

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Síntese de diidropirimidinonas com potencial atividade antitumoral

ITAMAR LUÍS GONÇALVES

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Síntese de diidropirimidinonas com potencial atividade antitumoral

Tese apresentada por **Itamar Luís Gonçalves** para
obtenção do GRAU DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Eifler-Lima

Porto Alegre, 2021

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.11.2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Adriana Raffin Pohlmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Fabrício Figueiró

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Pablo Machado

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Dr. Ricardo José Alves (suplente)

Universidade Federal de Minas Gerais

CIP - Catalogação na Publicação

Gonçalves, Itamar Luís
Síntese de diidropirimidinonas com potencial
atividade antitumoral / Itamar Luís Gonçalves. --
2021.
353 f.
Orientador: Vera Lucia Eifler-Lima.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. planejamento de fármacos. 2. atividade
antineoplásica. 3. reação de Biginelli. 4.
diidropirimidinonas . I. Eifler-Lima, Vera Lucia,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, ao Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (UFRGS,) ao Laboratório 22 do Departamento de Bioquímica (UFRGS), e ao Laboratório K-206 do Instituto de Química (UFRGS) que disponibilizaram equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos descritos na elaboração da presente tese.

conditions biginelli-type
irradiation chiral_center
microwave-assisted
preparation reaction
derivatives
recyclable
functionalized
convenient supported
condensation recoverable analogues
Hantzsch
Bronsted based
facile
effective
studies
microwave
catalysts
via
solid simple
solvent
catalysts
aqueous
promoted
assisted
coupling
efficient
pyridines
oxide
liquids
friendly
polymer
sulfone
cyclocondensation
mesoporous
graphene
green
chemistry
method
sulfuric
ultrasound
reusable
improved
catalytic
biginelli-like
dihydropyrimidinone
nanoparticles
three-component
14
1,4-dihydropyridin-2-one
1,2-dihydropyridin-2-one
condensation
dihydropyrimidines
1,2-dihydropyridin-2-one
one-pot
approach
molecular
catalysed
condition
antimicrobial
asymmetric
structure
dihydropyrimidine
organocatalyst
biological
reusable
improved
enantioselective
aldehydes
environmentally
efficient
heterogeneous



AGRADECIMENTOS

À minha família, pela compreensão e educação que recebi ao longo dos anos.

Às pessoas especiais com as quais tive contato durante a graduação e que em considerável parte contribuíram para minha formação em diferentes aspectos.

Aos professores Vera Lucia Eifler-Lima e Aloir Antonio Merlo (e todos seus alunos do LASOMI) pela colaboração ao presente trabalho e recepção. Ao professor Rômulo pela colaboração na obtenção dos compostos contendo selênio e espectros de massas. Ao professor Ricardo José Alves da UFMG por disponibilizar alguns materiais de partida glicosilados. Aos professores Rubem Mário Figueiró e Eduardo Cassel do Laboratório de Operações Unitárias da PUC-RS, pelas reações realizadas em gás carbônico supercrítico. Ao grupo dos professores Ana Maria Oliveira Battastini e Fabrício Figueiró, pela colaboração na presente investigação, bem como por consecutivas colaborações. Ao grupo da professora Solange e seus alunos, pela colaboração nos ensaios envolvendo a avaliação da atividade toxicológicas dos compostos sintetizados.

Aos meus amigos de bancada/laboratório, não somente por ajudar nos problemas e desafios enfrentados durante a pesquisa, mas pelas discussões produtivas, e pelas horas de descontração, Gabriel, Guilherme, Leonardo, Alceu, Pablo, Adriano, Thomas, Gustavo Luciano, João Pedro, Fabiana, Gabriela, Liliana, Isabel, Mariana, Maristela, Caroline, Luma, Eric, Luana.....

À Joyce e ao professor Francisco pelas discussões, ajudas e pelas conversas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilização de infraestrutura, acesso às bases de dados de periódicos, e profissionais qualificados com os quais tive contato.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Ao CNPq pela disponibilização da bolsa para a realização do presente trabalho. Espero que esse contexto irracional de cortes de investimentos em pesquisas, que ameaça o progresso da ciência nacional, represente apenas mais uma parte obscura da história deste país, e que dias melhores se aproximem.

Aos membros da banca examinadora, por se disponibilizarem em participar deste momento e contribuir com o presente trabalho.

A todos que de alguma forma colaboram para a execução do presente trabalho e anteriormente não foram mencionados.

