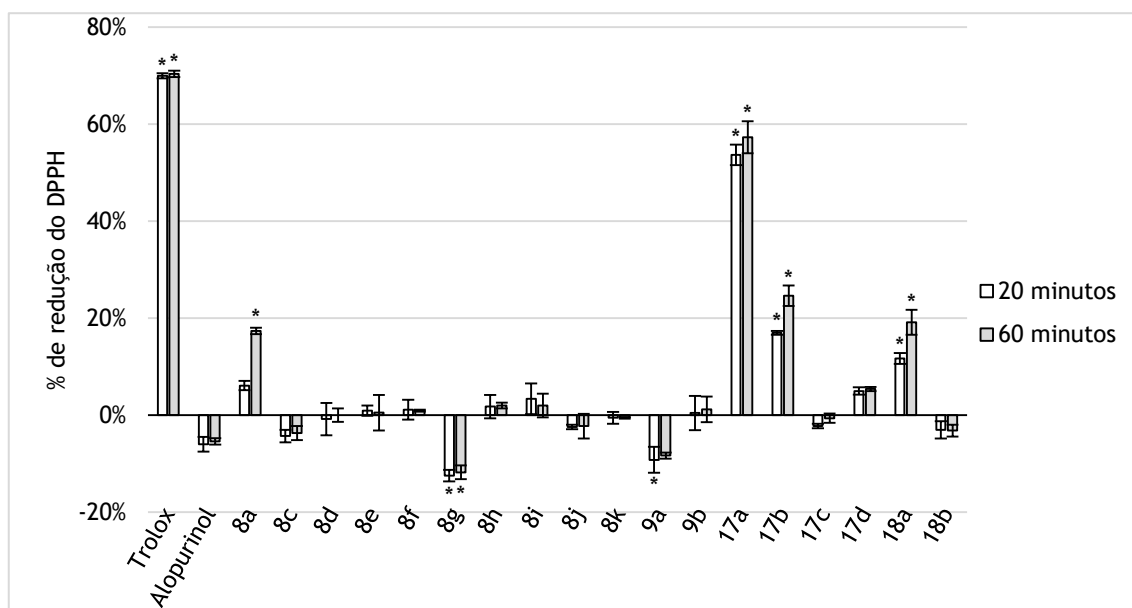


Gráfico 2.4 - Percentagem de redução do radical DPPH em relação ao controlo por parte dos compostos trolox, alopurinol, **8a**, **8c-k**, **10a-b**, **18a-d**, **19a-b** a uma concentração de 30 μM , aos 20 e 60 minutos de exposição. Para os compostos em que é especificada a percentagem de redução, foram realizadas curvas de concentração-resposta. 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).

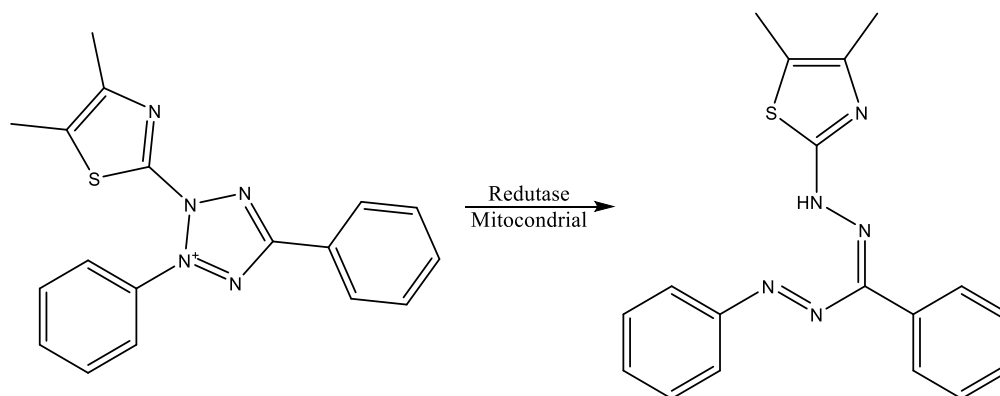
Depois do *screening* a 30 μM e após se verificar que a maioria dos compostos não apresentava boa capacidade antioxidante, foram calculados os IC_{50} dos compostos que apresentavam um potencial de redução superior a 20%. Para este cálculo foi utilizada a extensão linear de cada curva de concentração-resposta. O resultado obtido para o composto de referência (34,31 μM) encontra-se próximo do valor descrito na literatura¹³⁰ de 9,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (equivalente a 37,19 μM). Os valores de IC_{50} obtidos para os espiroindóis **17a** e **17b** de 70,91 e 46,99 μM (tabela 2.23), respetivamente, encontram-se de acordo com os dados obtidos anteriormente.

Tabela 2.23 - Valores de IC₅₀ estimados para a atividade antioxidante pelo método de DPPH dos compostos trolox, 17a e 17b.

Composto	IC ₅₀ (μM)	R ²
Trolox	34,31	0,99
17a	70,91	0,99
17b	46,99	0,99

2.2.4 Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa dos compostos sintetizados foi testada em células epiteliais humanas do cancro da mama (MCF-7 - do inglês *Michigan Cancer Foundation-7, human breast adenocarcinoma cell line*) sensíveis a androgénios, pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) após 72 horas de exposição aos compostos. Este é um método colorimétrico que se baseia na absorvância lida a 570 nm, característica dos cristais de formazano. Estes cristais são formados pelas células viáveis presentes em cada poço do ensaio, após metabolização do MTT pelas redutases mitocondriais (esquema 2.19), permitindo inferir a percentagem de células viáveis pela quantidade de cristais formados.¹³¹



Esquema 2.18 - Redução do MTT a formazano pela redutase mitocondrial.

Após a análise dos resultados obtidos (gráfico 2.5 e anexo 6), verifica-se que nenhum dos compostos sintetizados leva a uma percentagem de proliferação celular inferior à observada com o 5-fluorouracilo (5-Fu). No grupo fenilaminometileno das fenilaminometilenopirimidinas, o substituinte nitro parece ser mais importante quando se apresenta na posição 4 do anel aromático, o que pode ser verificado por comparação das percentagens obtidas para o 8c, 8e e 8f. Não obstante, o mesmo parece acontecer para os substituintes cloro e ácido carboxílico

na posição 2 do mesmo anel, confirmado por observação dos resultados do **8f** e **8k** em comparação com o **8g**.

As 5-fenilcianometilpirimidinas **9a-b** não apresentam significativas alterações na proliferação celular das células MCF-7.

Para os compostos espiros, verifica-se que o barbitúrico não substituído favorece a redução da proliferação celular nas células MCF-7, o que se confirma por comparação dos espiroindóis **17b** com **17d**. Não obstante, verifica-se uma diminuição da proliferação quando comparadas a espiroindolina metilada **18b** com a espiroindolina **18a**, sendo esta última menos potente que o seu precursor **17b**.

Por fim, é de salientar que espiroindolina **18a** que não reduz significativamente a proliferação celular em relação ao controlo negativo, o que poderá ser um ponto positivo em relação ao seu potencial como inibidor da XO.

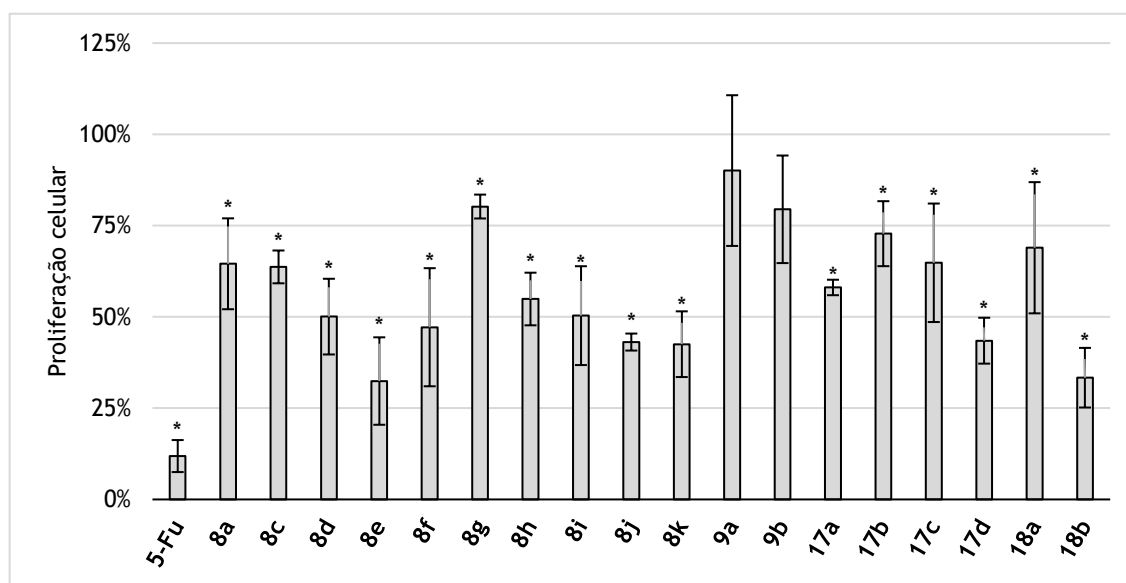


Gráfico 2.5 - Percentagem relativa de proliferação celular em células MCF-7 após 72 horas de exposição aos compostos 5-Fu, **8a**, **8c-k**, **9a-b**, **17a-d**, **18a-b** a uma concentração de 30µM. Os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão representativos das três experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste t de Student).

2.2.5 REA

Será apresentada uma breve sistematização da informação acerca da REA para as 5-fenilaminometilenopirimidinas (figura 2.3) e para as duas famílias de compostos espiros (figura 2.4), para uma interpretação mais simples e rápida. É de salientar que as atividades antibacteriana e antioxidante não foram consideradas, tal como os resultados das 5-

fenilcianometilpirimidinas, uma vez que a maioria dos compostos testados não se apresentaram ativos.

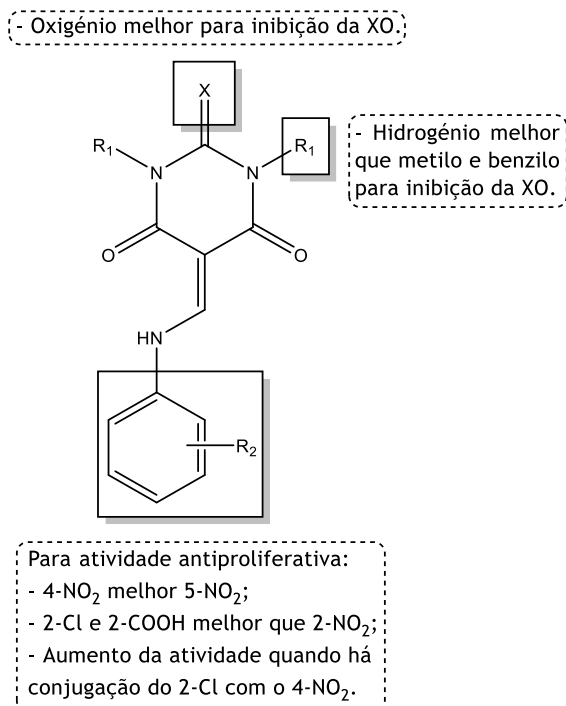


Figura 2.4 - REA das 5-fenilaminometilenopirimidinas para a atividade inibitória da XO e atividade antiproliferativa.

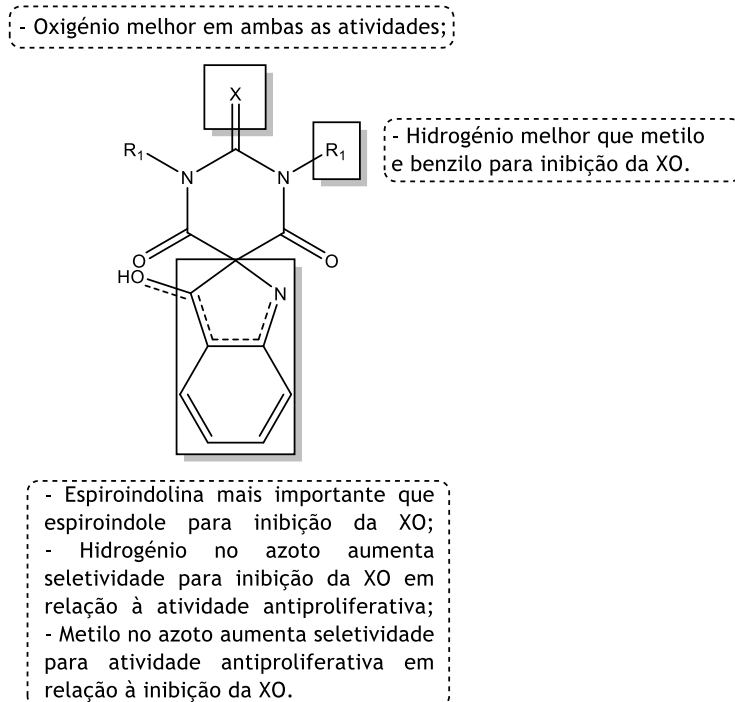


Figura 2.5 - REA dos pirimidoespiroindóis e pirimidoespiroindolinas para a atividade inibitória da XO e atividade antiproliferativa.

2.3 Estudos *In Silico*

Tendo em conta os resultados experimentais para a inibição *in vitro* da enzima XO, realizaram-se estudos de *docking* molecular para o alopurinol e para a pirimidoespiroindolinas **18a** de modo a verificar se tanto as energias de ligação como o possível local de ligação deste último poderão ser explicados por esta ferramenta computacional.

De forma a validar o método, realizou-se o *re-docking* do ligando original co-cristalizado (Y-700) e dos ligandos da literatura. Por se verificar que a *grid* descrita na literatura se adaptava aos ligandos em estudo, foram utilizados todos os parâmetros aí descritos.¹³²

Os estudos de *re-docking* dos ligandos da literatura demonstraram resultados semelhantes ao descrito (dados não apresentados). Para o *re-docking* do ligando original co-cristalizado foi obtido um valor de desvio da raiz quadrada média (RMSD - do inglês, root mean square deviation) se 0,7 Å, o que representa um valor abaixo do padrão de 2 Å,¹³² considerando-se o método validado.

Foram realizadas as simulações de quantificação da energia de ligação entre os ligandos Y-700, alopurinol e **18a**, obtendo-se valores de -8,54, -6,95 e -5,55 Kcal/mol, respetivamente, verificando-se de acordo com os ensaios *in vitro* para a inibição da XO por parte do alopurinol e **19a**, uma vez que o alopurinol foi o que apresentou melhores resultados nos dois ensaios. As interações da espiroindolina **18a** com o sítio ativo da proteína foram averiguadas (figura 2.5), verificando-se que o Y-700 e o alopurinol apresentam as interações esperadas.^{132, 133} Kikuchi *et al.*, relatam como importantes as interações por pontes de hidrogénio entre os ligandos e a glutamina 802 (GLU802), arginina 880 (ARG880) e tirosina 1010 (THR1010), observando-se que o **18a** apenas interage com a arginina 880. No entanto, após se verificar a localização a três dimensões dos vários ligandos no sítio ativo da enzima XO (figura 2.6), nota-se a ligação de todos na cavidade correspondente ao sítio ativo.

Estes dados não são suficientes para explicar a atividade da pirimidoespiroindolinas **19a**. Como tal, foi efetuada a previsão das potenciais atividades biológicas mediante uma ferramenta que permite a simulação do potencial de um composto para uma dada atividade, com suporte na comparação da sua estrutura química com uma base de dados de relações quantitativas de estrutura-atividade (QSAR, do inglês *quantitative structure activity relationships*). Isto é realizado recorrendo a uma base de dados que possui mais de 250 000 compostos com mais de 4000 tipos de atividades biológicas, incluindo efeitos farmacológicos, mecanismo de ação, toxicidade, efeitos adversos e interação com enzimas metabólicas e transportadores, sendo tudo isto possível através do *software* PASS *on-line*.¹⁸ Este *software* apresenta os dados sob a forma de probabilidade, dando a probabilidade do composto ser ativo (pa) e a probabilidade de ser inativo (Pi), podendo estas serem subtraídas e assim ser obtida a probabilidade de ter atividade (Pa-Pi); quando a última é maior, o resultado não é apresentado. Esta ferramenta é

importante para o screening virtual de uma bateria de compostos em conjugação com outros métodos computacionais (exemplo do *docking* molecular). No entanto, neste trabalho de dissertação o *software* PASS *on-line* foi utilizado posteriormente à realização dos testes *in vitro*, de modo a verificar qual a sua relação com os dados experimentais.

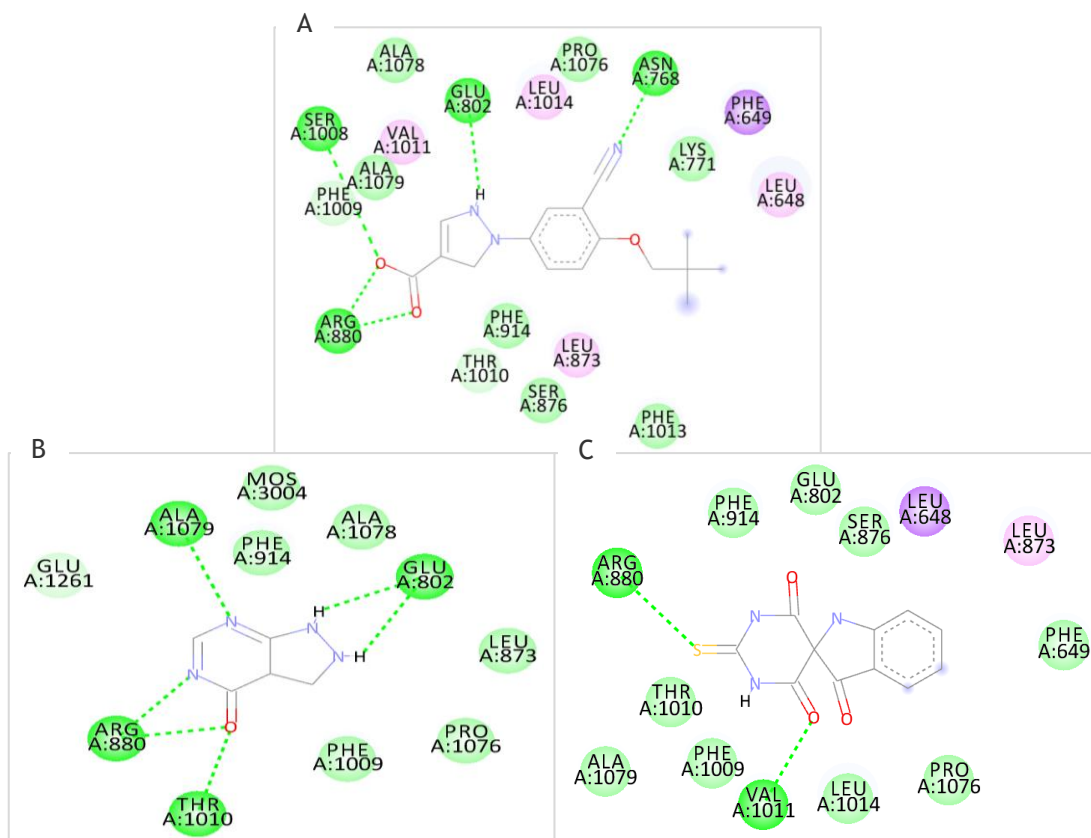


Figura 2.6 - Interações por pontes de hidrogénio dos vários ligandos com a enzima XO. A - Y-700, B - alopurinol, C - pirimidoespiroindolina **18a**.

Após observação dos resultados para Pa-Pi da atividade antibacteriana e atividade na hiperuricémia (inibidor e substrato da XO, tratamento da gota e estimulação da excreção do ácido úrico) (tabela 2.24), verifica-se que todos os (tio)barbituratos apresentam baixas probabilidades de terem atividade antibacteriana, o que é corroborado pelos testes *in vitro*; quanto à probabilidade de terem potencial para tratamento da gota e enquanto inibidor da XO, verifica-se que os que têm Pa-Pi maior que 0,2 são os que apresentam maior atividade no ensaio *in vitro*, à exceção do **18a-b**. Não obstante, muitos dos (tio)barbituratos apresentam elevada probabilidade de serem substrato da XO, podendo ser oxidados por esta enzima. O mesmo acontece para o alopurinol, sendo já conhecido que este inibidor é também metabolizado pela enzima quando se apresenta em menores concentrações no organismo; no entanto, o seu metabolito também é ativo na inibição da XO.²² Um resultado interessante é o facto do **18a** além de apresentar atividade sobre a enzima (no ensaio enzimático), também aparenta ser substrato desta (no ensaio *in silico*). Sugere-se então que o possível metabolito do espiroindole

18a também seja inibidor da enzima, em comparação com a situação do alopurinol. A estimulação da excreção do ácido úrico é também um fator a ter em conta no tratamento da gota, uma vez que se pretende não só diminuir a sua formação como também aumenta a velocidade de excreção do mesmo.²² De entre todos os (tio)barbituratos testados, o **8k** é o que se destaca neste parâmetro.