RESUMO: As diidropirimidinonas (DHPMs) são consideradas estruturas privilegiadas, termo que caracteriza os esqueletos moleculares capazes de interagir com vários alvos biológicos. Diferentes mecanismos de ação para DHPMs com atividade citotóxica têm sido investigados. Um dos alvos amplamente estudados para este grupo de compostos, consiste na inibição da cinesina Eg5, a qual está envolvida na separação dos cromossomos duplicados durante a interfase da mitose. O monastrol foi a primeira DHPM identificada com atividade sobre a Eg5. Outro potencial alvo apontado para as DHPMs é a enzima ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT), envolvida no controle dos níveis extracelulares de adenosina, metabólito que pode atuar como um fator para o crescimento tumoral. O papel da ecto-5'-NT sobre a resistência de gliomas a antineoplásicos é reportado na literatura. Este trabalho tem como suporte recentes estudos *in silico* realizados pelo nosso grupo de pesquisa, os quais apontaram características estruturais de DHPMs capazes de potencializar sua interação com a ecto-5'-NT ou com a Eg5. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo explorar a geração de diversidade estrutural nessa classe de heterociclos para encontrar DHPMs com potencial atividade sobre a proliferação de linhagens tumorais, atuando sobre a ecto-5'-NT ou a Eg5. Para este objetivo, foram sintetizadas 38 DHPMs com diferentes modificações estruturais, envolvendo principalmente: (i) DHPMs N1-arilas empregando diferentes compostos 1,3-dicarbonílicos na reação de Biginelli e (ii) DHPMs com modificações no anel aromático ligado ao carbono C4. Ainda tendo como alvo a inibição da ecto-5'-NT foram obtidas acil-selenoureas como produtos de simplificação molecular de DHPMs N1-arilas. Além disso, foram realizados estudos usando diferentes experimentos de RMN, HPLC e métodos *in silico* para comprovar pela primeira vez a existência de atropoisomerismo nas DHPMs N1-arilas com substituintes na posição *orto* do anel aromático. A presença de um substituinte na posição *orto* do anel aromático ligado ao N1 produz limitada rotação na ligação C-N, gerando um eixo de quiralidade. As DHPMs sintetizadas LaSOM 299, LaSOM 302 e LaSOM 307 apresentaram atividade antiproliferativa superior ao monastrol nas linhagens de câncer de bexiga T24 (LaSOM 299: IC₅₀ 18,52 µM) e de glioma U138 (LaSOM 299: IC₅₀ 63,50 µM; LaSOM 302: IC₅₀ 68,03 µM; LaSOM 307: IC₅₀ 64,76 µM) e produziram fenótipo monoastral em células de glioma, indicando atividade sobre a Eg5. Estudos realizados *in vivo* com *Caenorhabditis elegans* para LaSOM 301, LaSOM 309, LaSOM 299, LaSOM 302 e LaSOM 307 mostraram que são compostos seguros e ainda, que o LaSOM 307 inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio. Os resultados

reportados aqui permitiram aumentar a diversidade química das DHPMs, explorando modificações em diferentes posições do núcleo da DHPM.

Palavras-chave: reação de Biginelli, síntese, ecto-5'-nucleotidase, cinesina-5, antitumoral, atropoisomerismo, *Caenorhabditis elegans*, diversidade química.

ABSTRACT: Dihydropyrimidinones (DHPMs) are privileged structures, a term that characterizes the molecular scaffolds able to interact with different biological targets. Numerous mechanisms of action for DHPMs derivatives with cytotoxic activity against cancer cell lines have been investigated. Among the potential targets widely investigated for this group of molecules is the kinesin-5 (Eg5), which is involved in the duplicated chromosomes separation during the interphases of mitosis. Monastrol was the first DHPM with an effect on Eg5. Another possible target of DHPMs is the enzyme ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT), involved in the control of extracellular adenosine levels, a metabolite that can act as a growth factor in cancer. The role of ecto-5'-NT in the resistance of gliomas against antineoplastic drugs is reported. This work has as supporting recent studies *in silico* performed by our research group, which showed structural features of DHPMs able to improve its interaction with the ecto-5'-NT or with the Eg5. In this context, the present study aims to explore the structural diversity of this heterocycle class to find DHPMs with biological activity on the cancer cell proliferation acting on ecto-5'-NT or Eg5. For this purpose, were synthesized 38 DHPMs with different structural modifications, involving mainly: (i) DHPMs N1-aryl substituted by using of different carbonyl compounds in the Biginelli reaction; and (ii) DHPMs with modifications in aromatic ring linked to the C4 carbon. Were obtained acyl-selenoureas as N1-aryl substituted DHPMs molecular simplification products targeting the ecto-5'-NT. Also, were performed studies using NMR, HPLC and *in silico* approaches aiming to demonstrate by the first time the presence of atropisomerism in the DHPMs N1 *ortho* aryl-substituted. The presence of a substituent at the *ortho* position of aromatic ring linked to the N1, produced limited rotation in the C-N bond and a chirality axis. The N1-aryl substituted DHPMs LaSOM 299, LaSOM 302 and LaSOM 307 showed higher antiproliferative effect than monastrol in urinary bladder T24 cancer (LaSOM 299 IC₅₀ 18.52 μM) and glioma U138 (LaSOM 299 IC₅₀ 63.50 μM; LaSOM 302 IC₅₀ 68.03 μM; LaSOM 307 IC₅₀ 64.76 μM) and produced monoastrol phenotype, suggesting its effect on Eg5. *In vivo* studies with *Caenorhabditis elegans* for LaSOM 301, LaSOM 309, LaSOM 299, LaSOM 302 and LaSOM 307 showed that they are safe compounds and that LaSOM 307 inhibited the production of reactive oxygen species. These novel DHPMs were safe in studies using the nematode *Caenorhabditis elegans*. The results reported here allowed to improve the chemical diversity in DHPMs, exploring structural modifications in different positions of this heterocycle.

Key-words: Biginelli reaction; organic synthesis; ecto-5'-nucleotidase; kinesin-5; anticancer therapy, atropisomerismo; chemical diversity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	32
1.1. Reação de Biginelli	32
1.1.1. Diversidade estrutural e estratégias para a síntese de DHPMs N1-arilas	34
1.1.2. Atividade farmacológica de DHPMs N1 substituídas	37
1.2. Cinesina Eg5: seu papel na mitose e desenvolvimento de inibidores	40
1.3. Ecto 5'-nucleotidase: papel no câncer e desenvolvimento de inibidores	44
1.4. Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa	50
1.5. Referências bibliográficas	50
2. OBJETIVOS	60
3. SÍNTESE DE POTENCIAIS LIGANTES PARA A CINESINA Eg5	62
3.1. Síntese de DHPMs N1-arilas	63
3.1.1. Hidrólise de DHPMs N1-arilas	65
3.2. DHPMs N1-arilas, condensadas com anel de 6 membros: DHPMs bicíclicas	67
3.3. Atropoisomerismo em DHPMs N1-arilas	79
3.3.1. Atropoisomerismo na reação de Biginelli – efeitos dos materiais de partida ..	83
3.3.2. Efeito das condições reacionais sobre a formação de atropoisômeros	89
3.3.3. Separação cromatográfica	92
3.3.4. Análise conformacional	94
3.3.5. Efeito da troca NH-3 por deutério	97
3.3.6. Experimentos com agente de deslocamento químico quiral	99
3.3.7. Resumo de resultados obtidos usando diferentes técnicas de RMN	101
3.4. Metodologia	102
3.4.1. Procedimento para a preparação de tioureias 117-120, 131, 150, 171, 172, 197 e 209	102
3.4.2. Preparação da orto-toluilureia 214	104
3.4.3. Procedimento geral para preparação de DHPMs N1-arilas	104
3.4.4. Hidrolise de DHPMs 11 e 123	126
3.4.5. Reações em CO ₂ supercrítico	128
3.4.6. Cromatografia líquida de alta eficiência	128
3.4.7. Análise conformacional e cálculos teóricos	128

3.5. Conclusões	129
3.6. Referências bibliográficas	129
4. SÍNTESE DE POTENCIAIS LIGANTES PARA A ECTO-5'-NT.....	136
4.1. Planejamento de DHPMs e de acil-selenoureas tendo como alvo a ecto-5'-NT	136
4.2. Síntese de DHPMs substituídas no anel aromático A.....	138
4.2.1. Síntese de híbridos DHPM-isoxazol(ina) - Reação de Buchwald-Hartwig	139
4.2.2. Síntese de DHMPs-isoxazóis/isoxazolinas – Reação de Vilsmeier-Haack...	149
4.2.3. Síntese de DHPMs com modificações diversas no anel A	151
4.2.4. Síntese de derivados do LaSOM 63	157
4.3. Simplificação molecular: síntese de acil-selenoureas	158
4.4. Metodologia.....	167
4.4.1. Síntese de híbridos DHPMs-isoxazóis/isoxazolinas	167
4.4.2. Protocolo geral para formilação de Vilsmeier Haack	169
4.4.3. Protocolo geral para a síntese de DHPMs.....	170
4.4.4. Síntese da DHPM 268	174
4.4.5. Síntese da DHPM 275	175
4.4.6. Síntese de acil-selenoureas (318, 321-329).....	176
4.5. Conclusões	181
4.6. Referências bibliográficas	182
5. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E TOXICOLÓGICA DE DHPMs N-1 ARILAS E DE ACIL-SELENOUREIAS.....	186
5. 1. Efeito de DHPMs sobre a proliferação celular em glioma e câncer de bexiga ...	188
5.1.1. Relação entre estrutura e atividade frente a células de glioma.....	197
5.1.2 Efeito de DHPMs N1 substituídas sobre o ciclo celular	198
5.1.3. Determinação do mecanismo de morte celular.....	200
5.1.4. Imunocitoquímica	202
5.2. Atividade antiproliferativa de acil-selenoureas	203
5.3. Avaliação da atividade sobre a ecto-5'-NT	204
5.3.1. <i>In vitro</i> – linhagens celulares de glioma humano U138.....	204
5.3.2. Enzimático – enzima ecto-5'-NT humana	205
5.4. Estudos de toxicidade aguda <i>in vivo</i> - <i>Caenorhabditis elegans</i>	206
5.5. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	209

5.6. Avaliação teórica das propriedades <i>drug-like</i>	210
5.7. Metodologia.....	212
5.7.1. Avaliação da atividade antineoplásica	212
5.7.2. Ensaio na enzima ecto-5'-NT	213
5.7.3. Avaliação toxicológica em <i>C. elegans</i>	214
5.7.4. Avaliação da atividade antioxidante in vitro	215
5.7.5. Análise estatística.	216
5.8. Conclusões	216
5.9. Referências bibliográficas	216
6. CONCLUSÕES GERAIS	220
ANEXO 1 - ÍNDICE DE ESTRUTURAS	222
ANEXO 2 – PUBLICAÇÕES RELACIONADAS À TESE.....	226
ANEXO 3 - DADOS ESPECTRAIS.....	228