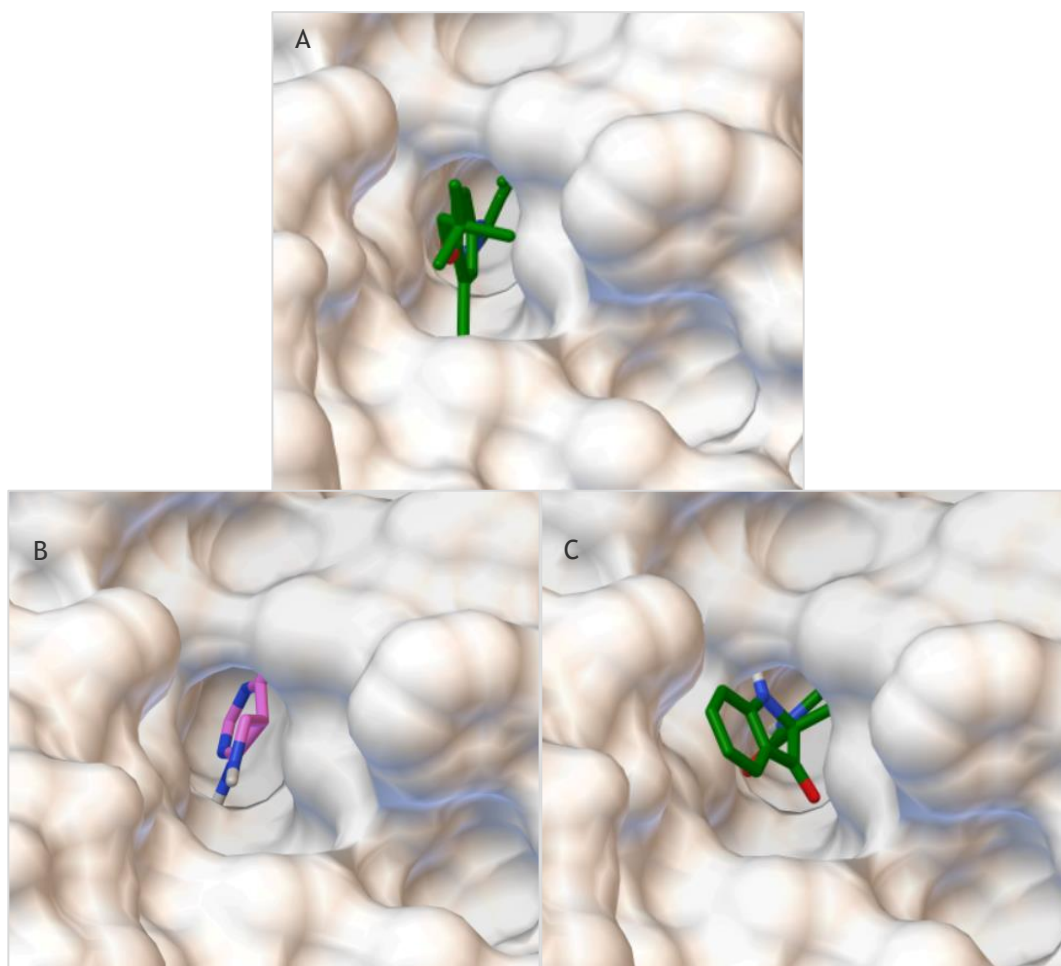


Figura 2.7 - Localização a três dimensões dos vários ligandos no sítio ativo da enzima XO. A - Y-700, B - alopurinol, C - pirimidoespiroindolina **18a**.

Os dados anteriormente apresentados e discutidos podem ajudar a explicar o facto de no *docking* molecular o espiro **18a** apresentar apenas uma ponte de hidrogénio importante, podendo um seu metabolito apresentar uma maior afinidade para a inibição da XO. No entanto, isto é apenas uma possibilidade, tendo de ser confirmada a metabolização do **18a** pela enzima experimentalmente, com posterior identificação do metabolito (se existir).

Outros dados importantes a calcular para a espiroindolina **18a** são os descritores das regras de Lipinsky, parâmetros de Veber e propriedades ADMET. Todos estes parâmetros foram calculados pelo *software* pkSCM *on-line*.¹³

Tabela 2.24 - Dados computacionais de probabilidade (Pa-Pi) calculados através do *software* PASS *on-line* para os (tio)barbituratos sintetizados e alopurinol para o modelo da atividade antibacteriana, inibidor e substrato da XO, tratamento da gota e estimulação da excreção do ácido úrico.

Compostos	Atividade antibacteriana	Inibidor da XO	Substrato da XO	Tratamento da Gota	Estimulação da excreção do ácido úrico
8a	0,03	0,10	0,34	0,10	0,16
8b	0	0	0,19	0	0
8c	0	0,13	0,42	0,11	0,07
8d	0	0	0,31	0	0
8e	0	0,08	0,40	0,12	0,07
8f	0	0,03	0,30	0,17	0,19
8g	0	0,15	0,44	0,09	0,10
8h	0,05	0,23	0,16	0	0,32
8i	0	0	0,15	0	0,17
8j	0,05	0,11	0,04	0	0,23
8k	0,14	0,20	0,29	0,22	0,40
9a	0	0	0,20	0,19	0,37
9b	0	0	0,05	0	0,09
17a	0,15	0,20	0,09	0,11	0,21
17b	0,23	0,27	0,36	0,27	0,30
17c	0,08	0,08	0,22	0	0,15
17d	0,15	0,31	0,23	0,07	0,24
18a	0,11	0,20	0,37	0,23	0,18
18b	0	0	0,21	0	0,03
Alopurinol	0	0,69	0,38	0,89	0,34

O espiro **18a** encontra-se dentro de todos os parâmetros definidos por Lipinsky e Veber (tabela 2.25), indicando com probabilidade superior a 90% que este terá boa absorção e distribuição.

Tabela 2.25 - Dados computacionais para os descritores das regras de Lipinsky e parâmetros de Veber, calculados através do *software* pkSCM *on-line* para a espiroindolina **18a**.

Descritor	Regras de Lipinsky ^{19, 20} e parâmetros de Veber ²¹	18a
MM (g/mol)	≤ 500 - a)	261,26
Lipofilia (Log P)	≤ 5 - a)	-0,44
Ligações rotáveis	≤ 10 - b)	0
Aceitadores de Pontes de Hidrogénio	≤ 10 - a)	5
Dadores de Pontes de Hidrogénio	≤ 5 - a)	3
Área superficial polar (Å ²)	≤ 140 - b)	106,74

- a) Regra de Lipinsky
b) Parâmetros de Veber

Em termos de propriedades ADMET (tabela 2.26), no caso da absorção, a espiroindolina **18a** parece demonstrar alguma solubilidade em água, com potencial boa absorção intestinal. Ao nível da permeabilidade da pele não se demonstra uma permeabilidade elevada uma vez que o log K_p calculado é negativo. O facto de se poder apresentar como substrato da Glicoproteína-P poderá não favorecer a sua acumulação na célula, uma vez que esta é uma proteína de efluxo. Não obstante, o facto de não demonstrar ser um potencial inibidor desta glicoproteína poderá significar a não afetação da absorção de outros fármacos.¹³⁴

Quanto à distribuição, é de salientar que embora os barbituratos tenham quase sempre associados a si uma ação no SNC, a espiroindolina **18a** não aparenta uma elevada distribuição neste sistema, uma vez que apresenta baixo log da barreira hematoencefálica (BHE) e ainda menor log PS (SNC).

No metabolismo, o espiroindole referido aparenta não ser inibidor e substrato das principais CYPs do citocromo P-450. Isto pode permitir uma boa biodisponibilidade do composto disponível no organismo para atuar, tal como pode significar uma baixa probabilidade de interação com a metabolização de outros fármacos. Não obstante, o facto de não ser um potencial substrato do transportador de cationes orgânicos 2 (OCT2 - do inglês, *Organic Cation Transporter 2*) renal poderá significar que este composto é excretado por filtração e não por processos dependentes de transportadores.¹³⁵

O maior problema do espiroindole **18a** poderá dever-se ao facto deste poder ter potencial carcinogénico devido à positividade no teste de AMES. Este é um parâmetro preocupante, apesar de apresentar bons níveis de dose máxima tolerada e de toxicidade oral, e não apresentar um potencial significativo de toxicidade hepática.

Tabela 2.26 - Dados computacionais calculados para as propriedades ADMET com base nos vários modelos do *software* pkSCM *on-line* para a espiroindolina **18a**.

Propriedade	Nome do modelo	Unidades	18a
Absorção	Solubilidade em água	a) (mol/L)	0,37
	Absorção intestinal (humanos)	a) (% Absorção)	71,67
	Permeabilidade da Pele	a) (log Kp)	-3,84
	Substrato da Glicoproteína-P	b)	Sim
	Inibidor da Glicoproteína-P I	b)	Não
	Inibidor da Glicoproteína-P II	b)	Não
Distribuição	Permeabilidade da BHE	a) (log BHE)	-0,53
	Permeabilidade do SNC	a) (log PS)	-2,85
Metabolismo	Substrato da CYP2D6	b)	Não
	Substrato da CYP3A4	b)	Não
	Inibidor da CYP1A2	b)	Não
	Inibidor da CYP2C19	b)	Não
	Inibidor da CYP2C9	b)	Não
	Inibidor da CYP2D6	b)	Não
	Inibidor da CYP3A4	b)	Não
Excreção	Clearance Total	a) (ml/min/kg)	2,29
	Substrato da OCT2 Renal	b)	Não
Toxicidade	Teste de AMES	b)	Sim
	Dose máxima tolerada (humanos)	a) (mg/kg/dia)	4,90
	Toxicidade oral aguda em ratos (DL ₅₀)	a) (mol/kg)	2,38
	Toxicidade oral crónica em ratos (LOAEL)	a) (mg/kg/dia)	33,9
	Hepatotoxicidade	b)	Não
	Sensibilidade na pele	b)	Não

- a) Numérico
b) Categórico

2.4 Conclusões e perspectivas futuras

Com este trabalho de dissertação, foi possível a síntese de 14 novos derivados de (tio)barbituratos, dos quais 2 são 3-oxoespiroindolinas e 4 são 3-hidroxoespiroindóis, obtidos a partir de uma nova via sintética conducente a uma nova sub-classe de sistemas de espiro(tio)barbituratos. No entanto, será essencial a confirmação da estrutura dos pirimidoespiroindóis por cristalografia de Raio-X. Apesar das várias tentativas, não foi possível a síntese de derivados de (tio)barbitúricos fundidos em C5-C6.

Na avaliação biológica da inibição da XO verifica-se que a pirimidoespiroindolina **18a** apresenta algum potencial para inibir esta enzima, com IC_{50} calculado de 8,07 μ M. Pelos estudos complementares *in silico*, verifica-se uma possibilidade de metabolização deste composto pela enzima. Não obstante, pelo *docking* molecular deste ligando com o sítio ativo da XO não se verificam interações capazes de explicar o resultado do IC_{50} calculado, podendo corroborar a hipótese prevista *in silico* de formação de um metabolito que, neste caso, poderá ser ativo para a inibição da enzima. Estes últimos dados, sendo meramente de teor especulativo, deverão ser alvo de experiências conducentes à sua confirmação.

Será ainda importante a síntese de mais derivados do espiroindole com várias substituições no anel aromático e a sua transformação nos derivados indolidínicos, sendo determinante a determinação das suas atividades biológicas para uma melhor e mais completa averiguação da REA. Embora que não seja determinante, será importante avaliar a citotoxicidade dos compostos numa linha celular normal.

Capítulo 3 - Parte experimental

3.1 Síntese

Todos os reagentes e solventes utilizados eram analiticamente puros e foram, sempre que necessário, secos e purificados por métodos padronizados.¹³⁶

Para as reações que foram seguidas por ccf, utilizaram-se 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 a 254 e/ou 365 nm.

Os *pf* foram determinados em tubos capilares abertos, num aparelho de pontos de fusão Büchi B-540 e não foram corrigidos.

Os espectros de FTIR 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 MHz (400,13 e 100,62 MHz, respectivamente), sendo processados no *software* Topspin 3.1. Foram utilizados como solventes o DMSO-*d*₆ ou CDCl₃, sendo ainda utilizados como padrão interno (DMSO-*d*₆, δ = 2,50 ppm e 39,52 ppm ou CDCl₃, δ = 7,26 ppm e 77,16 ppm em RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente). Para a maioria dos compostos foi realizada ainda a técnica de DEPT e os espetros bidimensionais de HSQC e HMBC. Na descrição dos compostos, os dados obtidos são indicados pela seguinte ordem: para RMN de ¹H - solvente; desvio químico; multiplicidade do sinal (s, d, dd, ddd, t, dt ou m); constante de acoplamento; atribuição do próton na molécula; para RMN de ¹³C - solvente; desvio químico; atribuição do carbono na molécula.

Para cada composto sintetizado é apresentada a estrutura a duas dimensões (2D) e a respetiva especificação de entrada da linha de entrada molecular simplificada (SMILES - do inglês *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*), importante para as predições *in silico*. Para isto foi utilizado o *software* ChemBiodraw 13.0 da ChemBridgeSoft®.

Foram efetuados os espetros de massa ES-MS para dois dos compostos sintetizados por microanálise, num aparelho QSTAR XL.

Os dados da espectroscopia de Raio-X foram obtidos num difratómetro de Raios-X Brucker D8 Venture com Mo-Ka e Cu-Ka microfocos dual source e recolhidos no detetor Photon 100 CMOS, na Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.

3.1.1 Precusores

1,3-Difeniltiourea (3)¹⁰⁷

A uma solução de fenilisotiocianato (1) (1 mmol; 135 mg) em diclorometano (0,5 mL), sob agitação e à temperatura ambiente, foi adicionada gota-a-gota uma solução de anilina (2a) (1 mmol; 93 mg) em diclorometano (0,5 mL). A reação foi seguida por ccf (diclorometano), tendo-se completado em 3 horas.

Observou-se a precipitação da 1,3-difeniltiourea (3) no

decorrer da reação, a qual foi filtrado e lavada com éter;

η 95%; cristais brancos; pf 142-144 °C (lit.¹⁰⁸ 140-142 °C);

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3202 (N-H), 3053, 1598 (C=C), 1526,

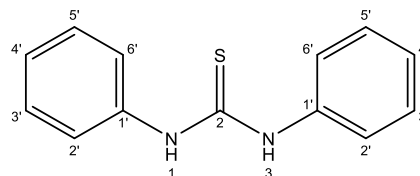
1491, 1449, 1342, 1313, 1288, 1242, 1171, 1069, 1021,

1003, 933, 756, 694, 642, 629, 610; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) 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 ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆) 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); SMILES S=C(NC1=CC=CC=C1)NC2=CC=CC=C2.



Ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a)³³

Uma mistura de 1,3-difeniltiourea (3) (1 mmol; 228 mg), ácido malônico (1,3 mmol; 135 mg) e cloreto de acetilo (3 mmol; 235 mg) foi colocada a 60 °C durante 30 minutos. Verificou-se a dissolução completa da mistura, iniciando-se instantaneamente a precipitação do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (4a).

O sólido obtido foi finamente dividido, filtrado, lavado

com água e recristalizado de ácido acético; η 95%;

cristais em agulha amarelos claro; pf 252-253 °C (lit.^{33, 109}

258-259 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3053, 2895, 1727 (C=O), 1707

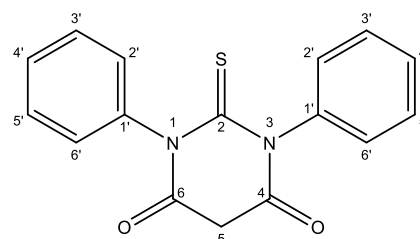
(C=O), 1594 (C=C), 1490, 1454, 1381, 1338, 1260, 1212,

1165, 1169, 1037, 1003, 927, 747, 696, 687, 667; RMN de

¹H (400 MHz, CDCl₃) 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 ¹³C (101 MHz, CDCl₃) 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); SMILES S=C(N(C(C(=O)=O)=O)C2=CC=CC=C2)N1C3=CC=CC=C3.



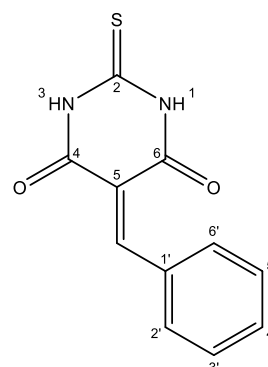
3.1.1.1 5-Benzilidenopirimidinas

Uma mistura de ácido (tio)barbitúrido **4a-d** (1 mmol) e benzaldeído **4a-b** (1 mmol) em água (5 mL) foi colocada a refluxo em banho de parafina durante aproximadamente 2 horas.

O produto foi recolhido por filtração após o arrefecimento da mistura reacional e lavado com água, etanol e éter, tendo-se obtido as seguintes 5-benzilidenopirimidinas: adaptado de 50

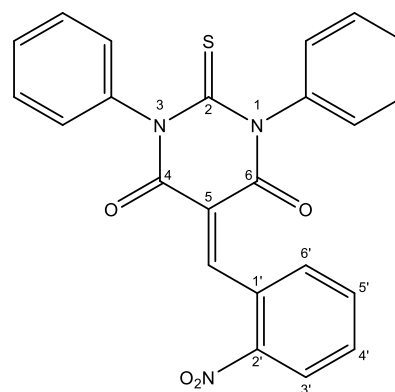
5-Benzilideno-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (6a)

A partir do ácido tiobarbitúrico (**4b**) e benzaldeído (**5a**); η 91%; sólido amarelo; pf 264-266 °C (lit¹¹⁰ 267-270 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3198 (N-H), 3138 (N-H), 3054, 1722 (C=O), 1660 (C=O), 1576, 1559, 1520, 1440, 1384, 1326, 1310, 1291, 1197, 1136, 962, 788, 731, 683; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 11,74 (s, 2H, 2 x NH), 7,18 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, 3' e 5'-ArCH), 7,08 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 4'-ArCH), 7,02 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, 2' e 6'-ArCH), 5,95 (s, 1H, 5-CCH); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 172,88 (2-C_S), 163,09 (4 e 6-CO), 142,43 (5-CCH), 133,48 (1'-ArC), 127,77 (2' e 6'-ArCH), 126,58 (3' e 5'-ArCH), 125,04 (4'-ArCH), 95,94 (5-C); SMILES S=C(NC(/C1=C/C2=CC=C C=C2)=O)NC1=O.



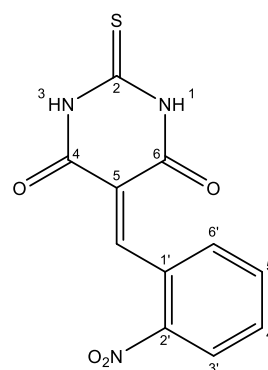
1,3-Difenil-5-(2-nitrobenzilideno)-2-tioxodihidropirimidino-4,6(1H,5H)-diona (6b)

A partir do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**4a**) e 2-nitrobenzaldeído (**5b**); η 90%; sólido laranja claro. pf 235 °C dec. (lit¹¹¹ 232 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3032, 1717 (C=O), 1691 (C=O), 1624, 1607, 1591, 1520 (NO₂), 1486, 1353 (NO₂), 1325 (NO₂), 1265 (C=S), 1189, 1156, 788, 781, 752, 722, 692; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,80 (s, 1H, 5-CCH), 8,19 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz), 7,71 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz), 7,59 (t, 2H, *J* = 7,9 Hz), 7,45 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz), 7,40 - 7,28 (m, 6H), 7,20 (d, 2H, *J* = 7,7 Hz); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 181,43 (2-C_S), 160,28 (CO), 158,81 (CO), 155,02 (5-CCH), 146,19 (2'-ArC), 140,02 (ArC), 139,72 (ArC), 134,04 (5'-ArCH), 131,76 (1'-ArC), 130,40 (4'-ArCH), 130,15 (6'-ArCH), 129,05 (ArCH), 128,88 (ArCH), 128,84 (ArCH), 128,83 (ArCH), 128,27 (ArCH), 128,10 (ArCH), 124,12 (3'-ArCH), 121,29 (5-C); SMILES S=C(N(C1=CC=CC=C1)C(/C2=C/C3=C([N+])([O-])C=CC=C3)=O)N(C4=CC=CC=C4)C2=O.



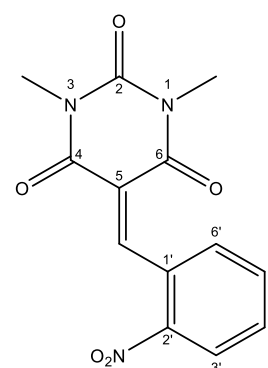
5-(2-Nitrobenzilideno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (6c)

A partir do ácido tiobarbitúrico (4b) e 2-nitrobenzaldeído (5b); η 90%; sólido amarelo claro; pf 239-241 °C (lit¹¹⁰ 246-250 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3255 (N-H), 3156 (N-H), 2876, 1718 (C=O), 1692 (C=O), 1626, 1540, 1513 (NO₂), 1439, 1351 (NO₂), 1288, 1203, 1141, 785, 759, 732, RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12,56 (s, 1H, NH), 12,33 (s, 1H, NH), 8,63 (s, 1H, 5-CCH), 8,24 (dd, 1H, *J* = 8,3, 1,0 Hz, 3'-ArCH), 7,80 (td, 1H, *J* = 7,6, 1,1 Hz, 5'-ArCH), 7,72 - 7,66 (m, 1H, 4'-ArCH), 7,62 (dt, 1H, *J* = 7,7, 1,2 Hz, 6'-ArCH); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 179,05 (2-CS), 160,63 (CO), 159,18 (CO), 153,31 (5-CCH), 146,28 (2'-ArC), 133,77 (5'-ArCH), 131,57 (1'-ArC), 130,48 (4'-ArCH), 130,39 (6'-ArCH), 124,08 (3'-ArCH), 120,60 (5-C); SMILES S=C(NC(/C1=C/C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2)=O)NC1=O.



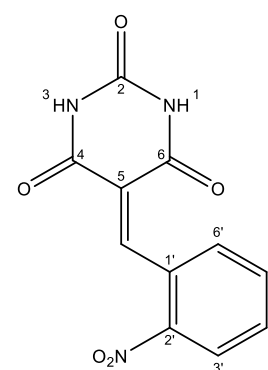
1,3-Dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (6d)

A partir do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (4c) e 2-nitrobenzaldeído (5b); η 97%; pó branco; pf 158-159 °C (lit¹¹² 159-161 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3028, 2950, 1663 (C=O), 1603, 1518 (NO₂), 1457, 1415, 1377, 1342 (NO₂), 1323 (NO₂), 1161, 1092, 1057, 787, 754, 737, 692; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,71 (s, 1H, 5-CCH), 8,26 (dd, 1H, *J* = 8,3, 1,2 Hz, 3'-ArCH), 7,80 (td, 1H, *J* = 7,6, 1,3 Hz, 5'-ArCH), 7,69 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz, 4'-ArCH), 7,53 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, 6'-ArCH), 3,25 (s, 3H, NCH₃), 3,06 (s, 3H, NCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 161,20 (CO), 159,96 (CO), 153,65 (5-CCH), 151,10 (2-CO), 146,15 (2'-ArC), 133,90 (5'-ArCH), 132,01 (1'-ArC), 130,09 (4'-ArCH), 130,02 (6'-ArCH), 124,06 (3'-ArCH), 120,14 (5-C), 28,44 (NCH₃), 27,82 (NCH₃); SMILES O=C(N(C)C(/C1=C/C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2)=O)N(C)C1=O.



5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (6e)

A partir do ácido barbitúrico (4d) e 2-nitrobenzaldeído (5b); η 97%; pó branco; pf 274 - 275 °C (lit¹¹⁰ 274-276 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3230 (N-H), 3070, 2849, 1739 (C=O), 1676 (C=O), 1597, 1516 (NO₂), 1434, 1368, 1341 (NO₂), 1312, 1218, 848, 791, 803, 735, 710; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 11,49 (s, 1H, NH), 11,24 (s, 1H, NH), 8,60 (s, 1H, 5-CCH), 8,23 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, 3'-ArCH), 7,79 (t, 1H, *J* = 7,4 Hz, 5'-ArCH), 7,68 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz, 4'-ArCH), 7,57 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, 6'-ArCH); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 162,38 (CO), 161,20 (CO), 152,45 (5-CCH), 150,26 (2-CO), 146,28 (2'-ArC), 133,76 (5'-



ArCH), 131,72 (1'-ArC), 130,41 (4'-ArCH), 130,16 (6'-ArCH), 124,06 (3'-ArCH), 120,54 (5-C); SMILES O=C(NC(/C1=C/C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2)=O)NC1=O.

3.1.1.2 5-Fenilaminometilenopirimidinas

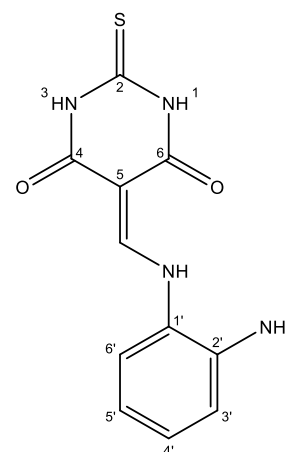
A partir de ácido (tio)barbitúrico **4b-c** e anilina **2b-g** correspondentes pelas condições reacionais A ou B adaptadas da literatura.⁵⁴ Após o término das reações, todos os produtos foram isolados por filtração a quente e lavado com etanol a quente e éter a frio, tendo-se obtido em cada caso as 5-fenilaminometilenopirimidinas abaixo indicadas.

Condições reacionais A: uma mistura de ácido (tio)barbitúrido **4b-c** (1 mmol) e *o*-formiato de trietilo (1 mmol) em butan-1-ol (10 mL) foi colocada a refluxo em banho de parafina, verificando-se a mudança da coloração para vermelho. Aproximadamente 1 hora após o início da reação foi adicionada a *o*-fenilenodiamina (**2b**) (1 mmol) e colocou-se em refluxo por mais 3 horas.

Condições reacionais B: uma mistura de (tio)barbitúrido **4a-d** (1 mmol), anilina **2c-g** (1mmol) e *o*-formiato de trietilo (1 mL) em butan-1-ol (10 mL) foi colocada a refluxo em banho de parafina durante aproximadamente 4 horas.

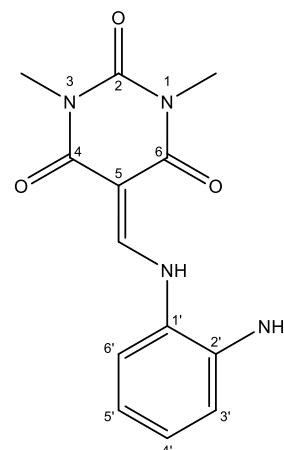
5-(((2-Aminofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (**8a**)

Condições reacionais A, a partir do ácido tiobarbitúrico (**4b**); η 81%; sólido amarelo torrado; pf 247-249 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3429 (NH₂), 3342 (NH₂), 3098, 2998, 2894, 1688 (C=O), 1616, 1587, 1538, 1471, 1330, 1309, 1162 (C=S), 1008, 868, 776; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12,14 (s, 1H, NH), 11,99 (s, 1H, NH), 11,89 (d, 1H, *J* = 10,8 Hz, 1'-Ar-NH), 8,43 (d, *J* = 1H, 10,8 Hz, 5-CCH), 7,35 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, 6'-ArCH), 7,05 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz, 4'-ArCH), 6,87 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, 3'-ArCH), 6,73 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 5'-ArCH), 5,20 (s, 2H, 1'-Ar-NH₂); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 177,70 (2-C_S), 164,03 (C_O), 161,64 (C_O), 153,24 (5-CCH), 140,40 (2'-ArC), 127,71 (4'-ArCH), 126,02 (1'-ArC), 119,71 (6'-ArCH), 118,37 (5'-ArCH), 117,62 (3'-ArCH), 93,81 (5-C); SMILES S=C(NC(/C1=C/ NC2=CC=CC(=O)N2)=O)NC1=O.



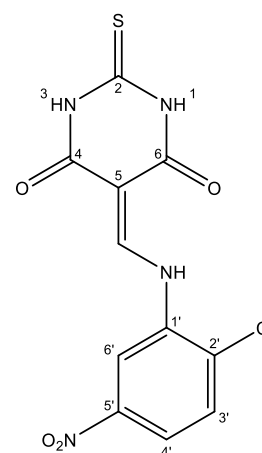
5-(((2-Aminofenil)amino)metileno)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (8b)

Condições reacionais A, a partir do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (**4c**); η 80%; sólido amarelo; pf 199-201 °C (lit¹¹⁵ 200-201 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3393 (NH_2), 3251 (NH_2), 3056, 2953, 2895, 1713 ($\text{C}=\text{O}$), 1644 ($\text{C}=\text{O}$), 1608, 1575, 1506, 1455, 1341, 1302, 1289, 1208, 1141, 1095, 1058, 1011, 979, 852, 810, 778, 755, 743; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 11,76 (d, 1H, $J = 14,1$ Hz, $1'\text{-Ar-NH}$), 8,45 (d, 1H, $J = 13,8$ Hz, 5-CCH), 7,31 (dd, 1H, $J = 8,0, 1,4$ Hz, $6'\text{-ArCH}$), 7,05 (td, 1H, $J = 7,6, 1,4$ Hz, $4'\text{-ArCH}$), 6,88 (dd, 1H, $J = 8,0, 1,4$ Hz, $3'\text{-ArCH}$), 6,74 (td, 1H, $J = 7,6, 1,4$ Hz, $5'\text{-ArCH}$), 5,13 (s, 2H, $2'\text{-Ar-NH}_2$), 3,20 (d, 6H, $J = 9,3$ Hz, 2 x NCH_3); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 164,04 ($\text{C}=\text{O}$), 161,90 ($\text{C}=\text{O}$), 153,17 (5-CCH), 151,45 ($2\text{-C}=\text{O}$), 140,32 ($2'\text{-ArC}$), 127,39 ($4'\text{-ArCH}$), 126,27 ($1'\text{-ArC}$), 119,54 ($6'\text{-ArCH}$), 118,35 ($5'\text{-ArCH}$), 117,60 ($3'\text{-ArCH}$), 92,20 (5-C), 27,53 (NCH_3), 26,94 (NCH_3); SMILES O=C(N(C)C(/C1=C/NC2=CC=CC2N)=O)N(C)C1=O.



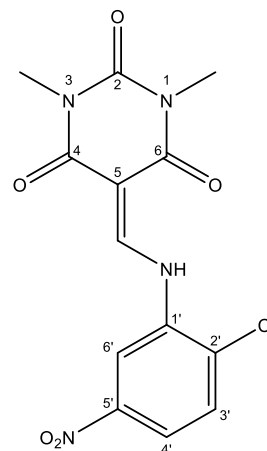
5-(((2-Cloro-5-nitrofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8c)

Condições reacionais B, a partir do ácido tiobarbitúrico (**4b**) e 2-cloro-5-nitroanilina (**2c**); η 97%; sólido branco sujo; pf 348-349 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3074, 2891, 1686 ($\text{C}=\text{O}$), 1620, 1592, 1576, 1517 (NO_2), 1458, 1345, 1317 (NO_2), 1301 (NO_2), 1161 ($\text{C}=\text{S}$), 1053, 1003, 848, 795, 740; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 12,57 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz, $1'\text{-Ar-NH}$), 12,37 (s, 1H, NH), 12,20 (s, 1H, NH), 8,91 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz, 5-CCH), 8,76 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, $6'\text{-CH}$), 8,06 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,6$ Hz, $4'\text{-CH}$), 7,89 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, $3'\text{-CH}$); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 178,04 (2-CS), 164,56 ($\text{C}=\text{O}$), 161,06 ($\text{C}=\text{O}$), 152,92, 147,29, 136,10, 131,07, 129,64, 120,96, 113,70, 96,17 (5-C); SMILES S=C(NC(/C1=C/NC2=CC([N+])([O-])=O)=CC=C2Cl)=O)NC1=O.



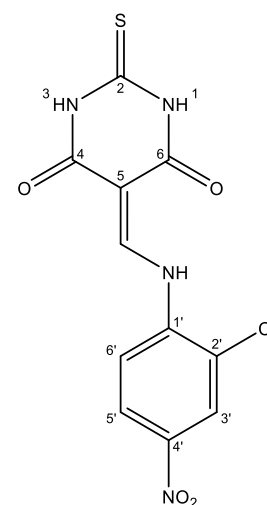
5-(((2-Cloro-5-nitrofenil)amino)metileno)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (8d)

Condições reacionais B, a partir do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (**4c**) e 2-cloro-5-nitroanilina (**2c**); η 92%; pó branco; pf 257-259 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3068, 2956, 1731 (C=O), 1631 (C=O), 1599, 1573, 1528 (NO_2), 1498, 1466, 1419, 1344 (NO_2), 1293, 1204, 1086, 1053, 1000, 882, 825, 740; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 12,52 (s, 1H, 1'-Ar-NH), 8,93 (s, 1H, 5-CCH), 8,74 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 6'-Ar-CH), 8,06 (dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, 1H, 4'-Ar-CH), 7,89 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, 3'-Ar-CH), 3,24 (s, 6H, 2 x N-CH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 164,67 (C=O), 161,38 (C=O), 152,26, 151,14 (2-C=O), 147,31, 136,26, 131,02, 129,46, 120,59, 113,26, 95,00 (5-C), 27,66 (NCH₃), 27,15 (NCH₃); SMILES O=C(N(C)C(/C=C/NC2=CC([N+])([O-])=O)=CC=C2Cl)=O)N(C)C1=O.



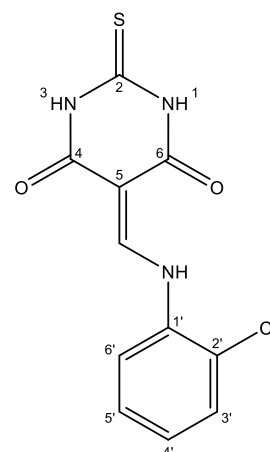
5-(((2-Cloro-4-nitrofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8e)

Condições reacionais B, a partir do ácido tiobarbitúrico (**4b**) e 2-cloro-4-nitroanilina (**2d**); η 91%; sólido amarelo; pf 365 °C dec.; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3332 (N-H), 3053, 2880, 1698 (C=O), 1650, 1575, 1506 (NO_2), 1457, 1347 (NO_2), 1302, 1288, 1267, 1139, 815, 744, 731; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 12,63 (d, 1H, $J = 12,9$ Hz, 1'-Ar-NH), 12,44 (s, 1H, NH), 12,27 (s, 1H, NH), 8,83 (d, 1H, $J = 12,9$ Hz, 5-CCH), 8,48 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, 3'-Ar-CH), 8,25 (dd, 1H, $J = 9,2, 1,9$ Hz, 5'-Ar-CH), 8,19 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, 6'-Ar-CH); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 178,13 (2-CS), 164,48 (C=O), 160,99 (C=O), 151,47 (5-CCH), 144,11, 140,41, 125,45, 124,03, 123,08, 117,96, 97,31 (5-C); SMILES S=C(NC(/C=C/NC2=CC=C([N+])([O-])=O)C=C2Cl)=O)NC1=O.



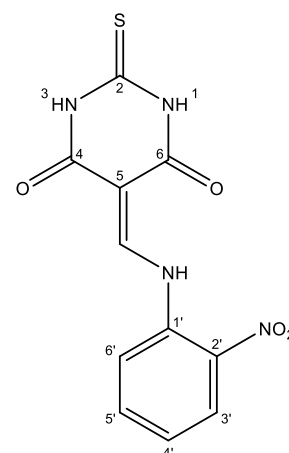
5-(((2-Clorofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8f)

Condições reacionais B, a partir do ácido tiobarbitúrico (**4b**) e 2-cloroanilina (**2e**); η 93%; pó amarelo claro; pf 357-358 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3106 (N-H), 3008, 2894, 2562, 1680 (C=O), 1621, 1599, 1588, 1571, 1536, 1496, 1442, 1316, 1285, 1157 (C=S), 1053, 1000, 854, 802, 767; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 12,53 (d, 1H, $J = 13,4$ Hz, 1'-Ar-NH), 12,31 (s, 1H, NH), 12,14 (s, 1H, NH), 8,74 (d, 1H, $J = 13,4$ Hz, 5-CCH), 7,93 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, ArCH), 7,62 (dd, 1H, $J = 8,0, 1,1$ Hz, ArCH), 7,45 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, ArCH), 7,29 (td, 1H, $J = 7,7, 1,1$ Hz, ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 177,93 (2-CS), 164,49 (CO), 161,26 (CO), 151,86 (5-CCH), 134,81, 130,00, 128,82, 127,22, 123,15, 118,18, 95,27 (5-C); SMILES S=C(NC(/C1=C/NC2=CC=CC=C2Cl)=O)NC1=O.



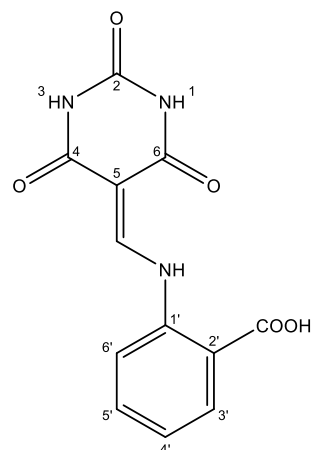
5-(((2-Nitrofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8g)

Condições reacionais B, a partir do ácido tiobarbitúrico (**4b**) e *o*-nitroanilina (**2f**); η 98%; sólido amarelo; pf 330 °C dec.; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3121 (N-H), 3062, 2899, 1684 (C=O), 1633, 1587, 1567, 1532, 1511 (NO_2), 1436, 1337 (NO_2), 1299, 1261, 1151, 991, 856, 790, 740; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 13,33 (d, 1H, $J = 13,3$ Hz, 1'-Ar-NH), 12,36 (s, 1H, NH), 12,19 (s, 1H, NH), 8,72 (d, 1H, $J = 13,3$ Hz, 5-CCH), 8,26 (dd, 1H, $J = 8,4, 1,0$ Hz, ArCH), 8,09 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, ArCH), 7,86 (td, 1H, $J = 7,9, 1,1$ Hz, ArCH), 7,47 (td, 1H, $J = 7,8, 1,0$ Hz, ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 178,10 (2-CS), 163,57 (CO), 161,35 (CO), 151,86 (5-CCH), 138,03, 136,23, 133,94, 126,20, 125,98, 119,60, 96,75 (5-C); SMILES S=C(NC(/C1=C/NC2=CC=CC=C2[N+](=O)[O-])=O)NC1=O.



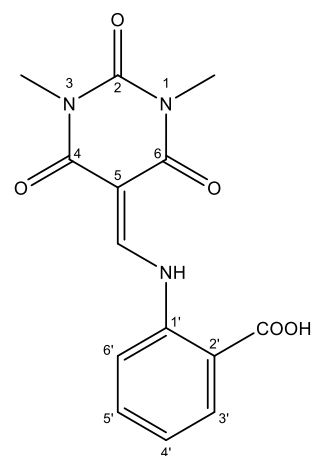
Ácido 2-(((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)amino)benzóico (8h)

Condições reacionais B, a partir do ácido barbitúrico (**4d**) e ácido 2-aminobenzóico (**2g**); η 84%; sólido branco; pf 365 °C dec. (lit⁵⁴ 310-314 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3163 a 2514 (O-H), 3136 (N-H), 3084, 2815, 1729 (C=O), 1673 (C=O), 1614, 1593, 1573, 1503, 1458, 1439, 1420, 1350, 1324, 1290, 1255, 941, 856, 795, 758; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13,75 (s, 1H, 2'-Ar-COOH), 13,38 (d, 1H, *J* = 13,9 Hz, 1'-Ar-NH), 10,96 (s, 1H, NH), 10,88 (s, 1H, NH), 8,62 (d, 1H, *J* = 13,8 Hz, 5-CCH), 8,02 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, ArCH), 7,81 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, ArCH), 7,69 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, ArCH), 7,32 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz, ArCH); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 167,69 (2'-Ar-COOH), 165,08 (C=O), 163,72 (C=O), 150,71 (5-CCH), 149,85 (2-CO), 139,97, 134,57, 131,69, 124,97, 118,57, 116,87, 94,26 (5-C); SMILES O=C(NC(/C1=C/NC2=CC=CC=C2C(O)=O)=O)NC1=O.