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Nuvem de palavras de termos relacionados com DHPMs encontrados nos títulos de 1179 publicações disponíveis na base de dados <i>Web of Science</i>	33
Figura 2 – Produção relacionada às DHPMS (utilizando os mesmos termos descritos para a figura anterior) e à cinesina Eg5 (usando os termos “Eg5”, “KIF11”, “kinesin 5”, “kinesin-5”, “KSP”, e “kinesin spindle protein”).	34
Figura 3 – Número de DHPMs N1 substituídas obtidas em função do tempo nas últimas décadas.	35
Figura 4 – Gráfico dos escores das componentes PC1 e PC2 para 379 DHPMs N1 substituídas. Em (A) as moléculas foram agrupadas quanto ao substituinte ligado ao N1 - AR: arila; AK: alquila; ME: metóxi; AC: acila; em (B) quanto ao substituinte em C2 - oxigênio ou enxofre; em (C) quanto à absorção oral e em (D) quanto a possibilidade de atravessar a barreira hematoencefálica (preditas pelo SwissADME).	36
Figura 5 Estratégias empregadas para a obtenção de DHPMs N1 funcionalizadas.....	37
Figura 6 – DHPMs N1 substituídas com atividade sobre a proliferação de células tumorais.	39
Figura 7 - DHPMs com atividade sobre a Eg5.	41
Figura 8 - Derivados da cisteína e produtos naturais com atividade sobre a cinesina Eg5.	42
Figura 9 - Inibidores da Eg-5.	43
Figura 10 - Hidrólise do AMP catalisada pela ecto-5'-nucleotidase.....	45
Figura 11 - Inibidores da ecto-5'-NT.	46
Figura 12 - Produtos naturais com atividade sobre ecto-5'-NT.	47
Figura 13 - Principais classes de compostos identificados com atividade sobre a ecto-5'-NT. ..	49
Figura 14 – Monastrol e DHPMs previamente identificadas pelo grupo de pesquisa com atividade citotóxica sobre células de glioma.	50
Figura 15 - Modificações nas posições N1, C5 e C6 de DHPMs, tendo como alvo a Eg5.	60
Figura 16 - Modificações nas DHPMs tendo como alvo a ecto-5'-NT.	60
Figura 17 - Interações intermoleculares do monastrol com seu sítio de ligação na Eg5, identificando os três bolsões hidrofóbicos que podem ser explorados pelo inibidor.....	62
Figura 18 - Representação geral das substituições em N1 e N1, C5/C6.	63
Figura 19 - Espectros de RMN de ¹ H dos compostos 121-123 (CDCl ₃ , 400 MHz).	64
Figura 20 - Espectro de ¹ H RMN do ácido carboxílico 136 (400 MHz, DMSO-d ₆).	67
Figura 21 - Estruturas de alguns importantes building blocks com hidrogênio metileno ativo empregados na reação de Biginelli.	68
Figura 22 -DHPMs com anel fundido em C5/C6.	68
Figura 23 - Compostos de hidrogênio metileno ativo (a), aldeídos (b) e feniltioureia (c) usados como materiais de partida para a síntese de DHPMs N-arilas.....	70