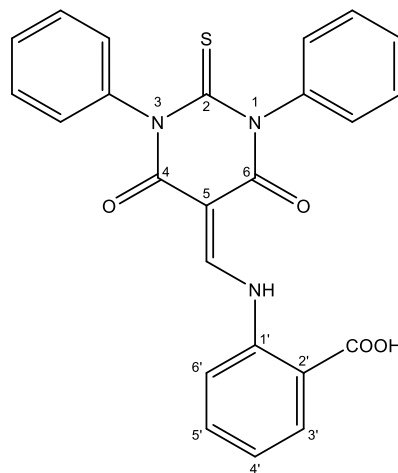
Ácido 2-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)amino)benzóico (8i)

Condições reacionais B, a partir do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (**4c**) e ácido 2-aminobenzóico (**2g**); η 77%; cristais em agulha amarelos claro; pf 314-315 °C (lit¹¹⁶ 210 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3300 a 2600 (O-H), 3083, 1715 (C=O), 1644 (C=O), 1602, 1577, 1450, 1355, 1315, 1197, 1142, 1072, 1013, 869, 789, 752; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13,60 (s, 1H, 2'-Ar-COOH), 13,46 (d, 1H, *J* = 14,1 Hz, 1'-Ar-NH), 8,67 (d, 1H, *J* = 13,9 Hz, 5-CCH), 8,01 (d, 2H, *J* = 7,7 Hz, ArCH), 7,79 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, ArCH), 7,69 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz, ArCH), 7,32 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, ArCH), 3,18 (d, 6H, *J* = 3,1 Hz, 2 x NCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 167,58 (2'-Ar-COOH), 163,04 (C=O), 162,06 (C=O), 151,41 (5-CCH), 150,40 (2-CO), 139,81, 134,53, 131,66, 125,09, 118,69, 116,83, 94,19 (5-C), 27,64 (NCH₃), 27,03 (NCH₃); SMILES O=C(N(C)C(/C1=C/NC2=CC=CC=C2C(O)=O)=O)N(C)C1=O.



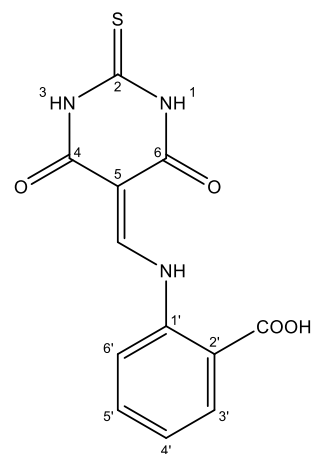
Ácido 2-(((4,6-dioxo-1,3-difenil-2-tioxo-tetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)amino)benzóico (8j)

Condições reacionais B, a partir do ácido difeniltiobarbitúrico (**4a**) e ácido 2-aminobenzóico (**2g**); η 83%; sólido amarelo; pf 322-324 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3400 a 2700 (O-H), 3061, 1689 (C=O), 1660 (C=O), 1644, 1607, 1569, 1439, 1324, 1290, 1259, 1208, 1147 (C=S), 1070, 753, 723, 691; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 13,82 (s, 1H, 2'-Ar-COOH), 13,57 (d, 1H, $J = 14,2$ Hz, 1'-Ar-NH), 8,83 (d, 1H, $J = 14,1$ Hz, 5-CCH), 8,03 (dd, 1H, $J = 7,9, 1,8$ Hz, ArCH), 7,88 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, ArCH), 7,73 (td, 1H, $J = 7,6, 1,2$ Hz, ArCH), 7,52 - 7,43 (m, 4H, Ar-CH), 7,42 - 7,31 (m, 5H, ArCH), 7,29 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 180,74 (2-CS), 167,30 (2'-Ar-COOH), 161,92 (CO), 161,05 (CO), 152,23 (5-CCH), 140,30, 139,66, 139,33, 134,58, 131,68, 129,27, 129,09, 128,90, 128,84, 128,00, 127,88, 125,81, 119,30, 117,50, 96,12 (5-C); SMILES S=C(N(C1=CC=CC=C1)C(=O)N(C2=CC=CC=C2)C2=O)N(C3=CC=CC=C3)C(=O)O.



Ácido 2-(((4,6-dioxo-2-tioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)amino)benzóico (8k)

Condições reacionais B, a partir do ácido tiobarbitúrico (**4b**) e ácido 2-aminobenzóico (**2g**); η 97%; Sólido branco sujo; pf 365 °C dec. (lit⁵⁴ 340-344 °C); FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3142 a 2511 (O-H), 3142 (N-H), 3041, 2966, 2892, 1676 (C=O), 1602, 1581, 1527, 1457, 1437, 1348, 1321, 1288, 1251, 1158 (C=S), 1008, 858, 757; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 13,86 (s, 1H, 2'-Ar-COOH), 13,53 (d, 1H, $J = 14,0$ Hz, 1'-Ar-NH), 12,14 (s, 1H, NH), 12,05 (s, 1H, NH), 8,67 (d, 1H, $J = 14,0$ Hz, 5-CCH), 8,03 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, ArCH), 7,86 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, ArCH), 7,70 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, ArCH), 7,35 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 178,00 (2-CS), 167,61 (2'-Ar-COOH), 162,92 (CO), 161,78 (CO), 150,92 (5-CCH), 139,59, 134,56, 131,67, 125,50, 118,91, 117,30, 95,48 (5-C); SMILES S=C(NC(=O)N(C1=CC=CC=C1)C(=O)N(C2=CC=CC=C2)C2=O)N(C3=CC=CC=C3)C(=O)O.



3.1.1.3 5-Fenilcianometilpirimidinas

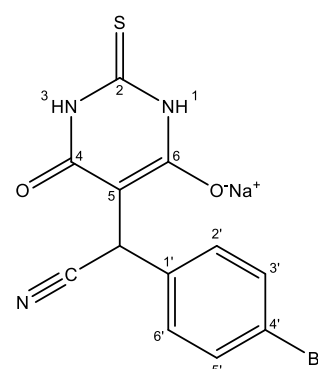
Uma mistura de ácido (tio)barbitúrido (**4b-c**) (1 mmol) e 4-bromobenzaldeído (**5c**) (1 mmol) em água (5 mL) foi colocada em refluxo aproximadamente 2 horas. Após arrefecimento, adicionou-

se o cianeto de sódio (1 mmol) e colocou-se novamente a 70 °C. A reação foi seguida por ccf (diclorometano/20% metanol), tendo-se verificado o término da reação após 1 hora.

A mistura reacional foi evaporada à secura e o sólido obtido dissolvido na mistura de metanol/acetato de etilo. O solvente foi evaporado até se verificar a precipitação do produto, o qual foi filtrado e lavado com éter, tendo-se obtido as seguintes 5-fenilcianometilpirimidinas:
adaptado de 118

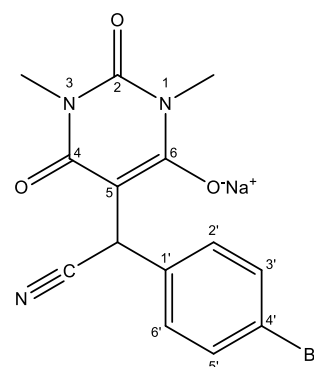
5-((4-Bromofenil)(ciano)metil)-6-oxo-2-tioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (9a)

A partir do ácido tiobarbitúrico (4b); η 67%; sólido branco; pf 310 °C dec.; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3092, 2881, 2245 (CN), 1592 (C=C), 1525, 1485, 1418, 1300, 1173 (C=S), 1010, 789; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10,72 (s, 2H, 2 x NH), 7,47 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, 2 x ArCH), 7,31 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, 2 x ArCH), 5,24 (s, 1H, 5-CCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 173,82 (2-C $\underline{\text{S}}$), 161,41 (4 e 6-C $\underline{\text{C}}$), 137,61, 130,90 (2 x ArC $\underline{\text{H}}$), 129,17 (2 x ArC $\underline{\text{H}}$), 120,26, 119,59, 86,08 (5-C $\underline{\text{C}}$), 30,03 (5-C $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$); SMILES S=C(N1)NC([O-])=C(C(C2=CC=C(Br)C=C2)C#N)C1=O.[Na+].



5-((4-Bromofenil)(ciano)metil)-1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (9b)

A partir do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (4c); η 77%; sólido branco; pf 273 °C dec.; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3445, 2951, 2247 (CN), 1668 (C=O), 1583 (C=C), 1442, 1317, 1010, 776, RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,45 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 2 x ArCH), 7,31 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, 2 x ArCH), 5,35 (s, 1H, CH), 3,04 (s, 6H, 2 x NCH $_3$); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161,10 (4-C $\underline{\text{C}}$ e 6-C $\underline{\text{C}}$), 152,75 (2-C $\underline{\text{O}}$), 138,46, 130,82 (2 x ArC $\underline{\text{H}}$), 129,17 (2 x ArC $\underline{\text{H}}$), 120,85, 119,37, 82,03 (5-C $\underline{\text{C}}$), 31,56 (5-C $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 26,97 (2 x NCH $_3$); SMILES O=C(N1C)N(C)C([O-])=C(C(C2=CC=C(Br)C=C2)C#N)C1=O.[Na+].



3.1.2 Pirimidiazepinas

A partir de 5-benzilidenopirimidina 6a, 5-fenilaminometilenopirimidinas 8a-b ou 5-fenilcianometilpirimidinas 9a-b pelas condições reacionais A, B, C, D, E ou F. A evolução

reacional foi seguida por ccf (diclorometano/5 e 20% metanol), tendo-se em cada caso abaixo descrito indicado o resultado da reação.

Condições reacionais A: uma mistura da 5-benzilideno-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**6a**) (1 mmol), diamina **2b** ou **13** (1,5 mmol) e ácido acético (5 mL) em etanol (15 mL) foi colocada em refluxo durante aproximadamente 2 horas.

Condições reacionais B: uma mistura de 5-benzilideno-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**6a**) (1 mmol) e diamina **2b** ou **13** (1,2 mmol) em *Downtherm* A (1 mL) foi colocada em refluxo durante aproximadamente 2 horas.

Condições reacionais C: uma mistura de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (**4c**) (1 mmol), 4-bromobenzaldeído (**5c**) (1 mmol), fenileno-1,2-diamina (**2b**) (1 mmol) e ácido acético (1 mmol) em etanol (10 mL) foi colocada em refluxo durante aproximadamente 2 horas.

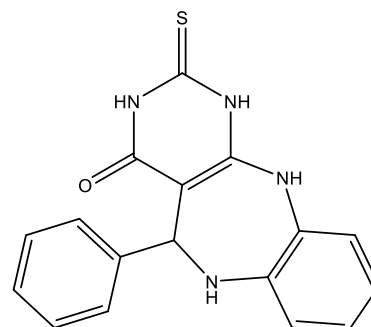
Condições reacionais D: uma mistura de 5-(((2-aminofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**8a**) ou 5-(((2-aminofenil)amino)metileno)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**8b**) (1 mmol) e catalisador [ácido acético (1 ou 0,1 mmol), ácido clorídrico (0,1 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (0,1 mmol) ou *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (1,2 mmol)] em DMF ou butan-1-ol (10 mL) durante aproximadamente 24 horas.

Condições reacionais E: uma mistura de 5-(((2-aminofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**8a**) ou 5-(((2-aminofenil)amino)metileno)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**8b**) (1 mmol) e catalisador ([ácido acético (1 ou 0,1 mmol), ácido clorídrico (0,1 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (0,1 mmol) ou *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (1,2 mmol)] em *Downtherm* A (1 mL) foi colocada em refluxo durante 1 hora.

Condições reacionais F: uma solução de 5-((4-bromofenil)(ciano)metil)-6-oxo-2-tioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (**9a**) ou 5-((4-bromofenil)(ciano)metil)-1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (**9b**) (1 mmol), ureia (**14**) (1 mmol) e catalisador [triethylamina, ácido *p*-toluenossulfônico ou nitrato de ferro(III) monohidratado] (0,1 mmol) em etanol (10 mL) durante 48 horas.

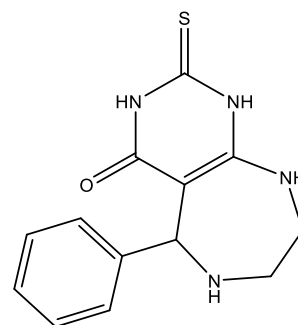
5-Fenil-2-tioxo-1,2,3,5,6,11-hexahidro-4H-benzo[b]pirimido[4,5-e][1,4]diazepin-4-ona (10a)

Condições reacionais A e B, a partir da fenileno-1,2-diamina (2b). Verificou-se por ccf o consumo total do material de partida e a formação de uma mistura complexa.



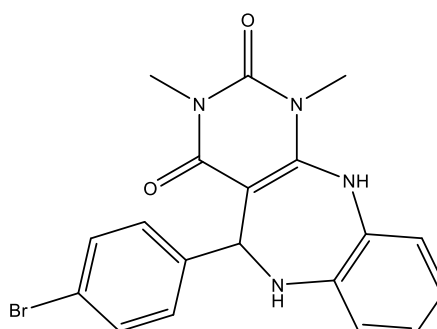
5-Fenil-2-tioxo-1,2,3,5,6,7,8,9-octahidro-4H-pirimido[4,5-e][1,4]diazepin-4-ona (10b)

Condições reacionais A e B, a partir da etileno-1,2-diamina (13). Verificou-se por ccf o consumo total do material de partida e a formação de uma mistura complexa.



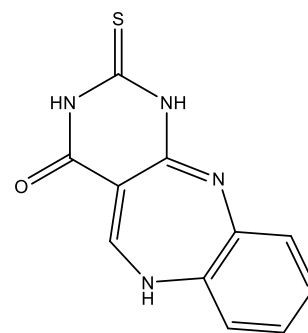
5-(4-Bromofenil)-1,3-dimetil-1,5,6,11-tetrahidro-2H-benzo[b]pirimido[4,5-e][1,4]diazepina-2,4(3H)-diona (10c)

Condições reacionais C. Verificou-se por ccf o consumo total do material de partida e a formação de uma mistura complexa.



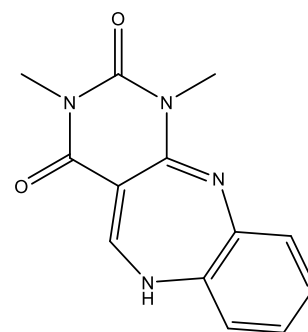
2-Tioxo-1,2,3,6-tetrahidro-4H-benzo[*b*]pirimido[4,5-*e*][1,4]diazepin-4-ona (10d)

Condições reacionais D e E, a partir da 5-fenilaminomeetilenopirimidina **8a**. Não se verificou qualquer evolução reacional por ccf.



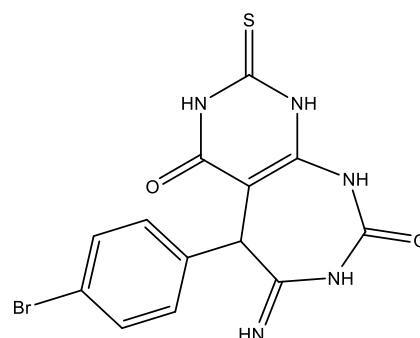
1,3-Dimetil-1,6-dihidro-2H-benzo[*b*]pirimido[4,5-*e*][1,4]diazepina-2,4(3H)-diona (10e)

Condições reacionais D e E, a partir da 5-fenilaminomeetilenopirimidina **8b**. Não se verificou evolução reacional por ccf.



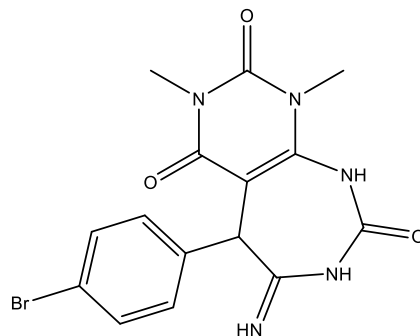
5-(4-Bromofenil)-6-imino-2-tioxo-2,3,5,6,7,9-hexahidro-1H-pirimido[4,5-*d*][1,3]diazepina-4,8-diona (10f)

Condições reacionais F, a partir da 5-fenilacianomeetilenopirimidina **9a**. Não se verificou evolução reacional por ccf.



5-(4-Bromofenil)-6-imino-1,3-dimetil-5,6,7,9-tetrahidro-1H-pirimido[4,5-d][1,3]diazepina-2,4,8(3H)-triona (10g)

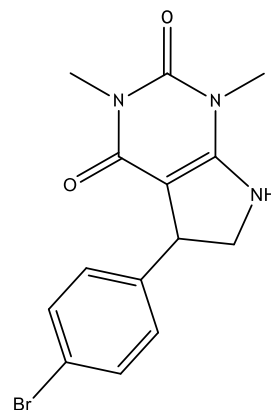
Condições reacionais F, a partir da 5-fenilacianomeetilenopirimidina **9b**. Não se verificou evolução reacional por ccf.



3.1.3 Pirrolopirimidinas

5-(4-bromofenil)-1,3-dimetil-1,5,6,7-tetrahidro-2H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-2,4(3H)-diona (15)

A uma mistura de hidreto de alumínio e lítio (3 mmol; 114 mg) em THF seco (7 mL) em banho de gelo foi adicionada uma mistura de 5-((4-bromofenil)(ciano)metil)-1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (**9b**) (1 mmol; 372 mg) em THF seco (7 mL). A temperatura foi aumentada lentamente até refluxo, permanecendo assim durante 48 horas. A reação foi seguida por ccf (diclorometano/5% metanol), não se verificando evolução.

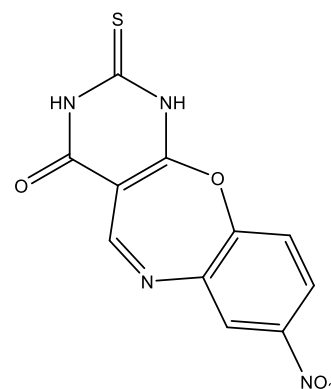


3.1.4 Pirimidoxazepinas

Uma mistura de 5-(((2-cloro-5-nitrofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (**8c**) ou 5-(((2-cloro-5-nitrofenil)amino)metileno)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (**8d**) (1 mmol) em *Downtherm A* (1 mL) foi colocada em refluxo durante 1 hora. A reação foi seguida por ccf (diclorometano/20% metanol), não se verificando evolução reacional.

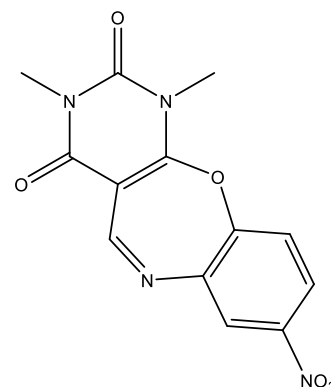
8-Nitro-2-tioxo-2,3-dihidrobenzo[*b*]pirimido[5,4-*f*][1,4]oxazepin-4(1*H*)-ona (16a)

A partir da 5-(((2-cloro-5-nitrofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**8c**).



1,3-Dimetil-8-nitrobenzo[*b*]pirimido[5,4-*f*][1,4]oxazepina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (16b)

A partir da 5-(((2-cloro-5-nitrofenil)amino)metileno)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**8d**).



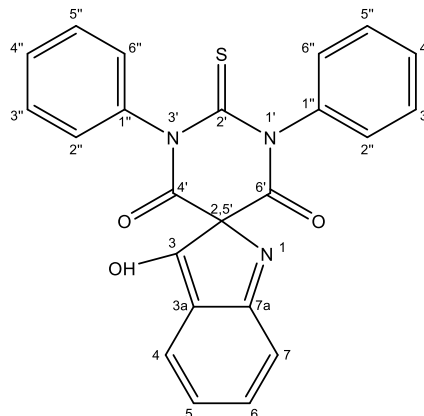
3.1.5 Pirimidoespiroindóis

Uma mistura de 5-benzilidenopirimidina **6b-e** (1 mmol), cloreto de estanho di-hidratado (2 mmol) e ácido clorídrico concentrado (1,1 mL) em metanol (35 mL) foi colocada em refluxo.

Após 2 horas o sólido obtido é filtrado e lavado com etanol e éter etílico a frio, tendo-se obtido os seguintes pirimidoespiroindóis:

3-hidroxi-1',3'-difenil-2'-tioxo-2',3'-dihidro-4'H-espiro[indole-2,5'-pirimidina]-4',6'(1'H)-diona (17a)

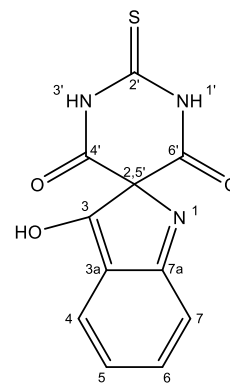
A partir da 1,3-difenil-5-(2-nitrobenzilideno)-2-tioxodihidropirimidino-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**6b**); η 67%; sólido amarelo torrado; pf 255-256 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3200 a 2200 (O-H), 3041, 2791, 2718, 1684 (C=O), 1614, 1592, 1467, 1412, 1347 (C-O), 1297, 1246 (C-O), 1183 (C=S), 955, 902, 764, 741, 684, 603; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7,80 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, 4-ArCH), 7,40 (t, 4H, $J = 7,7$ Hz, 3'' e 5''-ArCH), 7,35 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, 7-ArCH), 7,29 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, 4''-ArCH), 7,24 - 7,19 (m, 5H, 2'' e 6''-ArCH e 6-ArCH), 6,71 (dd, 1H, $J = 8,9, 6,2$



Hz, 5-ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 178,55 (2'-CS), 166,25 (3-C), 159,58 (4' e 6'-CO), 156,12 (7a-ArC), 141,84 (1'-ArC), 130,24 (6-ArCH), 129,56 (2'' e 6''-ArCH), 128,40 (3'' e 5''-ArCH), 126,91 (4''-ArCH), 125,34 (4-ArCH), 119,28 (5-ArCH), 114,30 (3a-ArC), 113,09 (7-ArCH), 85,37; ES MS: m/z encontrado 414,0908 (M+H) $^+$ e 436,0728 (M+Na) $^+$ [calculado para C₂₃H₁₆N₃O₃S $^+$ (M+H) $^+$ 414,09069]; SMILES S=C(N(C1=CC=CC=C1)C(C23C(O)=C(C=CC=C4)C4=N3)=O)N(C5=CC=CC=C5)C2=O.

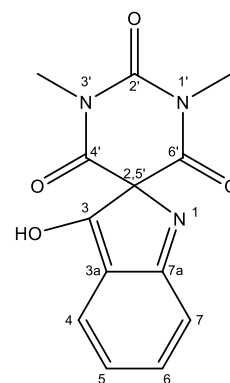
3-Hidroxi-2'-tioxo-2',3'-dihidro-4'H-espiro[indole-2,5'-pirimidina]-4',6'(1'H)-diona (17b)

A partir da 5-(2-nitrobenzilideno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**6c**); η 82%; sólido amarelo escuro; pf 207-208 °C dec.; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3200 a 2200 (O-H), 3381 (N-H), 2879, 2709, 1664 (C=O), 1607, 1506, 1466, 1357 (C-O), 1282, 1251 (C-O), 1164 (C=S), 1005, 939, 907, 785, 754, 714; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 11,31 (s, 2H, 1' e 3'-NH), 7,84 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, 4-ArCH), 7,38 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, 7-ArCH), 7,25 (dd, 1H, $J = 9,0, 6,3$ Hz, 6-ArCH), 6,79 (dd, 1H, $J = 8,8, 6,3$ Hz, 5-ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 174,46 (2'-CS), 166,07 (3-C), 161,01 (4' e 6'-CO), 156,28 (7a-ArC), 130,26 (6-ArCH), 125,43 (4-ArCH), 119,29 (5-ArCH), 114,18 (3a-C), 113,12 (7-ArCH), 84,99 (2,5'-C); ES MS: m/z encontrado 262,0281 (M+H) $^+$ e 284,0100 (M+Na) $^+$ [calculado para C₁₁H₈N₃O₃S $^+$ (M+H) $^+$ 262,02809]; SMILES S=C(NC(C12C(O)=C(C=CC=C3)C3=N2)=O)NC1=O.



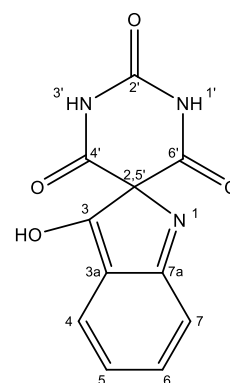
3-Hidroxi-1',3'-dimetil-2'*H*-espiro[indole-2,5'-pirimidina]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-triona (17c)

A partir da 1,3-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)pirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**6d**); η 51%; cristais amarelos; pf 211-213 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3200 a 2200 (O-H), 2922, 2852, 2715, 1707 (C=O), 1644 (C=O), 1604, 1445, 1353 (C-O), 1230 (C-O), 1175, 1142, 1068, 899, 760, 749, 683; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7,90 (dt, 1H, $J = 8,8, 1,1$ Hz, 4-ArCH), 7,37 (dt, 1H, $J = 8,9, 1,0$ Hz, 7-ArCH), 7,29 (ddd, 1H, $J = 8,9, 6,2, 1,1$ Hz, 6-ArCH), 6,80 (ddd, 1H, $J = 8,8, 6,3, 0,9$ Hz, 5-ArCH), 3,17 (s, 6H, 1' e 3'-NCH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 167,41 (3-C), 160,88 (4' e 6'-CO), 155,87 (7a-ArC), 152,26 (2'-CO), 131,16 (6-ArCH), 125,55 (4-ArCH), 120,00 (5-ArCH), 114,88 (3a-C), 112,87 (7-ArCH), 27,66 (1' e 3'-NCH₃); SMILES O=C(N(C)C(C12C(O)=C(C=CC=C3)C3=N2)=O)N(C)C1=O



3-Hidroxi-2'*H*-espiro[indole-2,5'-pirimidina]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-triona (17d)

A partir da 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**6e**); η 79%; sólido amarelo; pf 266-268 °C dec.; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3200 a 2200 (O-H), 3174 (N-H), 2960, 2813, 1722 (C=O), 1666 (C=O), 1648, 1601, 1440, 1403, 1360 (C-O), 1320, 1286, 1238 (C-O), 1142, 906, 841, 766, 752; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,69 (s, 1H), 7,77 (dt, $J = 8,8, 1,2$ Hz, 1H), 7,46 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, 7-ArCH), 7,32 (ddd, 1H, $J = 9,1, 6,4, 0,8$ Hz, 6-ArCH), 6,89 (ddd, 1H, $J = 8,9, 6,4, 0,6$ Hz, 5-ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163,27 (3-C), 162,22 (4' e 6'-CO), 156,04 (7a-ArC), 150,30 (2'-CO), 131,16 (6-ArCH), 123,86 (4-ArCH), 121,49 (5-ArCH), 115,92 (3a-C), 113,43 (7-ArCH); SMILES O=C(NC(C12C(O)=C(C=CC=C3)C3=N2)=O)NC1=O



3.1.6 Pirimidoespiroindolinas

A partir de pirimidoespiroindóis **17a-d** pelas condições reacionais A ou B. A evolução reacional foi seguida por ccf (diclorometano/5% metanol), tendo-se em cada caso abaixo descrito indicado o resultado da reação.

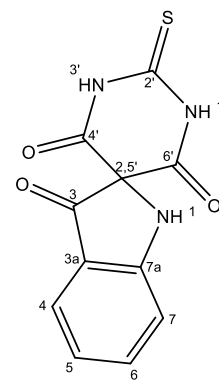
Condições reacionais A: uma mistura de pirimidoespiroindole **17a-d** (1 mmol) em DMF seco (0,3 mL) foi colocada a 120 °C em banho de parafina. Após aproximadamente 10 minutos da dissolução total, verificou-se o termo da reação por ccf.

A solução foi arrefecida à temperatura ambiente e adicionou-se água até se verificar turvação. A mistura obtida foi colocada no frigorífico durante a noite e o produto foi filtrado e lavado com água e éter etílico.

Condições reacionais B: uma mistura de 3-Hidroxi-1',3'-dimetil-2'*H*-espiro[indole-2,5'-pirimidina]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-triona (**17c**) (1 mmol; 273 mg), carbonato de potássio (5 mmol; 120 mg) e iodometano (10 mmol; 1419 mg; 0,623 mL) em DMF seco (5 mL) foi colocada a 50 °C em banho de parafina. Depois de se verificar o termo da reação por ccf, a solução foi arrefecida à temperatura ambiente. De seguida adicionou-se água (10 mL), extraiu-se o produto com clorofórmio (3 x 7 mL), lavou-se a fase orgânica com Brine, secou-se sob sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente à secura. O sólido obtido, depois de seco, foi recristalizado de etanol.

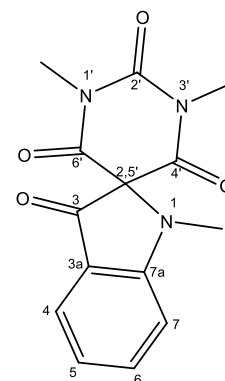
2'-Tioxo-2',3'-dihidro-4'*H*-espiro[indolina-2,5'-pirimidina]-3,4',6'(1'*H*)-triona (**18a**)

Condições reacionais A, a partir da 3-Hidroxi-2'-tioxo-2',3'-dihidro-4'*H*-espiro[indole-2,5'-pirimidina]-4',6'(1'*H*)-diona (**17b**); η 50%; Cristais em agulha castanhos. pf: ; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3099, 3027, 2869, 1687, 1644, 1616, 1574, 1525, 1482, 1422, 1382, 1269, 1225, 1201, 1139, 1096, 850, 745, 637; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 12,63 (s, 2H, 1' e 3'-NH), 7,57 (ddd, 1H, $J = 8,4, 7,0, 1,3$ Hz, 6-ArCH), 7,47 (s, 1H, 1-NH), 7,42 (dt, 1H, $J = 7,9, 0,7$ Hz, 4-ArCH), 7,17 (dt, 1H, $J = 8,3, 0,9$ Hz, 7-ArCH), 6,81 (ddd, 1H, $J = 7,8, 7,0, 0,9$ Hz, 5-ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 189,32 (3-CO), 179,66 (2'-CS), 164,99 (7a-ArC), 162,42 (4',2'-CO), 138,94 (6-ArCH), 125,35 (4-ArCH), 119,07 (5-ArCH), 114,27 (3a-ArC), 113,18 (7-ArCH), 78,33 (2,5'-C); Raios-X: dados em anexo (anexo 5); SMILES S=C(NC(C12C(C(C=CC=C3)=C3N2)=O)=O)NC1=O).



1,1',3'-Trimetil-2'*H*-espiro[indolina-2,5'-pirimidina]-2',3,4',6'(1'*H*,3'*H*)-tetraona (**18b**)

Condições reacionais B. η 90%; Cristais amarelos. pf: 225-228 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3128, 3081, 2995, 2942, 1697, 1632, 1454, 1403, 1335, 1245, 1164, 1115, 1092, 1041, 933, 821, 760, 753, 742, 710, 663; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl $_3$) δ (ppm) 9,20 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, 4-ArCH), 7,75 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, 6-ArCH), 7,29 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, 5-ArCH), 7,15 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, 7-ArCH), 3,79 (s, 3H, 1-NCH $_3$), 3,40 (s, 6H, 1' e 3'-NCH $_3$); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl $_3$) δ (ppm) 175,13 (3-CO), 161,91 (4' e 6'-CO), 152,88 (7a-ArC), 151,99 (2'-CO), 136,63 (6-ArCH), 131,41 (4-ArCH), 123,67 (5-ArCH), 118,60 (3a-ArC), 108,14 (7-ArCH), 92,37 (2,5'-C), 40,45 (1-NCH $_3$), 28,27 (1' e 3'-NCH $_3$); SMILES O=C(N(C)C(C12C(C(C=CC=C3)=C3N2C)=O)=O)N(C)C1=O).



3.2 Avaliação biológica

Para avaliação das atividades biológicas dos compostos sintetizados, apenas foram considerados aqueles que se encontravam puros por RMN de ^1H e ^{13}C .

3.2.1 Tratamento estatístico

Todos os tratamentos de resultados, tal como estudos estatísticos foram realizados no *software* Microsoft Excel 2013. Todos os gráficos são médias dos ensaios realizados, com associação do desvio padrão e teste t de Student em comparação com o controlo negativo.

3.2.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das 5-fenilaminometilenopirimidinas, 5-fenilcianometilpirimidinas e das duas famílias de espiros foi testada fora do âmbito desta dissertação pela Dra. Susana Ferreira.

3.2.3 Determinação *In Vitro* da atividade inibitória da XO

3.2.3.1 Preparação das soluções dos compostos

Os compostos em estudo foram todos dissolvidos em DMSO a uma concentração de 10 mM para a realização do screening a 30 μM e a uma concentração de 50 mM para a realização das curvas de concentração-resposta. A solução mãe de xantina 10 mM foi preparada numa solução aquosa de NaOH 25 mM. Todas as soluções mãe foram armazenadas a 4 °C. A partir destas, foram preparadas as várias diluições em tampão dihidrogeno fosfato 50 mM (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. Foi garantida uma concentração final de 1% de DMSO em cada poço, de modo a garantir que o solvente não interferia com a atividade da enzima (dados não apresentados).

3.2.3.2 Procedimento experimental

A atividade da XO foi determinada medindo espectrofotometricamente a formação do ácido úrico a partir da xantina, com adaptações aos métodos de Zhao *et al* e Gupta *et al*.^{127, 128} Para cada ensaio, foram adicionados 50 μL da solução de teste e 50 μL de suspensão de XO do soro bovino (0,1 U / mL) ao poço de uma placa de 96 poços, sendo a mistura pré-incubada a 37 °C

durante 5 minutos. A reação iniciou-se 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 de 1 em 1 minuto sob agitação lenta, constante e automática de 20 segundos a preceder cada leitura. O tampão foi utilizado como controlo negativo e o alopurinol como um controlo positivo. De modo a descontar a absorvância de cada composto a este comprimento de onda, foi realizado um branco da amostra constituído por 50 µL da solução de teste e 200 µL de tampão. Cada estudo corresponde a três experiências, cada uma realizada em triplicado. A percentagem de inibição da enzima por cada composto em estudo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = [1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco da amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controlo negativo}}] \times 100$$

Após o *screening* inicial a 30 µM para cada composto, calcularam-se os valores de IC₅₀ para os compostos que apresentaram inibições da atividade enzimática superiores a 50%.

3.2.4 Atividade antioxidante - ensaio DPPH

3.2.4.1 Preparação das soluções dos compostos

Os compostos em estudo foram dissolvidos em DMSO com uma 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 a concentração em cada poço de 30 µM no *screening* inicial e de 1, 7,5 15, 30, 50 e 100 µM para as curvas concentração-resposta.

3.2.4.2 Procedimento experimental

A atividade antioxidante foi determinada espectralmente pela quantificação da extensão de redução do DPPH por parte dos compostos em estudo, de acordo com Zhao *et al.*¹²⁷ A mistura reacional contém 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 o Trolox foi utilizado como controlo positivo. Para cada composto em estudo foi realizado um branco, substituindo o DPPH por etanol, de modo a descontar a absorvância de cada composto a este comprimento de onda. 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 para cada composto, calcularam-se os valores de IC_{50} para os dois melhores compostos e para o Trolox.

3.2.5 Atividade anti-proliferativa

A citotoxicidade dos compostos sintetizados foi avaliada e comparada com o controlo positivo 5-Fu nas linhas celulares MCF-7, adquiridas à *American Type Culture Collection* (ATCC). Os meios de cultura RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*) e DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), reagentes e suplementos foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Cada experiência foi realizada em quadruplicado.

3.2.5.1 Culturas celulares

As células MCF-7 mantiveram-se em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico/antimicótico (AB). Nos ensaios, as células foram utilizadas nas passagens 26, 27 e 28.

As culturas celulares foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm^2 e incubadas a 37 °C em atmosfera humidificada com 5% de CO_2 , substituindo-se o meio de cultura a cada 2-3 dias.

3.2.5.2 Preparação das soluções dos compostos

Os compostos em estudo foram todos dissolvidos em DMSO a uma 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 meio completo [com soro fetal bovino (FBS - do inglês, *Fetal Bovine Serum*) e AB] antes de cada experiência, de modo a garantir uma concentração em cada poço de 30 μM . A concentração final do solvente nos ensaios foi inferior a 1% (V/V), não apresentando efeito significativo na viabilidade das células (dados não apresentados).

3.2.5.3 Ensaio de viabilidade celular (ensaio de MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pela quantificação da extensão da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com o procedimento previamente descrito:^{137, 138} Após atingirem a confluência adequada, as células foram tripsinizadas, contadas, diluídas em meio de cultura completo, semeadas em placas de cultura de 96 poços com uma concentração celular de 2×10^4 células/mL e incubadas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO_2 , durante 48 horas. Após a adesão das células às placas, estas foram tratadas com as diferentes concentrações supracitadas e incubadas durante 72 horas. Foram utilizadas

células não tratadas como controlo negativo e o 5-Fu como controlo positivo. No final da incubação, removeu-se o meio, adicionou-se meio de cultura incompleto [sem FBS e antibiótico/antimicótico (AB)] contendo solução de MTT (5 mg/mL em solução salina de tampão fosfato) e voltou-se a incubar a 37 °C durante 4 horas. Por fim, removeu-se o sobrenadante e dissolveram-se os cristais de formazano em DMSO. Registou-se a absorvância num espectrofotómetro de microplacas Bio-Rad xMark™ a 570 nm. A extensão da morte celular foi expressa por percentagem de viabilidade celular relativamente às células utilizadas como controlo negativo.

3.3 Estudos *in-silico*

3.3.1 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 v13.0 da CamBridgeSoft. A estrutura cristalizada da XOR foi obtida através da base de dados de proteínas (PDB - do inglês, *Protein Data Bank*) 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 obtidos utilizando 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 base no método descrito por Ali *et al.*¹³² com a estrutura cristalizada da enzima XOR (1VDV) com o inibidor Y-700 e recorrendo ao re-*docking* dos ligandos do descrito na literatura (dados não apresentados). O sítio ativo para o *docking* foi definido recorrendo a uma *grid box* de dimensões 60 x 60 x 60 Å 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 4). Foi utilizado como método de pesquisa de *docking* o algoritmo *Lamarckian Genetic*, sendo geradas 50 conformações diferentes para cada ligando, com uma população de 150 cromossomas, um rácio de *crossover* de 0,80 e um grau de mutação de genes de 0,02. Todas as outras configurações padrão foram mantidas.

3.3.2 Predição das atividade biológicas por PASS

As previsões das atividades biológicas foram efetuadas para todos os compostos sintetizados pelo *software* PASS *on-line*,¹⁸ em <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>, de modo a prever as suas atividades antibacterianas, como inibidor e substrato da XO, no tratamento da gota e na estimulação da excreção do ácido úrico.

3.3.3 Predição das propriedades farmacocinéticas

As previsões das propriedades farmacocinéticas foram efetuadas, para os compostos em que foram realizadas as curvas concentração-resposta, pelo *software* pkSCM *on-line*,¹³ em <http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/pkscm/prediction>, de modo a prever o perfil ADMET potencial destas moléculas.

Capítulo 4 - Referências

1. G.L. Patrick, Drugs and drug targets: an overview, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, Oxford (2013) 1-12.
2. S. Norn, P.R. Kruse, E. Kruse, History of opium poppy and morphine, *Dan Medicinhist Arbog*, 33 (2005) 171-178.
3. S.B. Karch, Cocaine: history, use, abuse, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92 (1999) 393-397.
4. J. Drews, Drug discovery: a historical perspective, *Science*, 287 (2000) 1960-1964.
5. J.W. Dundee, P.D.A. McIlroy, The history of the barbiturates, *Anaesthesia*, 37 (1982) 726-734.
6. R. Guillén Sans, M. Guzmán Chozas, Historical aspects and applications of barbituric acid derivatives. A review, *Die Pharmazie*, 43 (1988) 827-829.
7. F. López-Muñoz, R. Ucha-Udabe, C. Alamo, The history of barbiturates a century after their clinical introduction, *Neuropsychiatric disease and treatment*, 1 (2005) 329.
8. E. Stevens, A brief history of drug discovery, *medicinal chemistry: the modern drug discovery process*, Pearson Education, Inc.2014, pp. 1-12.
9. M.C. Noe, The modern drug discovery process, in: A.D.S.E. ward (Ed.) *The Handbook of Medicinal Chemistry: Principles and Practice*, Royal Society of Chemistry (2015) 456-485.
10. S. A Patil, Role of medicinal chemist in the modern drug discovery and development, *Organic Chemistry: Current Research*, 1 (2012).
11. J.G. Lombardino, J.A. Lowe, 3rd, The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now, *Nature reviews. Drug discovery*, 3 (2004) 853-862.
12. D.B. Kitchen, H. Decornez, J.R. Furr, J. Bajorath, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications, *Nature reviews. Drug discovery*, 3 (2004) 935-949.
13. D.E. Pires, T.L. Blundell, D.B. Ascher, pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures, *Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (2015) 4066-4072.
14. V. Suvarna, Phase IV of drug development, *Perspectives in Clinical Research*, 1 (2010) 57-60.