Figura 24 - Espectros de RMN de ¹ H da mistura de diastereoisômeros do intermediário 163 juntamente com o produto 162 (A) e do intermediário 163 (B) - CDCl ₃ , 400 MHz.....	73
Figura 25 - Espectro de ¹³ C RMN (CDCl ₃ , 100 MHz) do intermediário 163	73
Figura 26 - Espectros de RMN de ¹ H dos compostos 151 (A), 154 (B) e 160 (D) (CDCl ₃ , 400 MHz) e 157 (C) (DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	77
Figura 27 – Espectros de RMN de ¹³ C dos compostos 151 (A), 154 (B) e 160 (D) (CDCl ₃ , 400 MHz); 157 (C) (DMSO-d ₆ , 400 MHz).	77
Figura 28 - Definição de atropoisomerismo.	79
Figura 29 - Catalisadores quirais (A) e alguns heterociclos sintéticos em que pode ser identificado atropoisomerismo (B).	80
Figura 30 - Exemplos de moléculas de interesse biológico em que existe atropoisomerismo....	81
Figura 31 - Estruturas de fármacos aprovados com atropoisomerismo.	81
Figura 32 – Monastrol e DHPM N1-arilas mono orto-substituída.	83
Figura 33 - Estruturas de DHPMs 198-203 (com atropoisomerismo) e DHPMs 204-206 (sem atropoisomerismo) destacando o sinal H4 no espectro de RMN de ¹ H. (CDCl ₃ , 400 MHz). Para o composto 200 o espectro foi obtido do espectro com a adição de quatro gotas de benzeno.....	84
Figura 34 - Efeito da simetria do anel ligado em N1. Em (A) espectro de RMN de ¹ H do composto 198 ; e em (B) espectro de RMN de ¹ H do composto 204 (CDCl ₃ , 400 MHz).	85
Figura 35 - Produção de um eixo de simetria como estratégia para evitar o atropoisomerismo.	85
Figura 36 - Mistura de atropoisômeros do composto 198	87
Figura 37 – Sinais nos espectros de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) para as DHPMs N1 orto arilas.	88
Figura 38 - Análise da área do sinal do H4 para a formação de atropoisômeros em diferentes condições reacionais. Nas figuras (A-E) mostra-se o efeito da temperatura e da radiação de micro-ondas. O efeito do solvente pode ser observado em (A), (F), (H) e (I).....	91
Figura 39 - Relação entre o percentual de atropoisômero que produz o sinal do H4α e a temperatura reacional em DMF.	92
Figura 40 - Separação cromatográfica do composto 200 . Em (A) espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da mistura de atropoisômeros obtidos ao término da reação, e em (B) produto isolado.	93
Figura 41 - Análise por HPLC com fase estacionária quiral da mistura de atropoisômeros de DHPMs N1 <i>orto</i> -arilas.	94
Figura 42 - Energia relativa (Kcal/mol) das DHPMs N1-orto-arilas 198-206 e 215 em função do ângulo diedro (θ) C6-N1-C1'-C2'.	95
Figura 43 - Regiosseletividade da reação de Biginelli usando (tio)ureias mono-substituídas.....	97
Figura 44 - Expansão na região entre 5 a 8 ppm do espectro do composto 198 (CDCl ₃ , 400 MHz) antes (A) e depois (B) de adicionar duas gotas de D ₂ O. Em (C) está descrita a troca de NH-3 por ND-3, destacando o acoplamento que foi perdido e em (D) a possibilidade de se ter uma mistura de regioisomêros N1 e N3 substituídos.	98

Figura 45 - Expansão do experimento de NOESY do composto 198 (400 MHz, CDCl ₃).....	99
Figura 46 - Efeito do aumento da concentração de Pr(tfc) ₃ sobre a variação de δ do H4.	100
Figura 47 - Efeito da adição de quantidades crescentes de Pr(tfc) ₃ sobre o sinal do H4 dos compostos 206 (A), 198 (B) e 199 (C) - (CDCl ₃ , 400 MHz).....	101
Figura 48 - Experimentos realizados com o composto 198 , destacando o sinal do H4. Em (A) espectro do composto 198 , em (B) efeito da remoção de CH ₃ em <i>orto</i> , em (C) efeito da presença de um segundo CH ₃ em <i>orto</i> , em (D) efeito da troca no NH-3 por deutério e em (E) efeito da adição de Pr(tfc) ₃	102
Figura 49 - Interações entre o LaSOM 63 com a ecto-5'- NT (Discovery Studio Visualizer).....	136
Figura 50 - Posições do núcleo DHPM consideradas para possíveis modificações estruturais visando obter ligantes para a ecto-5'-NT	137
Figura 51 - (A) Acil-tiourea com atividade sobre a ecto-5'-NT; (B) obtenção de acil-ureias como produto de simplificação molecular de DHPMs.	138
Figura 52 - Possíveis interações de acil-selenoureas com o sítio ativo da ecto-5'-NT.	138
Figura 53 - Planejamento sintético dos híbridos DHPM-isoxazol/isoxazolina.....	139
Figura 54 - Produção relacionada com isoxazóis (usando os termos isoxazole; isoxazol) e isoxazolininas (usando os termos dihydroisoxazole e isoxazoline) na <i>Web of Science</i>	140
Figura 55 - Fármacos que apresentam o núcleo isoxazol em sua estrutura.	141
Figure 56 - Isoxazolininas usadas no controle de ectoparasitas.....	142
Figura 57 - Principais estratégias para a síntese de isoxazóis.....	143
Figura 58 - Aminas com os isoxazóis e isoxazolininas usadas na reação de Buchwald-Hartwig.....	143
Figura 59 - RMN de ¹ H dos compostos 231 (A) e 230 (B) em CDCl ₃ , 400 MHz.....	145
Figura 60 - Espectro de RMN de ¹ H dos compostos 277 (A) e 279 (B) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	155
Figura 61 - Expansão do experimento de NOESY para o composto 279 (CDCl ₃ , 400 MHz)....	156
Figura 62 - Presença do selênio em compostos orgânicos.....	158
Figura 63 - Abordagens para a obtenção de DHPMs com C=Se.....	159
Figura 64 - DHPMs com C=Se.	159
Figura 65 - Síntese de DHPMs N1-arilas C=Se.....	160
Figura 66 - Síntese em paralelo de acil-selenoureas. (A) reações após a adição de KSeCN e cloreto de benzoila; (B) reações após a adição das aminas.	162
Figura 67 – Comparação dos espectros de RMN de ¹ H de acil-selenoureas (CDCl ₃ , 400 MHz).	164
Figura 68 - Comparação dos espectros de RMN de ¹³ C de acil-selenoureas (CDCl ₃ , 400 MHz).	165
Figura 69 – Espectro de HMBC para 321 (A) e 324 (B) destacando o acoplamento ³ J _{C1-H_a} ...	165
Figura 70 - Acil-selenoureas como produtos de simplificação molecular de seleno-DHPMs...	166