15. J. de Ruyck, G. Brysbaert, R. Blossey, M.F. Lensink, Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel, *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 9 (2016) 1-11.
16. D.A. Sabbah, M. Saada, R.A. Khalaf, S. Bardaweel, K. Sweidan, T. Al-Qirim, A. Al-Zughier, H.A. Halim, G.A. Sheikha, Molecular modeling based approach, synthesis, and cytotoxic activity of novel benzoin derivatives targeting phosphoinositide 3-kinase (PI3K α), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25 (2015) 3120-3124.
17. K. Nepali, G. Singh, A. Turan, A. Agarwal, S. Sapra, R. Kumar, U.C. Banerjee, P.K. Verma, N.K. Satti, M.K. Gupta, O.P. Suri, K.L. Dhar, 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, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19 (2011) 1950-1958.
18. A. Lagunin, A. Stepanchikova, D. Filimonov, V. Poroikov, PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances, *Bioinformatics*, 16 (2000) 747-748.
19. C.A. Lipinski, Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug discovery today. Technologies*, 1 (2004) 337-341.
20. C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46 (2001) 3-26.
21. D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2002) 2615-2623.
22. D.A. Kostić, D.S. Dimitrijević, G.S. Stojanović, I.R. Palić, A.S. Đorđević, J.D. Ickovski, Xanthine oxidase: isolation, assays of activity, and inhibition, *Journal of Chemistry*, 2015 (2015) 1-8.
23. E.E. Kelley, N.K.H. Khoo, N.J. Hundley, U.Z. Malik, B.A. Freeman, M.M. Tarpey, Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase, *Free Radical Biology and Medicine*, 48 (2010) 493-498.
24. H.S. Viridi, S. Sharma, S. Mehndiratta, P.M. Bedi, K. Nepali, Design, synthesis and evaluation of 2,4-diarylpyrano[3,2-*c*]chromen-5(4*H*)-one as a new class of non-purine xanthine oxidase inhibitors, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, (2014) 1-7.
25. K.Y. Kim, H. Ralph Schumacher, E. Hunsche, A.I. Wertheimer, S.X. Kong, A literature review of the epidemiology and treatment of acute gout, *Clinical Therapeutics*, 25 (2003) 1593-1617.

26. M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181 (1958) 1199-1200.
27. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1995) 25-30.
28. P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Journal of Science and Technology*, 26 (2004) 211-219.
29. Z. Cheng, J. Moore, L.L. Yu, High-Throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (2006) 7429-7436.
30. S.B. Kedare, R.P. Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of food science and technology*, 48 (2011) 412-422.
31. M.C. Foti, Use and abuse of the DPPH radical, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (2015) 8765-8776.
32. H. Biltz, H. Wittek, Über alkylierte und acylierte barbitursäuren, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 54 (1921) 1035-1058.
33. H. Schulte, Über die kondensation des *N,N'*-diphenylthioharnstoffes mit malonylchlorid, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 87 (1954) 820-824.
34. D.M. Neumann, A. Cammarata, G. Backes, G.E. Palmer, B.S. Jursic, Synthesis and antifungal activity of substituted 2,4,6-pyrimidinetrione carbaldehyde hydrazones, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22 (2014) 813-826.
35. S.S. Neti, C.D. Poulter, Site-selective synthesis of ¹⁵N- and ¹³C-enriched Flavin mononucleotide coenzyme isotopologues, *The Journal of Organic Chemistry*, 81 (2016) 5087-5092.
36. R. Puig-de-la-Bellacasa, L. Giménez, S. Pettersson, R. Pascual, E. Gonzalo, J.A. Esté, B. Clotet, J.I. Borrell, J. Teixidó, Diverse combinatorial design, synthesis and in vitro evaluation of new HEPT analogues as potential non-nucleoside HIV-1 reverse transcription inhibitors, *European journal of medicinal chemistry*, 54 (2012) 159-174.
37. T.L. Lemke, D.A. Williams, Sedative-hypnotics, *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, Wolters Kluwer Health (2012) 485-507.
38. R.S. Vardanyan, V.J. Hruby, Soporific agents, *Synthesis of Essential Drugs*, Elsevier (2006) 58.

39. J. Wang, M.W. Radomski, C. Medina, J.F. Gilmer, MMP inhibition by barbiturate homodimers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23 (2013) 444-447.
40. K.M. Khan, M. Khan, A. Karim, M. Taha, N. Ambreen, A. Gojayev, S. Perveen, M.I. Choudhary, Xanthine oxidase inhibition by 5-arylidene *N,N'*-dimethylbarbituric acid derivatives, *Journal of The Chemical Society Of Pakistan*, 35 (2013) 495-498.
41. S.A. Kohlhoff, M.D. Huband, M.R. Hammerschlag, In vitro activity of AZD0914, a novel DNA gyrase inhibitor, against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (2014) 7595-7596.
42. R.K. Bhaskarachar, V.G. Revanasiddappa, S. Hegde, J.P. Balakrishna, S.Y. Reddy, Design, synthesis and anticancer activity of functionalized spiro-quinolines with barbituric and thiobarbituric acids, *Medicinal Chemistry Research*, 24 (2015) 3516-3528.
43. L.R. Morgan, B.S. Jursic, C.L. Hooper, D.M. Neumann, K. Thangaraj, B. LeBlanc, Anticancer activity for 4,4'-dihydroxybenzophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone (A-007) analogues and their abilities to interact with lymphoendothelial cell surface markers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12 (2002) 3407-3411.
44. R.M. Shaker, E.A. Ishak, Barbituric acid utility in multi-component reactions, *Zeitschrift für Naturforschung*, 66b (2011) 1189 - 1201.
45. G. Mohammadi Ziarani, F. Aleali, N. Lashgari, Recent applications of barbituric acid in multicomponent reactions, *RSC Advances*, 6 (2016) 50895-50922.
46. M. Conrad, H. Reinbsch, Condensstionen von barbitarsäure und aldehyden., *European Journal of Inorganic Chemistry*, 201 (1901) 1339-1344.
47. K.M. Khan, M. Khan, A. Ahmad, A. Irshad, L.B.S. Kardono, F. Rahim, S.M. Haider, S. Ahmed, S. Parveen, Antibacterial and antifungal activities of 5-arylidene-*N,N*-dimethylbarbiturates derivatives, *Journal of The Chemical Society Of Pakistan*, 36 (2014) 1153-1157.
48. W. Fraser, C.J. Suckling, H.C.S. Wood, Latent inhibitors. Part 7. Inhibition of dihydro-orotate dehydrogenase by spirocyclopropanobarbiturates, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (1990) 3137.
49. B.S. Jursic, A Simple method for Knoevenagel condensation of α,β -conjugated and aromatic aldehydes with barbituric acid, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 38 (2001) 655-657.
50. M.L. Deb, P.J. Bhuyan, Uncatalysed Knoevenagel condensation in aqueous medium at room temperature, *Tetrahedron Letters*, 46 (2005) 6453-6456.

51. A. Pałasz, Synthesis of fused uracils: pyrano[2,3-*d*]pyrimidines and 1,4-bis(pyrano[2,3-*d*]pyrimidinyl)benzenes by domino Knoevenagel/Diels-Alder reactions, *Monatshefte für Chemie*, 143 (2012) 1175-1185.
52. Z. Chen, D. Cai, D. Mou, Q. Yan, Y. Sun, W. Pan, Y. Wan, H. Song, W. Yi, Design, synthesis and biological evaluation of hydroxy- or methoxy-substituted 5-benzylidene(thio) barbiturates as novel tyrosinase inhibitors, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22 (2014) 3279-3284.
53. H.M. Aly, M.M. Kamal, Efficient one-pot preparation of novel fused chromeno[2,3-*d*]pyrimidine and pyrano[2,3-*d*]pyrimidine derivatives, *European journal of medicinal chemistry*, 47 (2012) 18-23.
54. A. Rauf, S. Shahzad, M. Bajda, M. Yar, F. Ahmed, N. Hussain, M.N. Akhtar, A. Khan, J. Jonczyk, Design and synthesis of new barbituric- and thiobarbituric acid derivatives as potent urease inhibitors: Structure activity relationship and molecular modeling studies, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23 (2015) 6049-6058.
55. R.S. Vardanyan, V.J. Hruby, 4 - Soporific agents (hypnotics and sedative drugs), *Synthesis of Essential Drugs*, Elsevier, Amsterdam, 2006, pp. 57-68.
56. A.W. Dox, L. Yoder, Spiro-pyrimidines. I. cyclobutane-1,5-spiro-pyrimidines, *Journal of the American Chemical Society*, 43 (1921) 677-684.
57. A.W. Dox, L. Yoder, Spiro-pyrimidines. II. cyclohexane-1,5-spiro-pyrimidines, *Journal of the American Chemical Society*, 43 (1921) 1366-1370.
58. M.D. Huband, P.A. Bradford, L.G. Otterson, G.S. Basarab, A.C. Kutschke, R.A. Giacobbe, S.A. Patey, R.A. Alm, M.R. Johnstone, M.E. Potter, P.F. Miller, J.P. Mueller, In Vitro Antibacterial Activity of AZD0914, a New Spiropyrimidinetrione DNA Gyrase/Topoisomerase Inhibitor with Potent Activity against Gram-Positive, Fastidious Gram-Negative, and Atypical Bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (2015) 467-474.
59. S.B. King, E.S. Stratford, C.R. Craig, E.K. Fifer, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Spiro-Analogues of 5-Benzyl-5-ethyl Barbituric Acid, *Pharmaceutical Research*, 12 (1995) 1240-1243.
60. A.A. Miller, G.L. Bundy, J.E. Mott, J.E. Skepner, T.P. Boyle, D.W. Harris, A.E. Hromockyj, K.R. Marotti, G.E. Zurenko, J.B. Munzner, M.T. Sweeney, G.F. Bammert, J.C. Hamel, C.W. Ford, W.Z. Zhong, D.R. Graber, G.E. Martin, F. Han, L.A. Dolak, E.P. Seest, J.C. Ruble, G.M. Kamlar, J.R. Palmer, L.S. Banitt, A.R. Hurd, M.R. Barbachyn, Discovery and characterization of QPT-1, the progenitor of a new class of bacterial topoisomerase inhibitors, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (2008) 2806-2812.

61. G.S. Basarab, P. Brassil, P. Doig, V. Galullo, H.B. Haimes, G. Kern, A. Kutschke, J. McNulty, V.J.A. Schuck, G. Stone, M. Gowravaram, Novel DNA gyrase inhibiting spiroimidinetriones with a benzisoxazole scaffold: SAR and in vivo characterization, *Journal of Medicinal Chemistry*, 57 (2014) 9078-9095.
62. G.S. Skinner, G. Limperos, R.H. Pettebone, The relative instability of a C5-spirobarbituric acid, *Journal of the American Chemical Society*, 72 (1950) 1648-1649.
63. V.G. Voronin, O.Y. Plevaya, V.G. Mukhanova, M. A. Landau, V.M. Kolbanov, T.P. Privol'neva, V.V. Chugunov, E.F. Lavretskaya, Synthesis and biological activity of spiro[cycloalkane-2-thiobarbituric]acids, *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 10 (1976) 43-46.
64. P. Singh, K. Paul, A simple synthesis of 5-spirobarbituric acids and transformations of spirocyclopropanobarbiturates to 5-substituted barbiturates, *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, 45 (2006) 247-251.
65. P. Singh, K. Paul, A Practical approach for spiro- and 5-monoalkylated barbituric acids, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 43 (2006) 607-612.
66. A. Renard, J. Lhomme, M. Kotera, Synthesis and properties of spiro nucleosides containing the barbituric acid moiety, *Journal of Organic Chemistry*, 67 (2002) 1302-1307.
67. S. Zhang, Z. Shi, W. Cao, T. Gao, H. Deng, Synthesis of a series of perfluoroalkyl containing spiro cyclic barbituric acid derivatives, *Journal of Chemical Research*, 33 (2009) 381-383.
68. S. Kotha, A.C. Deb, R.V. Kumar, Spiro-annulation of barbituric acid derivatives and its analogs by ring-closing metathesis reaction, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 (2005) 1039-1043.
69. S. Kotha, A.C. Deb, Design and synthesis of spiro-heterocycles by ring-closing metathesis, *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, 47 (2008) 1120-1134.
70. M. Adib, M. Sayahi, H. Ziyadi, L.-G. Zhu, H. Bijanzadeh, A novel, one-pot, efficient synthesis of 2-Aroyl-1,4-diaryl-7,9-dimethyl-7,9-diazaspiro[4.5]deca-1,3-diene-6,8,10-triones, *Synthesis*, 2008 (2008) 3289-3294.
71. S. Kotha, R. Ali, Diversity oriented approach to spirobarbituric acid derivatives via a [2+2+2] cycloaddition and Diels–Alder reaction as key steps, *Heterocycles*, 88 (2014) 789.
72. D.J. Burns, D. Best, M.D. Wieczysty, H.W. Lam, All-carbon [3+3] oxidative annulations of 1,3-enynes by rhodium(iii)-catalyzed C-H functionalization and 1,4-migration, *Angewandte Chemie*, 54 (2015) 9958-9962.

73. A. Alizadeh, M.M. Khodaei, M. Fakhari, G. Abdi, S. Ghouzivand, Chemo and regioselective serendipitous electrochemically initiated spirocyclization of caffeic acid esters with barbituric acid derivatives, *Electrochimica Acta*, 178 (2015) 533-540.
74. J.K. Qiu, B. Jiang, Y.L. Zhu, W.J. Hao, D.C. Wang, J. Sun, P. Wei, S.J. Tu, G. Li, Catalytic dual 1,1-*H*-abstraction/insertion for domino spirocyclizations, *Journal of the American Chemical Society*, 137 (2015) 8928-8931.
75. M.B. Teimouri, T. Abbasi, Facile synthesis of oxaspirobicyclic butenolides via a domino Michael addition/aldol reaction/ γ -lactonization sequence, *Tetrahedron*, 66 (2010) 3795-3800.
76. M.B. Teimouri, T. Abbasi, H.R. Khavasi, Multicomponent tandem synthesis of oxospirobicyclic butenolidobarbiturates, *Journal of Chemical Research*, 34 (2010) 310-314.
77. S. Kato, M. Poling, D. Van der Helm, G. Dryhurst, Electrochemical synthesis and structure of a new cyclic barbiturate, *Journal of the American Chemical Society*, 96 (1974) 5255-5257.
78. B.S. Jursic, E.D. Stevens, Preparation of nitrogen heterocycles of spiro[furo[2,3-*d*]-pyrimidine]pyrimidine derivatives, *Synthetic Communications*, 34 (2004) 3915-3923.
79. M. Jalilzadeh, N.N. Pesyan, One-pot four component reaction of unsymmetrical 1-methylbarbituric acid with BrCN and various aldehydes in the presence of Et₃N and/or pyridine, *Journal of the Korean Chemical Society*, 55 (2011) 940-951.
80. Y. Hosseini, S. Rastgar, Z. Heren, O. Büyükgüngörc, N.N. Pesyana, One-pot new barbituric acid derivatives derived from the reaction of barbituric acids with BrCN and ketones, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 20 (2011) 309-318.
81. M.N. Elinson, A.N. Vereshchagin, N.O. Stepanov, P.A. Belyakov, G.I. Nikishin, Cascade assembly of *N,N'*-dialkylbarbituric acids and aldehydes: a simple and efficient one-pot approach to the substituted 1,5-dihydro-2*H*,2'*H*-spiro(furo 2,3-*d* pyrimidine-6,5 '-pyrimidine)-2,2',4,4',6'(1'*H*,3*H*,3'*H*)-pentone framework, *Tetrahedron Letters*, 51 (2010) 6598-6601.
82. E. Kashani, N.N. Pesyan, E. Sahin, Synthesis of new tetrazole derivatives of spiro- and bis-barbiturates, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 62 (2015) 959-967.
83. N. Noroozi Pesyan, A. Shokr, A. Gharib, T. Tunç, E. Sahin, Regioselective one-pot synthesis of new unsymmetric spiro dihydrofurans in the reaction of mixed two different cyclic β -dicarbonyl compounds with BrCN and aldehydes in the presence of Et₃N, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 62 (2015) 234-242.

84. M. Jalilzadeh, N. Noroozi Pesyan, F. Rezaee, S. Rastgar, Y. Hosseini, E. Sahin, New one-pot synthesis of spiro[furo[2,3-*d*]pyrimidine-6,5'-pyrimidine]pentaones and their sulfur analogues, *Molecular Diversity*, 15 (2011) 721-731.
85. M. Jalilzadeh, N.N. Pesyan, New strategy for the synthesis of 5-aryl-1*H*,1'*H*-spiro[furo[2,3-*d*]pyrimidine-6,5'-pyrimidine]2,2',4,4',6'(3*H*,3'*H*,5*H*)-pentaones and their sulfur analogues, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32 (2011) 3382-3388.
86. N.N. Pesyan, M. Jalilzadeh, Bifunctionalized linked bis-spiro[furo[2,3-*d*]pyrimidine- 6,5'-pyrimidine]2,2',4,4',6'(3*H*,3'*H*,5*H*)-pentaones derived from one-pot reaction of (thio)barbituric acids with aromatic dialdehydes and BrCN in the presence of Et₃N, *Turkish Journal of Chemistry*, 36 (2012) 788 - 804.
87. M.B. Teimouri, P. Akbari-Moghaddam, Molecular iodine-catalysed tandem synthesis of oxospirotricyclic fuopyrimidines in water, *Journal of Chemical Research*, 40 (2016) 196-198.
88. V.N. Ingle, P.K. Gaidhane, S.S. Dutta, P.P. Naha, M.S. Sengupta, Synthesis of novel galactopyranosyl-derived spiro barbiturates, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 25 (2006) 661-671.
89. A. Ambrozak, M. Gütschow, Transformation of a spirobarbituric acid *via* aminobarbituric acid-hydantoin rearrangement, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 43 (2006) 807-811.
90. L. Lomlim, J. Einsiedel, F.W. Heinemann, K. Meyer, P. Gmeiner, Proline derived spirobarbiturates as highly effective β -turn mimetics incorporating polar and functionalizable constraint elements, *Journal of Organic Chemistry*, 73 (2008) 3608-3611.
91. K.D. Freeman-Cook, L.A. Reiter, M.C. Noe, A.S. Antipas, D.E. Danley, K. Datta, J.T. Downs, S. Eisenbeis, J.D. Eskra, D.J. Garmene, E.M. Greer, R.J. Griffiths, R. Guzman, J.R. Hardink, F. Janat, C.S. Jones, G.J. Martinelli, P.G. Mitchell, E.R. Laird, J.L. Liras, L.L. Lopresti-Morrow, J. Pandit, U.D. Reilly, D. Robertson, M.L. Vaughn-Bowser, L.A. Wolf-Gouviea, S.A. Yocum, Potent, selective spiropyrrolidine pyrimidinetrione inhibitors of MMP-13, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17 (2007) 6529-6534.
92. Z. Huang, Q. Zhao, G. Chen, H. Wang, W. Lin, L. Xu, H. Liu, J. Wang, D. Shi, Y. Wang, An efficient synthesis of novel dispirooxindole derivatives via one-pot three-component 1,3-dipolar cycloaddition reactions, *Molecules*, 17 (2012) 12704-12717.
93. Y. Hu, D.-Q. Shi, An efficient synthesis of new dispiropyrrolidine derivatives via three-component 1,3-dipolar cycloaddition reaction, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 50 (2013) E121-E125.