Figura 71 - Monastrol e DHPMs N1-arilas sintetizadas para inibição da Eg5.....	189
Figura 72 - Viabilidade celular nas linhagens de glioma U138 (A) e C6 (B) tratadas com monastrol ou LaSOM 289, LaSOM 301, LaSOM 308 e LaSOM 309 por 24 h antes do ensaio MTS. Os dados estão representados como média ± desvio padrão.	190
Figura 73 - Efeito de DHPMs N1-arilas e do monastrol na concentração de 150 µM sobre a viabilidade celular de células de glioma U138. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (DMSO) de acordo com ANOVA seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	190
Figura 74 - Efeito do monastrol e das DHPMs N1-arilas na linhagem de glioma U138. Células de glioma U138 foram tratadas com monastrol e DHPMs e a viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTS. Os dados estão representados como média ± desvio padrão.	191
Figura 75 - Efeito do monastrol e das DHPMs N1-arilas na linhagem de câncer de bexiga T24. Células da linhagem T24 foram tratadas com monastrol e DHPMs e a viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTS. O efeito no monastrol foi avaliado até 200 µM para gerar as equações de regressão a partir das quais os valores de IC ₅₀ foram determinados. Os dados estão representados como média ± desvio padrão.	192
Figura 76 -- Efeito da mistura de atropoisômeros do composto 351 sobre a viabilidade celular em glioma U138. Células de glioma U138 foram tratadas com 351 e a viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTS. Os dados estão representados como média ± desvio padrão.	193
Figura 77 – Relação estrutural entre representantes da série de DHPMs sintetizada. A escala de cores descreve a atividade sobre células de glioma U138, sendo: vermelho = mais ativo, amarelo = menos e verde = sem atividade.....	195
Figura 78 - Efeito de 171 (a, d), 171 (b, e) e 172 (c, f) sobre a proliferação celular em câncer de bexiga T24 (a-c) e de glioma U138 (d-f). Os valores de IC ₅₀ foram calculados por regressão não linear utilizando o modelo $y = A/(1+10^{((\text{Log}(\text{IC}_{50}-x) \cdot \text{Hill Slope}))})$	196
Figura 79 - Valores de viabilidade celular produzidos pelo LaSOM 309 e por seu ácido sobre a proliferação celular (glioma U138).....	196
Figura 80 - Valores de viabilidade celular do monastrol de seus derivados glicosilados sobre a proliferação celular (glioma U138).....	197
Figura 81 - REA para DHPMs sobre a proliferação de células de glioma humano.....	198
Figura 82 - Efeito do LaSOM 299 348 , LaSOM 301 10 , LaSOM 302 340 , LaSOM 307 344 , LaSOM 309 11 e do monastrol 5 sobre células de glioma (C6 e U138) e de câncer de bexiga T24. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ para a população de células na fase G ₂ /M comparada ao controle usando ANOVA, seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	199
Figura 83 - Tipo de morte celular produzida pelo LaSOM 301 10 , LaSOM 309 11 e monastrol 5 na linhagem U138 (A) e na linhagem C6 (B). Nas Figuras (C) e (D) o mesmo ensaio foi realizado para LaSOM 299 348 LaSOM 302 340 e LaSOM 307 344 nas linhagens U138 e T24. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ se comparado ao controle usando ANOVA, seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	201
Figura 84 - Marcação do material genético em azul e da tubulina em verde de células da linhagem U138 (A-D) tratadas com 200 µM de monastrol ou 150 µM de LaSOM 301 e LaSOM 309, e de células da linhagem C6 (E-H) tratadas com 100 µM de monastrol ou 50 µM de LaSOM 301 e LaSOM 309 por 24 horas. As imagens foram coletadas em aumento de 600X.....	202

Figura 85 - Atividade do composto 319 e seu derivado 352 sobre a proliferação de células tumorais T24. Os dados estão representados como média ± erro padrão.....	203
Figura 86 - Atividade de acil-selenoureas sobre a proliferação celular de câncer de pulmão A549 (A e B) e sobre a linhagem de fibroblastos 3T3 (C e D). Os dados estão representados como média ± erro padrão. * $p < 0,05$ comparado com o grupo DMSO de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	204
Figura 87 - Efeito de DHPMs e acil-selenoureas sobre a atividade da ecto-5'-NT.	206
Figura 88 - Curvas de mortalidade para as DHPMs em <i>C. elegans</i> . Em (a) para monastrol e em (b-f) para os seus derivados N1-arilas. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ($n = 3$). R nas estruturas corresponde a um anel aromático com OH na posição <i>meta</i>	207
Figura 89 - Efeito de LaSOM 299 (A), LaSOM 302 (B) e LaSOM 307 (C) sobre o desenvolvimento do <i>C. elegans</i> . Os dados são apresentados como média ± erro padrão. * $p < 0,05$ se comparado ao controle, segundo ANOVA seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	207
Figura 90 - Produção de espécies reativas de oxigênio em <i>C. elegans</i> , produzida pela exposição a LaSOM 299 (A), LaSOM 302 (B) e LaSOM 307 (C). * $p < 0.05$ comparado com o grupo controle segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.	208
Figura 91 - Captura do radical DPPH por LaSOM 299 (A), LaSOM 302 (B) e LaSOM 307 (C). R nas estruturas corresponde a um anel aromático com hidroxila em <i>meta</i>	209
Figura 92 – Propriedades moleculares de 50 DHPMs e de 12 acil-selenoureas. As regiões destacadas em cinza representam os valores do parâmetro analisado que atende à regra de Lipinski.	210
Figura 93 - Diagrama BOILED-Egg para as moléculas que tiveram sua atividade investigada.	211