94. H.W. Zhao, T. Tian, B. Li, Z. Yang, H.L. Pang, W. Meng, X.Q. Song, X.Q. Chen, Diastereoselective synthesis of dispirobarbiturates through Et₃N-catalyzed [3 + 2] cycloaddition of barbiturate-based olefins with 3-isothiocyanato oxindoles, *Journal of Organic Chemistry*, 80 (2015) 10380-10385.
95. M. Nassiri, F.J. Milani, A. Hassankhani, Synthesis of spiro pyrrolbenzothiazole derivatives via a three-component reaction, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 52 (2015) 1162-1166.
96. E.M. Galati, M.T. Monforte, N. Miceli, E. Raneri, Anticonvulsant and sedative effects of some 5-substituted bromopyrazolinic spirobarbiturates, *Il Farmaco*, 56 (2001) 459-461.
97. F. Foti, G. Grassi, F. Risitano, Reverse regioselection in the synthesis of spiropyrazolobarbiturates using C-Br and C-H nitrilimines, *Synlett*, (2005) 125-126.
98. A.S. Girgis, H. Farag, N.S.M. Ismail, R.F. George, Synthesis, hypnotic properties and molecular modeling studies of 1,2,7,9-tetraaza-spiro[4.5]dec-2-ene-6,8,10-triones, *European journal of medicinal chemistry*, 46 (2011) 4964-4969.
99. N.D. Moirangthem, W.S. Laitonjam, A new and facile synthetic approach to substituted 2-thioxoquinazolin-4-ones by the annulation of a pyrimidine derivative, *Beilstein journal of organic chemistry*, 6 (2010) 1056-1060.
100. V.D. Dyachenko, R.P. Tkachev, Functionally-substituted alkoxyethylenes en reactions with nucleophiles: Part 2. Synthesis of noncyclic structures, benzene derivatives, 5-, 7-membered, and macroheterocycles, *Russian Journal of Organic Chemistry*, 42 (2016) 149-168.
101. A. Pati, P. Majumdar, S. Garnayak, A.K. Behera, R.K. Behera, Regiospecific ring closure reactions of 1,3-diphenylthiobarbituric acid and dimedone: Formation of spiro vs fused heterocycles, *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, 53 (2014) 384-391.
102. R.N. Kumar, T. Suresh, P.S. Mohan, A convenient one-pot synthesis of benzopyrimido[1,8]naphthyridines by knoevenagel condensation, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 40 (2004) 1490-1492.
103. M.P. Lisanti, F. Sotgia, Mct protein inhibitor-related prognostic and therapeutic methods, *Google Patents*, 2013.
104. J.R. Doherty, J.L. Cleveland, Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics, *The Journal of clinical investigation*, 123 (2013) 3685-3692.
105. C.V. Vaz, R. Marques, M.G. Alves, P.F. Oliveira, J.E. Cavaco, C.J. Maia, S. Socorro, Androgens enhance the glycolytic metabolism and lactate export in prostate cancer cells by

modulating the expression of GLUT1, GLUT3, PFK, LDH and MCT4 genes, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 142 (2016) 5-16.

106. E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds, Tables of Spectral Data*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2009) 269-336.

107. A. Lu, Z. Wang, Z. Zhou, J. Chen, Q. Wang, Application of "hydrogen bonding interaction" in new drug development: design, synthesis, antiviral activity, and SARs of thiourea derivatives, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (2015) 1378-1384.

108. F. Wang, P. Zhao, C. Xi, Copper-catalyzed one-pot synthesis of 2-thioxo-2,3-dihydroquinazolin-4(1*H*)-ones from *ortho*-bromobenzamides and isothiocyanates, *Tetrahedron Letters*, 52 (2011) 231-235.

109. S. Botsi, A. Tsolomitis, One or two step acid mediated cyclocondensation process for the preparation of 5-carbethoxy-2-thiouracils from diethyl ethoxymethylenemalonate and thioureas, *Heterocyclic Communications*, 13 (2007) 229-234.

110. N. Seyyedi, F. Shirini, M.S. Nikoo Langarudi, DABCO-based ionic liquids: green and recyclable catalysts for the synthesis of barbituric and thiobarbituric acid derivatives in aqueous media, *RSC Advances*, 6 (2016) 44630-44640.

111. M. Kuanar, B.K. Mishra, Applicability of Williams-Norrington model for quantitative structure spectra relationship, *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Bio-inorganic, Physical, Theoretical & Analytical Chemistry*, 34 (1995) 721-723.

112. M.K. Haldar, M.D. Scott, N. Sule, D.K. Srivastava, S. Mallik, Synthesis of barbiturate-based methionine aminopeptidase-1 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18 (2008) 2373-2376.

113. M.B. Teimouri, A. Tayyebia, *N,N*-dimethylformamide-promoted reaction of isocyanides and barbituric acids: an easy synthesis of 5-[(alkyl or arylamino)methylene]barbituric acids, *Journal of Chemical Research*, 34 (2010) 140-144.

114. G.R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond: in structural chemistry and biology*, Oxford University Press (2001).

115. J.W. Clark-Lewis, M.J. Thompson, 481. 5-Aminomethylene-1:3-dimethylbarbituric acids, *Journal of the Chemical Society*, (1959) 2401-2408.

116. P. Singh, J. Kaur, A. Bhardwaj, Synthesis of highly functionalized barbituric acids and study of their interactions with p-glycoprotein and Mg²⁺-potential candidates for multi drug resistance modulation, *European journal of medicinal chemistry*, 45 (2010) 1256-1262.

117. P. Singh, J. Kaur, K. Paul, , Reactions of 5-benzoyl-/5-carbaldehyde-/5-(3-phenyl-acryloyl)-6-hydroxy-1*H*-pyrimidin-2,4-diones with amines: Anti-cancer and metal sequestering properties Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry, 47 (2008) 291-296.
118. E. Soleimani, M.M. Khodaei, N. Batooeia, M. Baghbanzadehb, Water-prompted synthesis of alkyl nitrile derivatives via Knoevenagel condensation and Michael addition reaction, Green Chemistry, 13 (2011) 556-569.
119. H.S. Thokchom, A.D. Nongmeikapam, W.S. Laitonjam, Synthesis of fused pyrazolo-, isoxazolo-, pyrimido-, and pyridopyrimidines, Canadian Journal of Chemistry, 83 (2005) 1056-1062.
120. H.H. Zoorob, M.M.A.-E. Zahab, M.A.-. Mogib, M.A. Ismail, Peculiar reaction behaviour of barbituric acid derivatives towards aromatic amines., Tetrahedron, 52 (1996) 10147-10158.
121. H.M. Faidallah, K.A. Khan, Synthesis and biological evaluation of new barbituric and thiobarbituric acid fluoro analogs of benzenesulfonamides as antidiabetic and antibacterial agents, Journal of Fluorine Chemistry, 142 (2012) 96-104.
122. C.L. Allen, A.A. Lapkin, J.M.J. Williams, An iron-catalysed synthesis of amides from nitriles and amines, Tetrahedron Letters, 50 (2009) 4262-4264.
123. T. Fujiwara, N. Hirashima, S. Hasegawa, M. Nakanishi, T. Ohwada, Space-filling effects in membrane disruption by cationic amphiphiles, Bioorganic & medicinal chemistry, 9 (2001) 1013-1024.
124. S. Vassiliou, M. Xeilari, A. Yiotakis, J. Grembecka, M. Pawelczak, P. Kafarski, A. Mucha, A synthetic method for diversification of the P1' substituent in phosphinic dipeptides as a tool for exploration of the specificity of the S1' binding pockets of leucine aminopeptidases, Bioorganic & medicinal chemistry, 15 (2007) 3187-3200.
125. X. Chen, K. Tanaka, F. Yoneda, Simple new method for the synthesis of 5-deaza-10-oxaflavin, a potential organic oxidant, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 38 (1990) 307-311.
126. J.D. Figueroa-Villar, S.C.G.d. Oliveira, Synthesis and mechanism of formation of oxadeazaflavines by microwave thermal cyclization of *ortho*-halobenzylidene barbiturates, Journal of Brazilian Chemical Society 22 (2011) 2101-2107.
127. M. Zhao, D. Zhu, D. Sun-Waterhouse, G. Su, L. Lin, X. Wang, Y. Dong, In vitro and in vivo studies on adlay-derived seed extracts: phenolic profiles, antioxidant activities, serum uric acid

suppression, and xanthine oxidase inhibitory effects, *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (2014) 7771-7778.

128. S. Gupta, L.M. Rodrigues, A.P. Esteves, A.M. Oliveira-Campos, M.S. Nascimento, N. Nazareth, H. Cidade, M.P. Neves, E. Fernandes, M. Pinto, N.M. Cerqueira, N. Bras, Synthesis of *N*-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors, *European journal of medicinal chemistry*, 43 (2008) 771-780.

129. D.N. Nicolaides, D.R. Gautam, K.E. Litinas, D.J. Hadjipavlou-Litina, K.C. Fylaktakidou, Synthesis and evaluation of the antioxidant and antiinflammatory activities of some benzo[*l*]khellactone derivatives and analogues, *European journal of medicinal chemistry*, 39 (2004) 323-332.

130. J.P. Dzoyem, L.J. McGaw, J.N. Eloff, 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 Complementary and Alternative Medicine*, 14 (2014) 147-154.

131. D. Gerlier, N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *Journal of Immunological Methods*, 94 (1986) 57-63.

132. H.I. Ali, T. Fujita, E. Akaho, T. Nagamatsu, A comparative study of AutoDock and PMF scoring performances, and SAR of 2-substituted pyrazolotriazolopyrimidines and 4-substituted pyrazolopyrimidines as potent xanthine oxidase inhibitors, *Journal of computer-aided molecular design*, 24 (2010) 57-75.

133. H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, S. Leimkuhler, T. Nishino, Different inhibitory potency of febuxostat towards mammalian and bacterial xanthine oxidoreductases: insight from molecular dynamics, *Scientific reports*, 2 (2012) 331.

134. S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, G. Chang, Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding, *Science*, 323 (2009) 1718.

135. T. Fujita, T.J. Urban, M.K. Leabman, K. Fujita, K.M. Giacomini, Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95 25-36.

136. W.L.F. Armarego, C. Chai, Purification of Laboratory Chemicals (7th Ed.), Butterworth-Heinemann, Boston (2013).

137. R.I. Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, W.J. Sons (2005) 365.

138. S.S. Ramos, S.S. Almeida, P.M. Leite, R.E.F. Boto, S. Silvestre, P. Almeida, VT-NMR and cytotoxic evaluation of some new *ortho*-(alkylchalcogen)acetanilides, *Tetrahedron*, 70 (2014) 8930-8937.
139. B. Zhong, R. Lama, K.M. Smith, Y. Xu, B. Su, Design and synthesis of a biotinylated probe of COX-2 inhibitor nimesulide analog JCC76, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21 (2011) 5324-5327.

Capítulo 5 - Publicações

Comunicações orais no âmbito desta dissertação

Serrano J., Cavalheiro E., Silvestre S., Almeida P., New spiroindole(ine)(thio)barbiturates: unexpected formation, structural characterization and biological evaluation, Abstracts book do XI Annual CICS-UBI Symposium (2016) 34 (anexo 7)

Comunicações orais fora do âmbito desta dissertação

Serrano J., Ramos S. S., Almeida P., Síntese de 2-(alquiltio)-*N*-metilanilidas, como potenciais anticancerígenos análogos da Nimesulida, 4º Ciclo de conferências da Faculdade de Ciências, Universidade da Beira Interior (2015) (anexo 8)

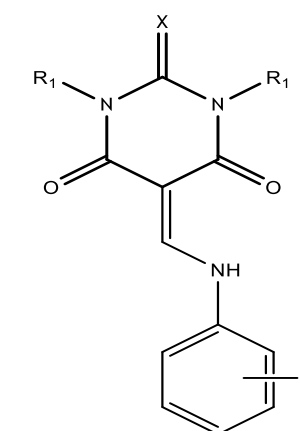
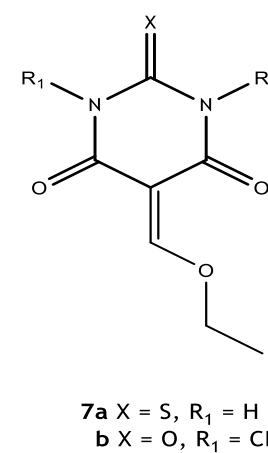
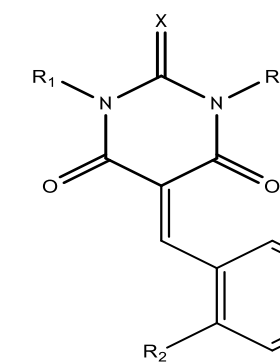
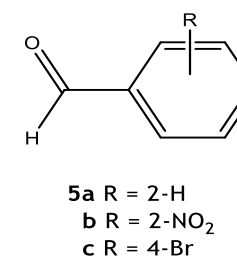
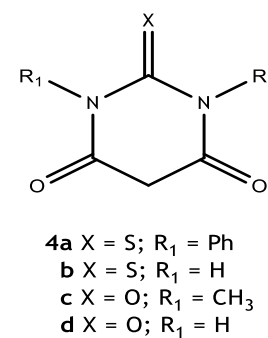
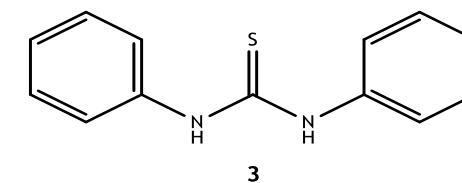
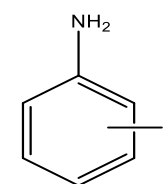
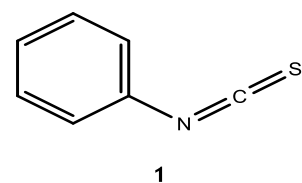
Comunicações em painel fora do âmbito desta dissertação

Catarro M., Cavalheiro E., Serrano J., Silvestre S., Almeida P., Development of new *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides as potencial anticancer drugs, Abstracts book do XI Annual CICS-UBI Symposium (2016) 120 (anexo 9)

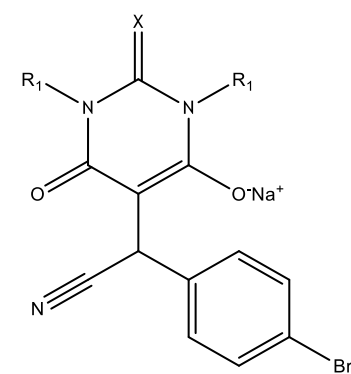
Ramos S. S., Catarro M., Cavalheiro E., Serrano J., Silvestre S., Almeida P., Looking to new 2-(alkylthio)-*N*-formyl-4-nitroanilines resembling Nimesulide analogues as potential anticancer drugs, III Jornadas da Química e Bioquímica, Universidade da Beira Interior (2015) (anexo 10)

Capítulo 6 - Anexos

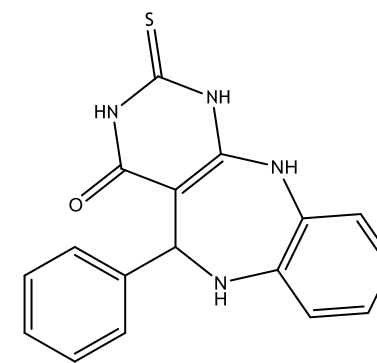
Anexo 1 - Auxiliar de estruturas dos compostos 1-9



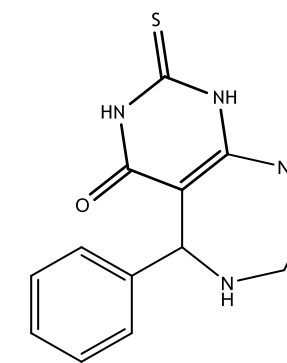
Anexo 2 - Auxiliar de estruturas dos compostos 10-15



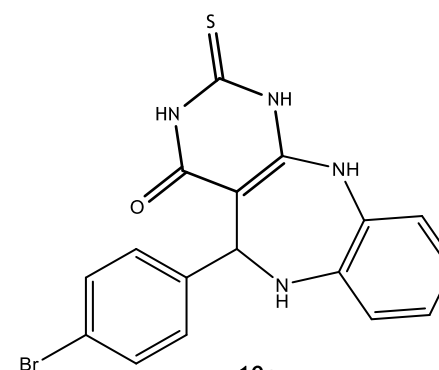
9a X = S; R₁ = H
b X = O; R₁ = CH₃



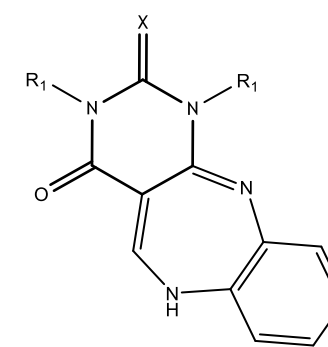
10a



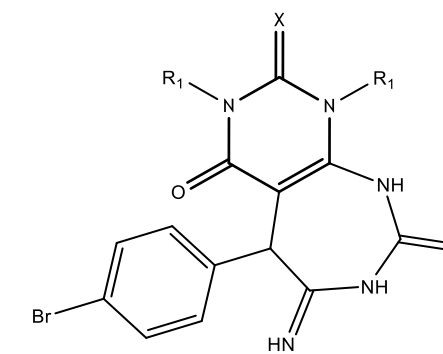
10b



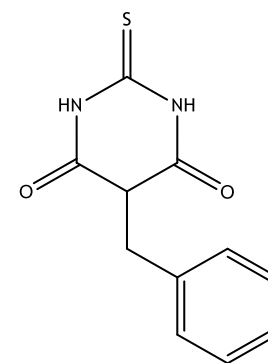
10c



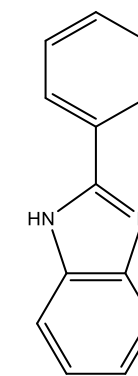
10d X = S; R₁ = H
e X = O; R₁ = CH₃



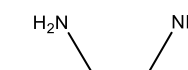
10f X = S; R₁ = H
g X = O; R₁ = CH₃



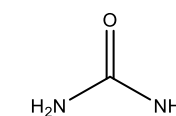
11



12

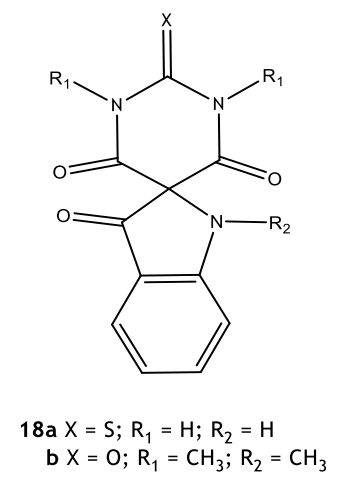
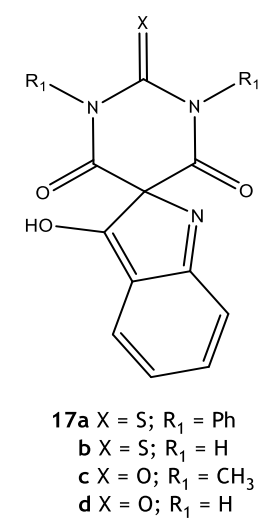
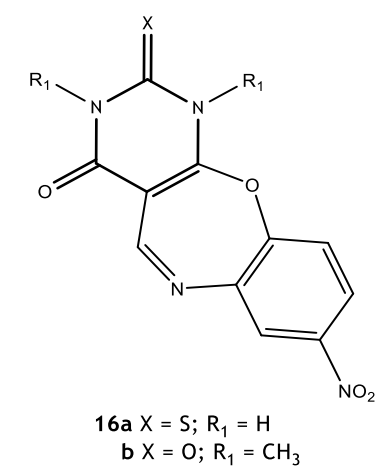
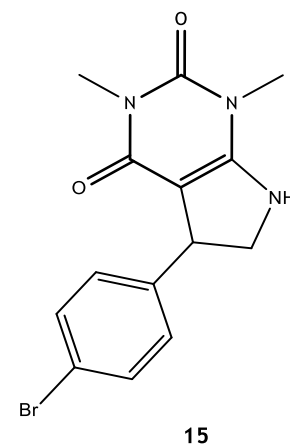


13



14

Anexo 3 - Auxiliar de estruturas dos compostos 16-19



Anexo 4 - 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-binding
atom_par CL 4.09 0.276 35.8235 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-binding
atom_par F 3.09 0.080 15.4480 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-binding
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-binding
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 5 - Dados de Raio-X para a espiroindolina 18a

Tabela 6.1 - Dados do refinamento da estrutura cristalizada de 18a.

Empirical formula	C11 H5 N3 O4 S	
Formula weight	275.24	
Temperature	296(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	?	
Space group	?	
Unit cell dimensions	a = 23.145(4) Å b = 13.125(2) Å c = 7.9586(14) Å	$\alpha = 90^\circ$. $\beta = 106.048(5)^\circ$. $\gamma = 90^\circ$.
Volume	2323.5(7) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.574 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.293 mm ⁻¹	
F(000)	1120	
Crystal size	0.25 x 0.20 x 0.16 mm ³	
Theta range for data collection	3.00 to 28.39°.	
Index ranges	-29<=h<=30, -17<=k<=17, -10<=l<=10	
Reflections collected	16008	
Independent reflections	2921 [R(int) = 0.3542]	
Completeness to theta = 28.39°	99.9 %	
Max. and min. transmission	0.9546 and 0.9304	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	2921 / 0 / 185	
Goodness-of-fit on F ²	1.118	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.1039, wR2 = 0.2682	
R indices (all data)	R1 = 0.1399, wR2 = 0.2905	
Extinction coefficient	0.020(4)	
Largest diff. peak and hole	0.716 and -0.687 e.Å ⁻³	

Tabela 6.2 - Coordenadas atômica ($\times 10^4$) e parâmetros de desvio isotrópico equivalentes ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para **18a**. $U(\text{eq})$ é definido por um terço do o traço do tensor U^{ij} ortogonalizados.

	x	y	z	U(eq)
C(2)	6792(2)	1322(3)	8150(5)	30(1)
C(3)	6992(2)	1206(4)	9968(6)	36(1)
C(4)	7602(3)	1102(4)	10688(7)	46(1)
C(5)	8002(3)	1090(4)	9672(7)	48(1)
C(6)	7810(2)	1205(4)	7880(7)	39(1)
C(7)	7191(2)	1334(3)	7146(6)	29(1)
C(8)	6869(2)	1515(3)	5347(5)	30(1)
C(9)	6182(2)	1646(3)	5401(5)	28(1)
C(10)	5806(2)	917(3)	4083(5)	27(1)
C(12)	5654(2)	2231(3)	1855(6)	29(1)
C(14)	6034(2)	2755(4)	4892(6)	34(1)
N(1)	6205(2)	1418(4)	7169(5)	41(1)
N(11)	5678(2)	1245(3)	2367(5)	30(1)
N(13)	5823(2)	2944(3)	3133(5)	33(1)
O(3)	5657(2)	85(3)	4432(5)	42(1)
O(1)	7021(2)	1571(3)	4034(4)	43(1)
O(2)	6120(2)	3426(3)	5969(5)	57(1)
O(4)	5518(3)	5049(4)	6956(12)	127(3)
S(1)	5397(1)	2556(1)	-221(2)	42(1)

Tabela 6.3 - Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para **18a**.

C(2)-N(1)	1.372(6)
C(2)-C(7)	1.379(7)
C(2)-C(3)	1.400(6)
C(3)-C(4)	1.377(8)
C(3)-H(3)	0.9300
C(4)-C(5)	1.386(9)
C(4)-H(4)	0.9300
C(5)-C(6)	1.380(7)
C(5)-H(5)	0.9300
C(6)-C(7)	1.399(6)
C(6)-H(6)	0.9300
C(7)-C(8)	1.439(6)
C(8)-O(1)	1.194(5)
C(8)-C(9)	1.612(6)
C(9)-N(1)	1.426(6)
C(9)-C(10)	1.506(6)
C(9)-C(14)	1.524(7)
C(10)-O(3)	1.201(6)
C(10)-N(11)	1.383(5)
C(12)-N(11)	1.353(6)
C(12)-N(13)	1.357(6)
C(12)-S(1)	1.650(4)
C(14)-O(2)	1.207(6)
C(14)-N(13)	1.372(6)
N(1)-H(1)	0.72(7)
N(11)-H(11)	0.83(6)
N(13)-H(13)	0.90(10)
N(1)-C(2)-C(7)	112.7(4)
N(1)-C(2)-C(3)	126.2(5)
C(7)-C(2)-C(3)	121.1(4)
C(4)-C(3)-C(2)	116.7(5)
C(4)-C(3)-H(3)	121.6
C(2)-C(3)-H(3)	121.6
C(3)-C(4)-C(5)	122.1(5)
C(3)-C(4)-H(4)	119.0

C(5)-C(4)-H(4)	119.0
C(6)-C(5)-C(4)	121.7(5)
C(6)-C(5)-H(5)	119.1
C(4)-C(5)-H(5)	119.1
C(5)-C(6)-C(7)	116.4(5)
C(5)-C(6)-H(6)	121.8
C(7)-C(6)-H(6)	121.8
C(2)-C(7)-C(6)	121.9(4)
C(2)-C(7)-C(8)	109.4(4)
C(6)-C(7)-C(8)	128.6(4)
O(1)-C(8)-C(7)	133.2(4)
O(1)-C(8)-C(9)	123.3(4)
C(7)-C(8)-C(9)	103.6(4)
N(1)-C(9)-C(10)	114.3(4)
N(1)-C(9)-C(14)	114.0(4)
C(10)-C(9)-C(14)	112.2(3)
N(1)-C(9)-C(8)	103.6(3)
C(10)-C(9)-C(8)	107.3(3)
C(14)-C(9)-C(8)	104.3(4)
O(3)-C(10)-N(11)	120.9(4)
O(3)-C(10)-C(9)	124.4(4)
N(11)-C(10)-C(9)	114.5(4)
N(11)-C(12)-N(13)	117.0(4)
N(11)-C(12)-S(1)	121.5(3)
N(13)-C(12)-S(1)	121.4(4)
O(2)-C(14)-N(13)	122.4(5)
O(2)-C(14)-C(9)	121.8(4)
N(13)-C(14)-C(9)	115.7(4)
C(2)-N(1)-C(9)	110.0(4)
C(2)-N(1)-H(1)	118(6)
C(9)-N(1)-H(1)	128(6)
C(12)-N(11)-C(10)	125.1(4)
C(12)-N(11)-H(11)	115(4)
C(10)-N(11)-H(11)	119(4)
C(12)-N(13)-C(14)	126.0(4)
C(12)-N(13)-H(13)	116(6)
C(14)-N(13)-H(13)	118(6)

Tabela 6.4 - Ângulos de torção (°) para **18a**.

N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	178.8(5)
C(7)-C(2)-C(3)-C(4)	-0.3(7)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-1.3(8)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	1.5(9)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	0.1(8)
N(1)-C(2)-C(7)-C(6)	-177.4(5)
C(3)-C(2)-C(7)-C(6)	1.8(7)
N(1)-C(2)-C(7)-C(8)	3.8(6)
C(3)-C(2)-C(7)-C(8)	-177.1(4)
C(5)-C(6)-C(7)-C(2)	-1.7(7)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	177.0(5)
C(2)-C(7)-C(8)-O(1)	-178.6(5)
C(6)-C(7)-C(8)-O(1)	2.6(9)
C(2)-C(7)-C(8)-C(9)	1.5(5)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-177.3(5)
O(1)-C(8)-C(9)-N(1)	174.3(5)
C(7)-C(8)-C(9)-N(1)	-5.8(5)
O(1)-C(8)-C(9)-C(10)	53.0(6)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-127.0(4)
O(1)-C(8)-C(9)-C(14)	-66.1(5)
C(7)-C(8)-C(9)-C(14)	113.8(4)
N(1)-C(9)-C(10)-O(3)	-17.7(6)
C(14)-C(9)-C(10)-O(3)	-149.5(5)
C(8)-C(9)-C(10)-O(3)	96.6(5)
N(1)-C(9)-C(10)-N(11)	167.1(4)
C(14)-C(9)-C(10)-N(11)	35.3(5)
C(8)-C(9)-C(10)-N(11)	-78.6(4)
N(1)-C(9)-C(14)-O(2)	22.6(7)
C(10)-C(9)-C(14)-O(2)	154.5(5)
C(8)-C(9)-C(14)-O(2)	-89.7(5)
N(1)-C(9)-C(14)-N(13)	-160.3(4)
C(10)-C(9)-C(14)-N(13)	-28.4(6)
C(8)-C(9)-C(14)-N(13)	87.4(4)
C(7)-C(2)-N(1)-C(9)	-8.0(6)
C(3)-C(2)-N(1)-C(9)	172.9(4)
C(10)-C(9)-N(1)-C(2)	124.6(4)

C(14)-C(9)-N(1)-C(2)	-104.5(5)
C(8)-C(9)-N(1)-C(2)	8.2(5)
N(13)-C(12)-N(11)-C(10)	6.2(7)
S(1)-C(12)-N(11)-C(10)	-170.6(3)
O(3)-C(10)-N(11)-C(12)	158.6(5)
C(9)-C(10)-N(11)-C(12)	-26.0(6)
N(11)-C(12)-N(13)-C(14)	2.2(7)
S(1)-C(12)-N(13)-C(14)	179.0(4)
O(2)-C(14)-N(13)-C(12)	-172.6(5)
C(9)-C(14)-N(13)-C(12)	10.4(7)

Anexo 6 - Dados complementares relativos aos ensaios biológicos

Tabela 6.5 - Resultados de screening (em $\mu\text{M} \pm$ desvio padrão) para os ensaios de inibição da XO, DPPH e atividade antiproliferativa em células MCF-7.

Composto	XO	DPPH 20 min	DPPH 60 min	Atividade antiproliferativa MCF-7
Alopurinol	80,41 \pm 0,44	-6,02 \pm 1,52	-5,41 \pm 0,66	-
Trolox	-	69,96 \pm 0,56	70,35 \pm 0,65	-
5-Fu	-	-	-	11,88 \pm 4,38
8a	13,47 \pm 2,51	6,10 \pm 0,95	17,34 \pm 1,46	64,55 \pm 12,45
8c	14,98 \pm 1,48	-4,31 \pm 1,28	-3,68 \pm 1,38	63,70 \pm 4,49
8d	26,47 \pm 2,50	-0,82 \pm 3,32	0,00 \pm 3,67	50,07 \pm 10,37
8e	16,35 \pm 1,41	0,91 \pm 1,04	0,50 \pm 0,17	32,43 \pm 11,98
8f	15,05 \pm 1,13	1,12 \pm 2,03	0,92 \pm 1,42	47,17 \pm 16,17
8g	15,93 \pm 1,98	-12,49 \pm 1,18	-11,79 \pm 0,59	80,23 \pm 3,27
8h	29,98 \pm 5,34	1,75 \pm 2,39	1,98 \pm 2,43	54,90 \pm 7,21
8i	25,92 \pm 2,76	3,37 \pm 3,19	1,98 \pm 2,56	50,34 \pm 13,54
8j	14,78 \pm 3,27	-2,45 \pm 0,45	-2,27 \pm 0,17	43,11 \pm 2,33
8k	27,95 \pm 1,49	-0,56 \pm 1,20	-0,57 \pm 0,63	42,53 \pm 9,00
9a	-9,43 \pm 5,35	-9,22 \pm 2,68	-8,33 \pm 2,65	90,08 \pm 20,64
9b	29,26 \pm 3,28	0,45 \pm 3,53	1,20 \pm 3,29	79,47 \pm 14,73
17a	15,50 \pm 3,92	53,68 \pm 3,92	57,28 \pm 2,13	58,06 \pm 2,12
17b	12,65 \pm 1,86	16,95 \pm 1,86	24,62 \pm 0,94	72,79 \pm 8,90
17c	29,89 \pm 0,78	-2,24 \pm 0,78	-0,64 \pm 0,44	64,82 \pm 16,23
17d	52,26 \pm 0,78	4,98 \pm 0,78	5,39 \pm 2,56	43,48 \pm 6,29
18a	60,48 \pm 1,22	11,67 \pm 1,22	19,14 \pm 1,20	68,94 \pm 17,97
18b	27,76 \pm 2,83	-3,02 \pm 2,83	-3,19 \pm 1,87	33,34 \pm 8,17

Anexo 7 - Resumo da comunicação oral apresentada no âmbito desta dissertação

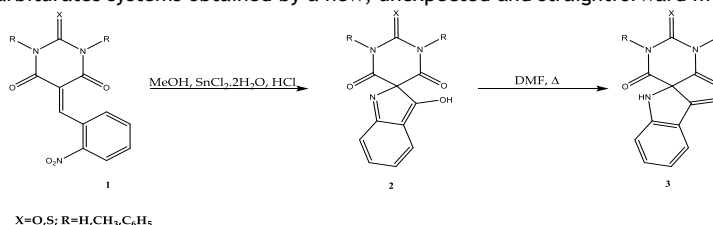
NEW SPIROINDOLE(INE)(THIO)BARBITURATES: UNEXPECTED FORMATION, STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL EVALUATION

Serrano J. ¹, Cavalheiro E. ¹, Silvestre S. ¹, Almeida P. ¹

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

Since ever, heterocyclic chemistry is a branch of organic chemistry that has attracted the attention of the scientific community. In fact, heterocyclic compounds are of very much interest in our daily life with a wide range of applications and a predominantly particularly use as pharmaceuticals. Within the large number of heterocyclic systems, as representative example and of our interest, barbituric acid derivatives are known to possess an extensive range of biological activities, with prominence on the central nervous system. Particularly, spirobarbiturate derivatives are of high importance in organic and medicinal chemistry areas due to the different synthetic ways to introduce both carbocyclic and heterocyclic structures in the 5 position of the pyrimidine ring and to their bioactivity, having interest as potential anticancer¹ and antimicrobial² agents.

In the course of our research, and looking for new pyrimidoquinoline compounds derived from (thio)barbiturates starting from the reduction of 2-nitroarilidenebarbiturates **1**, several unexpected 3-hydroxyspiroindole(thio)barbiturates **2** were obtained which by heating in dimethylformamide for about 10 minutes, afford the corresponding 3-oxospiroindoline(thio)barbiturates **3**. To the best of our knowledge, both **2** and **3** represents a new type of spirobarbiturates systems obtained by a new, unexpected and straightforward method.



All spiro(thio)barbiturates **2-3** were structurally characterized by ¹H and ¹³C NMR, FTIR and MS. Additionally, the structure of 3-oxospiroindoline(thio)barbiturates **3** were unequivocally confirmed by x-ray analysis. The antimicrobial activity as well as the *in vitro* cytotoxicity of these spirobarbiturates against tumor cell lines and normal human dermal fibroblasts as new potential anticancer drugs, are being evaluated.

Keywords: Spiro(thio)barbiturates, anticancer activity, antimicrobial activity, structural characterization, X-Ray.

References: [1] Bhaskarachar R. K. *et al.*, *Medicinal Chemistry Research* 2015, 24, 9, 3516-3528.
[2] Kohlhoff S. A. *et al.*, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014, 58, 12, 7595-7596.

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).

Anexo 8 - Resumo da comunicação oral apresentada fora do âmbito desta dissertação

Síntese de 2-(alquiltio)-*N*-metilanilidas, como potenciais anticancerígenos análogos da Nimesulida

Serrano J., Ramos S. S., Almeida P.

Vários estudos têm demonstrado uma elevada expressão da COX-2 em tumores sólidos, potenciando assim o desenvolvimento das células cancerígenas pelo aumento da produção de Prostaglandina-2 (PGE-2). Uma vez que a Nimesulida e os seus derivados são inibidores seletivos para esta enzima, uma série de estudos têm vindo a ser publicados no sentido de especular a potencialidade destes fármacos enquanto anticancerígenos. Muitas têm sido as alterações no esqueleto básico da Nimesulida, em busca de uma maior seletividade para a inibição da COX-2 e uma maior potencialidade anticancerígena.

Recentemente, foi descrita uma nova síntese de *orto*-(alquilcalcogenio)-*N*-acetanilidas que se assemelham estruturalmente à Nimesulida e seus análogos. Assim, em busca de novos análogos deste fármaco com potencialidades anticancerígenas e tendo em mente a via sintética referida anteriormente, foi iniciado neste trabalho uma variante desta abordagem conducente a obtenção de 2-(alquiltio)-*N*-metilformanilidas e 2-(alquiltio)-4-nitro-*N*-metilformanilidas. No desenvolvimento deste trabalho foi sintetizada uma nova acetanilida e outra formanilida, as quais foram caracterizadas por espectroscopia de ¹H RMN, ¹³C RMN e IV, tal como os seus precursores. Estas sendo potencialmente suscetíveis a serem convertidas nas anilinas correspondentes por hidrólise seriam subsequentemente facilmente convertidos em novos derivados mesilados ou acilados. Assim, e como a hidrólise da acetanilida revelou-se complicada e a hidrólise da formanilida, teoricamente mais fácil, não foi aqui abordada, uma reavaliação deste passo crucial tem de ser necessariamente realizada em estudos futuros.

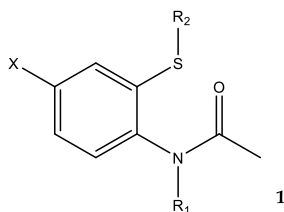
Anexo 9 - Resumo da comunicação em painel apresentada fora do âmbito desta dissertação

DEVELOPMENT OF NEW *ORTHO*-(ALKYLTHIO)-*N*-ACETANILIDES AS POTENCIAL ANTICANCER DRUGS

Catarro M. ¹, Cavalheiro E. ¹, Serrano J. ¹, Silvestre S. ¹, Almeida P. ¹

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

Several studies have demonstrated an overexpression of ciclooxigenase-2 (COX-2) in solid cancers. COX-2 is responsible, namely, for the production of prostaglandin-E₂ (PGE-2), which has been associated with tumor progression, invasiveness and angiogenesis. Thus, it is expectable that COX-2 inhibitors including nimesulide and its analogues can exhibit anticancer properties by targeting COX-2.¹³⁹ Recently, several *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides structurally resembling nimesulide were synthesized and their potential anticancer activity was evaluated. In fact, *in vitro* cell proliferation studies in human breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer cell lines as well as on normal human dermal fibroblasts (NHDF) showed a selective antiproliferative activity for tumoral cells with prominence to the LNCaP cell line and the most potent compounds were *O*- and/or *N*-benzyl and -hexyl acetanilides.¹³⁸ In the present work and taking in mind already known groups that potentiate the antiproliferation activity of nimesulide analogues,¹³⁸ a set of new 6-nitro and 6-acetamide *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides **1** were prepared, in which 2,4-dimethylbenzyl, methylcyclohexyl and/or hexyl are linked to thio and/or to amide group.



X = NO₂, NHCOCH₃

R₁ and/or R₂ = Hexyl, 2,4-dimethylbenzyl, methylcyclohexyl

The COX-2 docking studies and biological evaluation through the MTT cell proliferation assay in MCF-7, LNCaP and NHDF cell lines were performed, confirming the potential interest of these new nimesulide analogues as anticancer drugs.

Keywords: *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides, nimesulide analogues, anticancer activity

References: [1] Zhong B. *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 5324-5327.
[2] Ramos S. S *et al.*, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 8930-8937.

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).

Anexo 10 - Resumo da comunicação em painel apresentada fora do âmbito desta dissertação

Looking to new 2-(alkylthio)-*N*-formyl-4-nitroanilines resembling Nimesulide analogues as potential anticancer drugs

Ramos S.S.^(1,2), Catarro M.^(1,3), Cavalheiro E.^(1,3), Serrano J.^(1,3), Silvestre S.⁽³⁾, Almeida P.^(1,3)

⁽¹⁾Department of Chemistry, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal; ⁽²⁾UMTP-UBI - Unit of Textile and Paper Materials, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal; ⁽³⁾CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal.

Nimesulide is a widely used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) having also analgesic and antipyretic properties.

Several studies have demonstrated an overexpression of COX-2 in solid cancer malignancies, increasing the producing of Prostaglandin-2 (PGE2) and therefore potentiating the development of the cancer cells. Since NSAIDs including Nimesulide and its derivatives inhibited COX-2, it is expectable that these compounds are potentially benefit in both cancer development prevention and anticancer once developed. Nimesulide itself is known to possess anticancer properties.

Even before its discovery and until nowadays, a lot of work has been developed to modify the different moieties constituting the nimesulide skeleton, looking for new potent and more selective COX-2 inhibitors and, more recently, for new anticancer agents.

Recently, as part of our efforts to definitively clarify the identity of the products resulting from the hydroxylation of 2-methylbenzoazolium iodides, we described a new synthesis of *ortho*-(alkylchalcogen)-*N*-ethylacetanilides resembling Nimesulide analogues.^[1]

Thus, looking for new Nimesulide analogues with potentially anti-cancer properties and taking in mind this new synthetic approach to prepare *ortho*-(alkylchalcogen)-*N*-alkylanilides, we ended a simple way to obtain 2-(alkylthio)-*N*-formyl-4-nitroanilines starting from 6-nitrobenzothiazole. The formilanilides so obtained already protected with a formyl group can be easily converted in other anilides by hydrolysis followed by acylation.

All this new anilides were structurally characterized by ¹H and ¹³C NMR and FTIR. The *in vitro* cytotoxicity of this anilides against human breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer cell lines as well as normal human dermal fibroblasts (NHDF) will be evaluated looking for new and potent anti-cancer drugs.

^[1] S. S. Ramos, L. V. Reis, R. E. F. Boto, P. F. Santos, P. Almeida, "Synthesis and Dynamic Study of New *ortho*-(alkylchalcogen)acetanilide atropisomers. A second look at the hydrolysis of quaternary 2-methylbenzazol-3-ium salts", Tetrahedron Letters, 2013, 54(40), 5441-5444.

KEY-WORDS: Nimesulide analogous, anticancer activity, new synthetic approach

Acknowledgments: This work was financed by COMPETE (Project Pest-C/SAU/UI0709/2011).