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	32
Esquema 2	64
Esquema 3	65
Esquema 4	66
Esquema 5	72
Esquema 6	74
Esquema 7	75
Esquema 8	78
Esquema 9	78
Esquema 10	79
Esquema 11	83
Esquema 12	86
Esquema 13	89
Esquema 14	89
Esquema 15	90
Esquema 16	140
Esquema 17	144
Esquema 18	146
Esquema 19	147
Esquema 20	147
Esquema 21	149
Esquema 22	149
Esquema 23	150
Esquema 24	150
Esquema 25	151
Esquema 26	152
Esquema 27	152
Esquema 28	153
Esquema 29	154
Esquema 30	155
Esquema 31	156
Esquema 32	157
Esquema 33	157
Esquema 34	160
Esquema 35	161
Esquema 36	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – DHPMs N1-arilas sintetizadas.....	70
Tabela 2 - Barreiras de energia relativa e ângulos diedro dos atropisômeros das DHPMs N1- <i>orto</i> arilas	96
Tabela 3 - Otimização das condições reacionais para o acoplamento entre o LaSOM 174 e as anilinas contendo isoxazol ou isoxazolina	148
Tabela 4 - Acil-selenoureas sintetizadas	162
Tabela 5 – Valores de IC ₅₀ de DHPMs N1-arilas em células de glioma U138 e C6.....	189
Tabela 6 – Valores de IC ₅₀ das DHPMs N1-arilas em células de glioma U138 e de câncer de bexiga T24	192
Tabela 7 – Viabilidade celular dos compostos 151-162 , tiouréia 163 e LaSOM 305 341 sobre células T24 e U138 na concentração de 150 µM.....	194
Tabela 8 – Efeito de DHPMs N1-arilas (50µM, 24h) sobre a ecto-5'-NT em células da linhagem de glioma U138 ¹	205

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

3T3	linhagem celular de fibroblastos
A549	linhagem celular de câncer de pulmão
AMP	monofosfato de adenosina
ADP	difosfato de adenosina
AOPCP	α,β -metileno-ADP
ATR	attenuated total reflection
ASIS	aromatic solvent induced shifts
C6	linhagem de glioma murino
CCD	cromatografia em camada delgada
CD73	ecto-5'-nucleotidase (cluster of differentiation 73)
CDCI ₃	clorofórmio deuterado
CL ₅₀	concentração necessária para produzir morte em metade de uma população
DCF-DA	diacetato de 2',7'-diclorofluorescína
DHPM	diidropirimidinona ¹
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
Ecto-5'-NT	ecto-5'-nucleotidase
Eg5	cinesina 5
FT-IR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
G ₂ /M	fase Gap2 do ciclo celular
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	espectroscopia de massas de alta resolução
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
IC ₅₀	concentração necessária para atingir metade do efeito inibitório máximo
K _i	constante de inibição
KSP	kinesin spindle protein
LaSOM	Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy

¹ Embora a abreviação DHPM seja usualmente empregada para descrever diidropirimidin-2-onas, é convenção em nosso Laboratório usá-la para nominar as diidropirimidin-2-tionas e será esta a notação empregada neste trabalho.

Pgp	glicoproteína P
REA	relação estrutura-atividade
RMN	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
T24	linhagem celular de câncer de bexiga
TMS	tetrametilsilano
TMSCI	clorotrimetilsilano
TsOH	ácido <i>p</i> -toluenosulfônico
U138	linhagem glioma humano

EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS

Análises Cromatográficas

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica Merck 60 F254. As separações desenvolvidas por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando Sílica Gel 60 para coluna cromatográfica 0.063-0.2 mm marca Fluka.

Determinação do Ponto de Fusão (PF)

As análises de ponto de fusão foram realizadas no equipamento Fisatom Mod.431 (São Paulo, Brasil) e não foram corrigidas.

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker Ascend 400 operando na frequência de 400 MHz e 100 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Os dados foram adquiridos conforme os parâmetros fornecidos pelo equipamento e processados no *software* MestRenova 6.0.2. Os valores de deslocamento químico foram expressos em partes por milhão (ppm), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os solventes utilizados nas análises foram DMSO- d_6 ou CDCl_3 . As constantes de acoplamento estão representadas pela letra *J* e expressas em Hz. As notações utilizadas para a multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN H^1 foram: *s* (simpleto), *d* (duplete), *t* (triplete), *q* (quarteto), e *m* (multiplete).

Espectrometria no Infravermelho (FT-IR)

As análises foram realizadas no Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) modelo Spectrum BXII marca Perkin Elmer, com a utilização de ATR. As deformações axiais e angulares foram expressas em cm^{-1} .

Medida do desvio da luz polarizada

A determinação da rotação óptica foi realizada em um polarímetro da marca Perkin Elmer, modelo 341. As determinações foram realizadas solução de clorofórmio 10 g/l a 20 °C.

Reações assistidas por micro-ondas

A reações assistidas por micro-ondas foram realizadas no reator CEM Discover[®] microwave system (Matthews, NC, USA)

1. INTRODUÇÃO

O conteúdo das páginas 32 até 59 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

2. OBJETIVOS

O conteúdo das páginas 60 até 61 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

3. SÍNTESE DE POTENCIAIS LIGANTES PARA A CINESINA Eg5

O conteúdo das páginas 62 até 135 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente .

4. SÍNTESE DE POTENCIAIS LIGANTES PARA A ECTO-5'NT

O conteúdo das páginas 136 até 185 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

5. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E TOXICOLÓGICA DE DHPMs N-1 ARILAS E DE ACIL-SELENOUREIAS

O conteúdo das páginas 186 até 219 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O conteúdo das páginas 220 até 221 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

ANEXO 1 - ÍNDICE DE ESTRUTURAS

O conteúdo das páginas 222 até 225 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

ANEXO 2 – PUBLICAÇÕES RELACIONADAS À TESE

1. Gonçalves, I.L.; Rockenbach, L.; Goethel, G.; Sauer, E.; Kagami, L.P.; Neves, G. M.; Munhoz, T.; Figueiró, F.; Garcia, S.C.; Battastini, A.M.O.; Eifler-Lima, V.L. New pharmacological findings linked to biphenyl DHPMs, kinesin Eg5 ligands: anticancer and antioxidant effects. **Future Medicinal Chemistry** 2020, 12, (12), 1137-1154.
2. Gonçalves, I.L.; Rockenbach, L.; Neves, G.M.; Goethel, G.; Nascimento, F.; Kagami, L.P.; Figueiró, F.; Azambuja, G.O.; Dias, A.F.; Amaro, A.; Souza, L.M.; Pitta, I.R.; Avila, D.S.; Kawano, D.F.; Garcia, S.C.; Battastini, A.M.O.; Eifler-Lima, V.L. Effect of N-1 arylation of monastrol on kinesin Eg5 inhibition in glioma cell lines. **Medicinal Chemistry Communications** 2018, 9, (6), 995-1010.
3. Gonçalves, I.L.; Davi, L.; Rockenbach, L.; Neves, G.M.; Kagami, L.P.; Canto, R.F.S.; Figueiró, F.; Battastini, A.M.O.; Eifler-Lima, V.L. Versatility of the Biginelli reaction: synthesis of new biphenyl dihydropyrimidin-2-thiones using different ketones as building blocks. **Tetrahedron Letters** 2018, 59, (28), 2759-2762.
4. Gonçalves, I.L.; Kagami, L.P.; Neves, G. M.; Rockenbach, L.; Davi, L.; Soares, A.F.; Garcia, S.C.; Eifler-Lima, V.L. Ethyl_4-(2-fluorophenyl)-6-methyl-2-thioxo-1-(p-tolyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate. **Molbank** 2018, 2018, (4), 1-4.
5. Gonçalves, I.L.; Azambuja, G.O.; Kawano, D.F.; Eifler-Lima, V.L. Thioureas as building blocks for the generation of heterocycles and compounds with pharmacological activity: an overview. **Mini-Reviews in Organic Chemistry** 2018, 15, (1), 28-35.
6. Gonçalves, I.L.; Davi, L.; Neves, G.M.; Kagami, L.P.; Garcia, S.C.; Battastini, A.M.O.; Figueiró, F.; Faria Santos Canto, R.; Merlo, A.A.; Eifler-Lima, V.L. Atropoisomerism in N1-aryl substituted 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thiones. **ChemistrySelect** 2020, 5, (42), 13212-13222.
7. Gonçalves, I.L.; Davi, L.; Torres, F.C.; Canto, R.F.S.; Merlo, A.A.; Eifler-Lima, V.L. Synthesis of 1-phenylthiourea: an undergraduate organic chemistry experiment illustrating carbonyl transformations. **Journal of Chemical Education**. Artigo aceito.
8. Gonçalves, I.L.; Neves, G.M.; Kagami, L.P.; Arraché, G.G.; Davi, L.; Battastini, A.M.O.; Eifler-Lima, V.L. Exploring N1 position of Biginelli compounds: new insights and trends for chemical diversity generation. Manuscrito em revisão final, a ser submetido no **Chemistry a European Journal**.

ANEXO 3 – DADOS ESPECTRAIS

O conteúdo das páginas 228 até 353 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.